

2011.3192.5

Université de Montréal

Effets protecteurs d'un donneur de NO sur la fonction diastolique du cœur
défaillant de hamster UM-X7.1

par

11485-875

Jean-François Desjardins
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

Août 2003

© Jean-François Desjardins, 2003



W

4

U58

2004

V. 107

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets protecteurs d'un donneur de NO sur la fonction diastolique du cœur
défaillant de hamster UM-X7.1

présenté par :

Jean-François Desjardins

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Teresa Kus.....président-rapporteur
Louis DUMONT.....directeur de recherche
Louis Perrault.....membre du jury

Mémoire accepté le :

RÉSUMÉ

Une augmentation de débit dans les coronaires entraîne la genèse de forces de cisaillement qui auront des répercussions sur la qualité de la fonction cardiaque (relaxation, contraction). La dilatation induite par l'accroissement du débit pourrait impliquer la participation de plusieurs facteurs endothéliaux dont le NO. Le rôle de ce médiateur dans le contrôle du tonus vasculaire est bien connu mais son influence comme modulateur de la fonction cardiaque a seulement été évaluée récemment. Parallèlement à ses effets vasculaires, le NO pourrait exercer un effet bénéfique sur la relaxation cardiaque en minimisant les effets néfastes d'une augmentation du flot coronarien sur celle-ci. Nous avons évalué ces interactions dans un modèle de cœur isolé (Langendorff) à débit constant chez le hamster cardiomyopathique UM-X7.1 défailant (>225jours). Les paramètres ont été mesurés à l'état basal et après stabilisation (~3min) suivant chaque augmentation mécanique du débit (+1 à +5 ml/min), avec ou sans nitroprussiate de sodium (SNP 10^{-6} M). Afin de déterminer l'influence possible de l'effet chronotrope positif associé au SNP, des cœurs ont été stimulés à +30 batt/min au delà du niveau de base de la fréquence tout au long des augmentations de débit. La présence de SNP empêche une trop importante détérioration de la pression diastolique aux augmentations de +2 et +3 ml/min et ce, sans affecter les changements de perfusion coronarienne, de pression systolique et des vitesses de contraction (+dP/dt_{max}) et de relaxation (-dP/dt_{max}). Cet effet bénéfique ne semble pas être le résultat d'une modification de la fréquence cardiaque induite par le SNP. De plus, la vasodilatation induite par le SNP à pression constante produisait des effets diastoliques bénéfiques lorsque comparée à l'effet d'une augmentation mécanique similaire du débit coronarien. Ainsi, le nitroprussiate de sodium procure un effet protecteur en présence de forces de cisaillement associées à une augmentation de la perfusion coronarienne. Nous concluons que l'utilisation de ce vasodilatateur pourrait être mis à profit chez des patients présentant des dysfonctions diastoliques ventriculaires.

Mots clés : SNP, Langendorff, lusitropie, cardiomyopathie, forces de cisaillement,

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

An increase in coronary flow leads to the genesis of shear stress that will in turn affect the quality of cardiac function (relaxation, contraction). The dilation that is induced by increasing the flow might imply the participation of some endothelial factors like NO. The contribution of this mediator in the control of vascular tone is well known but its influence as a modulator of cardiac function has only recently been tested. In addition to its vascular effects, NO might also produce cardiac relaxing benefits by minimizing the negative diastolic effects associated with an increase in coronary flow. We tested this hypothesis in the isolated heart (Langendorff) perfused at a constant pressure in the failing cardiomyopathic hamster UM-X7.1 (>225 days). Parameters were measured at baseline and after stabilization (~3min) following mechanical increases in coronary flow (+1 to +5 ml/min), with or without sodium nitroprusside (SNP 10^{-6} M). In order to determine the possible influence of SNP's chronotropic effect hearts were paced at +30 beats per minute above their intrinsic rate in the course of the flow increases. The presence of SNP partly prevents diastolic deterioration at +2 and +3 ml/min, and does so without affecting systolic and perfusion pressures or maximum rate of pressure rise (+dP/dt_{max}) and decline (-dP/dt_{max}). This beneficial effect does not seem to be the result of SNP-induced cardiac frequency modification. Moreover, the SNP-induced vasodilation produced beneficial diastolic effects when compared to the effect of a similar mechanical increase in coronary flow. Thus, sodium nitroprusside procures a protecting effect in the presence of shear stress associated with a coronary perfusion increase. We conclude that this vasodilator could be useful in patients with ventricular diastolic dysfunctions.

Key words : SNP, Langendorff, lusitropic, cardiomyopathy, shear stress,

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
RÉSUMÉ EN ANGLAIS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xii
DÉDICACE	xiii
1.0. INTRODUCTION	1
1.1. Altération de la perfusion coronarienne : Effets cardiaques	2
1.1.1. Effet Gregg : mécanismes impliqués	3
1.1.2. Les dernières découvertes : Origine du phénomène et nouveau modèle d'analyse.....	5
1.1.3. Effets de la perfusion sur la relaxation myocardique.....	8
1.2. LE NO.....	9
1.2.1. Propriétés physico-chimiques du NO	10
1.2.2. Synthèse du NO en milieu biologique.....	11
1.2.3. Structure des NO synthases.....	12
1.2.4. Mécanismes des NOS.....	13
1.2.5. Régulation des NOS.....	13
1.2.6. NOS-3 : localisation dans le cœur.....	16
1.2.7. NOS-3 et relation force-fréquence.....	17
1.2.8. NO et Vasodilatation.....	17
1.2.8.1. Rôle du NO dans le tonus périphérique	17
1.2.8.2. Relaxation du muscle lisse vasculaire : mécanismes impliqués	18
1.3. Le NO et ses effets cardiaques	19
1.3.1. Les vasodilatateurs et donneurs de NO : études <i>in vivo</i>	20

1.3.2. Les cœurs isolés et perfusés : études <i>ex vivo</i>	25
1.3.3. Les cardiomyocytes isolés : études <i>in vitro</i>	27
1.4. But du projet de recherche.....	35
2.0. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	37
2.1 Le modèle de perfusion à débit constant.....	38
2.1.1. Passage de pression de perfusion constante à débit de perfusion constant.....	38
2.2. Modèle expérimental.....	39
2.3. Protocole expérimental.....	40
2.3.1. Analyses statistiques.....	41
3.0. RÉSULTATS	43
3.1. Valeurs de base	44
3.2. Conséquences d'un passage à débit constant	44
3.3. Effets d'une augmentation mécanique du débit coronarien chez le groupe témoin.....	45
3.4. Effets du SNP 10^{-6} M à pression constante.....	45
3.5. Effets du SNP 10^{-6} M en présence de forces de cisaillement.....	46
4.0. DISCUSSION	56
4.1. Le hamster cardiomyopathique UM-X7.1	57
4.2. Le montage de Langendorff.....	60
4.2.1 Sélection de la pression de perfusion coronarienne.....	61
4.2.2 Le ballon de latex.....	61
4.2.3 Avantages et limites du modèle.....	62
4.3. Modèles de perfusion coronarienne et forces mécaniques pariétales	63
4.4. Effets d'une augmentation mécanique du débit.....	65
4.4.1. Influence sur la fonction contractile du cœur : Effet Gregg	65
4.4.2. Effets sur la compliance diastolique.....	67
4.5. Effets du SNP 10^{-6} M à pression constante et en présence de forces de cisaillement : Effets bénéfiques sur la relaxation myocardique.....	69
5.0. RÉFÉRENCES.....	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Mécanismes intra-cellulaires sous-jacents aux effets cardiaques et vasculaires du NO.....	36
Figure 2. Montage du cœur isolé.....	42
Figure 3. Exemple de tracé.....	48
Figure 4-A,B. Effets d'une augmentation de débit sur la pression de perfusion.....	49
Figure 5. Effets d'une augmentation de débit coronarien sur la résistance coronarienne.....	50
Figure 6-A, B. Effets d'une augmentation de débit sur la pression diastolique et la vitesse de relaxation.....	51
Figure 7-A, B, C. Effets d'une augmentation de débit sur la pression systolique, la pression ventriculaire gauche et la vitesse de contraction.....	52
Figure 8-A, B. Effets d'une augmentation de débit sur la fréquence cardiaque.....	53
Figure 9. Effets de 5min d'infusion du SNP 10-6M sur le débit coronarien et les pressions systolique et diastolique à pression constante.....	54
Figure 10. Effets du SNP 10-6M sur la pression ventriculaire gauche, la fréquence cardiaque et les vitesses de contraction et de relaxation à pression de perfusion constante...	55
Figure 11. Évolution de la cardiomyopathie du hamster UM-X7.1.....	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Effets des systèmes de régulation métabolique en réponse à une augmentation de pression diastolique.....	7
Tableau II. Valeurs de base avant augmentations du débit coronarien.....	47

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

σ	: Contraintes circonférentielles
$+dP/dt_{\max}$: Vitesse de contraction maximale
$-dP/dt_{\max}$: Vitesse de relaxation maximale
8-b-GMPc	: 8-bromo-guanyl monophosphate cyclique
Ach	: Acétylcholine
ADMA	: Diméthylarginine asymétrique (N ^G -diméthylarginine)
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
ATP	: Adénosine triphosphate
B	: Débit
BH ₄	: Tétrahydrobioptérine
Ca ²⁺	: Calcium
CaM	: Calmoduline
CO	: Monoxyde de carbone
CYP-450	: Cytochrome P-450
DEA	: Diéthylamine
EDRF	: Facteur relaxant dérivé de l'endothélium
FAD	: Flavine mononucléotide
FMN	: Flavine adénine dinucléotide
GCs	: Guanylate cyclase soluble
GMPc	: Guanosine monophosphate cyclique
IBMX	: 3-Isobutyl-1-méthyl-xanthine, inhibiteur de PDE
I _{Ca-K}	: Courant calcique dépendant du K ⁺
I _{Ca-L}	: Courant calcique (type-L) dépendant du potentiel
IL-1	: Interleukine-1
ISO	: Isoprotérénol
L-NAME	: N ^G -nitro L-arginine-méthylester
L-NMMA	: N ^G -mono méthyl-L-arginine
mM	: Millimolaire
mm Hg	: Millimètre de mercure

MVO ₂	: Consommation d'oxygène myocardique
NADPH	: β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NF-κB	: Facteur nucléaire-κB
NO	: Monoxyde d'azote
NO ₂ ⁻	: Nitrite
NO ₃ ⁻	: Nitrate
NOS	: NO synthases
NOHA	: N ^ω -hydroxy-L-arginine
O ₂	: Oxygène
O ₂ ⁻	: Anion superoxyde
ONOO ⁻	: Ion peroxydinitrite
K ⁺	: Potassium
KCLM	: Kinase des chaînes légères de la myosine
ODQ	: 1H-(1,2,4)Oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1
PCLM	: Phosphatase des chaînes légères de la myosine
PDE	: Phosphodiesterase
PDVG	: Pression ventriculaire gauche en fin de diastole
PIN	: Protéine inhibitrice de la NOS-1
PKA	: Protéine kinase A
PKG	: Protéine kinase G
PO ₂	: Pression partielle en oxygène
Pp	: Pression de perfusion
PSVG	: Pression ventriculaire gauche en fin de systole
PVG	: Pression ventriculaire gauche
R	: Résistance
Ra	: Résistance artérielle
SDMA	: diméthylarginine symétrique (N ^G - diméthylarginine)
SERCA	: Réticulum sarco(endo)plasmique
SIN-1	: 3-morpholinosydnonimine
SNP	: Nitroprussiate de sodium
SNAP	: S-nitroso-N-acetylpenicillamine

SOC : Canaux calciques dépendants du remplissage
SS : Raccourcissement segmentaire
TNF- α : Facteur nécrosant des tumeurs-alpha

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le docteur Louis Dumont qui m'a guidé dans ma formation scientifique. Je le remercie pour m'avoir donné la chance d'étudier ce passionnant domaine qu'est la pharmacologie cardiovasculaire. Et c'est passionnément et avec enthousiasme que le Dr Dumont m'a enseigné cette science. Il apportait une grande importance à l'idée que la maîtrise devait, avant tout, permettre à l'étudiant d'acquérir une solide base théorique. De ce fait, il était toujours prêt à engager avec nous de longues discussions quand nous n'étions pas à l'aise avec certains concepts. Je le remercie aussi pour sa grande disponibilité, sa patience, son humour et ses conseils judicieux.

J'aimerais remercier ceux qui m'ont accompagné tout au long de ma maîtrise et avec lesquels j'ai passé de très bons moments : Danica Brousseau, Julie Massicotte, Pierre Beaucage, Hongbo Wang et Florin Sararman. Je tiens aussi à exprimer ma gratitude envers Élisabeth Pérès pour son expertise en infographie. Je voudrais remercier Nadine Michaud qui a été ma compagne pendant la majeure partie de mes études universitaires. Je la remercie sincèrement pour tout; sans elle certains de mes rêves ne se seraient pas réalisés. Aussi, j'aimerais remercier Francine Côté, Élisabeth Pérès, Odette Boisé pour tous les bons moments que j'ai passés avec eux. J'apprécie énormément ce qu'ils ont fait pour moi et je suis très heureux d'avoir fait leur connaissance.

À mes parents

1.0. INTRODUCTION

1.1. Altération de la perfusion coronarienne : Effets cardiaques

Effet Gregg : L'observation que la consommation myocardique en oxygène et la contractilité augmentent avec l'élévation de la pression de perfusion.

En 1958, Gregg est le premier à faire un lien entre la perfusion coronarienne et la consommation myocardique en oxygène (MVO_2) (1). Il rapporte qu'une augmentation de pression ou de flot dans l'artère coronaire gauche élève la MVO_2 et la contractilité dans des cœurs isolés et non-travaillants de chiens. Parce qu'il fut longtemps accepté que des changements de la pression de perfusion (P_p) ne puissent altérer le métabolisme myocardique, on parla alors de 'phénomène de Gregg' ou même de 'folie de Gregg' pour décrire l'idée principale de l'ouvrage. En 1963, Gregg s'associe aux laboratoires de Braunwald, Katz et Sarnoff, et publie un éditorial qui va considérablement renforcer son hypothèse (2).

À l'époque, on s'entendait pour dire (sans preuves expérimentales) qu'une altération de la P_p coronarienne pouvait changer le degré d'étirement des fibres myocardiques (par distension des vaisseaux) en systole et diastole, affectant ainsi la MVO_2 et la contractilité (ce mécanisme de contre-coup élastique, impliquant la loi de Frank-Starling, est alors nommé 'Garden hose effect'). En 1968, Arnold et coll. (3) publient un article en faveur du 'garden hose effect' qui marquera le début des efforts consacrés à la compréhension des mécanismes impliqués dans le phénomène de Gregg. Les résultats des études qui ont suivi ont été le sujet de plusieurs controverses probablement dû à la variété des préparations utilisées, à la magnitude du travail myocardique généré dans ces études (et à la façon de le mesurer), à la difficulté des chercheurs de pouvoir différencier l'effet du débit coronarien (B) par rapport à la pression artérielle coronarienne et à la difficulté de mettre en évidence l'activité de l'effet Gregg dans un système *in vivo* sain. Malgré son apparente simplicité, l'effet Gregg est encore, aujourd'hui, mal compris.

1.1.1. Effet Gregg : mécanismes impliqués

Sarnoff et coll. (1963) ont trouvé qu'on pouvait augmenter la MVO_2 et la contractilité lorsque l'on augmentait le B, mais seulement à de faibles et restrictifs niveaux de flot coronarien (4). D'autres études rapportent une augmentation de la performance ventriculaire associée à une augmentation de Pp dans des préparations de cœurs isovolumétriques et non-travaillants (ballon inséré dans le ventricule, cœurs non-éjectants) lorsque la pression ventriculaire gauche (PVG) et la vitesse de contraction maximale (dP/dt_{max}) étaient utilisées comme index de contractilité (5,6). Abel et coll. (1970) (7) ont publié un ouvrage appuyant l'observation de Gregg mais vont stipuler que le B est un déterminant indépendant de l'état contractile du myocarde et qu'une augmentation de débit qui excède la demande métabolique pourrait mener à un effet inotrope positif.

Huit ans après l'hypothèse du 'garden hose effect' d'Arnold, Downey et coll. (1976) (8) proposent une autre hypothèse qui met en cause la présence de zones ischémiques dans le cœur. Une augmentation de la Pp coronarienne pourrait réduire ces zones ischémiques et par le fait même, améliorer la performance cardiaque. Toutefois, Schouten et coll. (1992) ont montré, dans des préparations de muscles papillaires de rats, que l'aspect contractile de l'effet Gregg ne pouvait être expliqué par la présence de zones ischémiques ou par des changements dans la longueur des fibres cardiaques (9). Dans son éditorial (2), Gregg remettait en doute l'hypothèse des zones ischémiques et soulignait que dans différentes préparations utilisées, le débit coronarien basal est bien au-dessus de la demande métabolique, alors que durant les augmentations de Pp coronarienne, la MVO_2 pouvait augmenter de 200% à 300%, ce qui correspond à un ordre de grandeur supérieur à n'importe quel changement en O_2 attribuable à une dette en oxygène.

Scharf et coll. (1973) ont rapporté une amélioration de la performance cardiaque lorsque le flot sanguin ou la pression du sinus coronarien était augmenté (10). Ces manœuvres étaient accompagnées d'une augmentation du volume vasculaire coronarien (mesurée par changement de poids). Selon Bai et coll. (1994), l'augmentation du volume sanguin

coronarien serait impliquée dans l'élévation de la MVO_2 observée suite à une augmentation du B coronarien (11). Cette élévation produirait dans le cœur un 'squelette hydraulique coronarien' plus rigide, demandant ainsi une plus grande dépense en énergie pour la déformation de la paroi lors de la systole. En mesurant la rigidité ventriculaire par la relation force-longueur (la longueur des fibres étant mesurée par des cristaux piezoélectriques), Iwamoto et coll. (1994) ont observé une augmentation de la rigidité ventriculaire lorsque le B coronarien et la pression étaient augmentés. Alors que la force systolique et la MVO_2 étaient modifiées conformément à l'effet Gregg, aucun effet sur la longueur des fibres en systole et diastole n'a été observé (12). Ils conclurent que les changements de contractilité et de rigidité ventriculaire étaient responsables des changements de MVO_2 observés. L'équipe de May-Newman (1994) ont obtenu des résultats similaires dans des cœurs isolés de chiens mais spécifièrent, puisque les micro-vaisseaux du myocarde sont essentiellement orientés de façon parallèle aux fibres musculaires, que l'augmentation de la rigidité ventriculaire se produit dans une direction transverse aux vaisseaux (13).

La mise en évidence du rôle physiologique de l'endothélium par Furchgott (14), au début des années 80, ouvrira de nouvelles possibilités à l'explication de l'effet Gregg. En 1988, une équipe montre que la suppression de l'endothélium endocardique d'un muscle papillaire isolé entraîne la diminution de la contractilité et du temps de relaxation, établissant que l'endothélium endocardique influence aussi la performance contractile myocardique (15). Li et coll. (1993) ont montré que la force de contraction diminuait aussi dans les muscles papillaires exempts d'endothélium vasculaire et que cet effet était additif à la suppression de l'endothélium endocardique (16). Deux études vont plus loin et montrent que la contractilité myocardique est affectée par un facteur (upregulating) dérivé de l'endothélium, qui est sensible à la pression veineuse en O_2 , et par un facteur (downregulating) dérivé de l'endothélium, qui est sensible à une baisse de B coronarien (17,18). Il est suggéré que l'effet combiné de ces deux facteurs (qui ne seraient ni le NO, ni l'endothéline) produirait un mécanisme régulateur qui répondrait aux changements de PO_2 et de flot coronarien. Dijkman et coll. (1997) ont montré dans des muscles papillaires de rat recevant l'effluence veineuse coronarienne d'un cœur perfusé isolé, que

des facteurs sont relâchés dans la circulation coronarienne mais que leur effet est indépendant de la magnitude de la perfusion coronarienne (19).

En 1996, Dijkman et coll. proposent que les deux aspects du phénomène de Gregg soient basés sur des mécanismes différents (20). La contractilité serait étroitement liée à la pression artérielle ou aux contraintes circonférentielles ($\text{Pression} \times \text{rayon}$), alors que la consommation d' O_2 (VO_2) dépendrait du flot coronarien.

1.1.2. Les dernières découvertes : Origine du phénomène et nouveau modèle d'analyse

Principalement, l'effet Gregg est observé dans des préparations de cœurs isovolumétriques et non-travaillants et l'augmentation de pression coronarienne ne permet pas de causer un raccourcissement ou un épaissement segmental dans le cœur intact et travaillant (21-23). Dans son éditorial, Gregg est déjà conscient de ce phénomène et fait la remarque suivante : « Alors, l'utilisation d' O_2 dans le cœur non-travaillant [...] serait dépendante de la pression ou du flot coronarien, alors que dans le cœur travaillant cette relation est variable » (2). De telles observations ont amené Miller et coll. à proposer que le phénomène de Gregg soit, en partie, modèle-dépendant, évident seulement dans un cœur non-travaillant (23). En effet, les changements habituellement observés suite à une modification de la Pp, tel l'augmentation du volume sanguin coronarien, sont accentués en présence d'une mauvaise autorégulation coronarienne (11,12,21). En modifiant le diamètre des coronaires, les systèmes d'autorégulation permettent de maintenir un B coronarien constant lorsque la Pp coronarienne, et donc la pression transmurale (tension exercée sur la paroi vasculaire, σ), sont augmentées. Une bonne autorégulation protège les capillaires et les veinules post-capillaires des changements de pression transmurale (24,25) et de contraintes circonférentielles, suggérant que le phénomène Gregg trouve son origine dans la perfusion des capillaires. En anglais, le terme 'shear stress' fait plus souvent référence à σ (σ : Pr, P : pression, r : rayon) qu'aux forces de cisaillements, qui sont liées à la vitesse d'écoulement. En 1996,

Dijkman et coll. montrent que le phénomène de Gregg est toujours présent lorsque l'endothélium artériel et artériolaire est rendu dysfonctionnel par le Triton X-100, rendant les forces pariétales (voir discussion) un facteur improbable à ces dimensions coronariennes (26). L'année suivante, l'équipe de Dijkman montre, dans des préparations de muscle papillaire perfusé et par l'utilisation de microsphères permettant de bloquer la circulation capillaire, que l'aspect contractile de l'effet Gregg est lié à la perfusion capillaire (27).

Dankelman et coll. seront les premiers à proposer un modèle expérimental permettant de discriminer l'effet Gregg des systèmes de contrôle métabolique dans un système *in vivo* intact (28,29). Leur modèle d'analyse (basé principalement sur l'utilisation du glibenclamide afin de ralentir la vitesse de réponse des mécanismes de contrôle du B coronarien) prédit que la réponse dynamique du ratio pression-débit, suivant un changement de la Pp, dépend de la sensibilité de la résistance artérielle (Ra) à un changement de PO₂ tissulaire et à la sensibilité de MVO₂ à un changement de pression capillaire. L'autorégulation coronarienne serait donc en constante compétition avec le phénomène de Gregg dans le cœur *in situ*. Si l'adaptation de la résistance artériolaire à une augmentation de Pp peut être considérée comme un système à feedback négatif (29), l'adaptation à l'augmentation de MVO₂ a la caractéristique d'une adaptation à feedback positif. La façon dont le système de régulation réagira à l'effet combiné de ces deux déterminants dépendra des dynamiques et des forces relatives de chaque mécanisme. Dans un cœur physiologique normal, ce système de régulation jouera un rôle important dans le contrôle des forces qui agissent sur la paroi vasculaire. Le tableau I montre les effets de chaque système sur les forces pariétales vasculaires en réponse à une augmentation de la pression diastolique dans un cœur intact.

Tableau I. Effets des systèmes de régulation métabolique en réponse à une augmentation de pression diastolique

Systèmes de régulation métabolique	Forces pariétales Forces de cisaillements ($v = Q/r$) Forces circonférentielles ($\sigma = Pr$)
Autorégulation (Tonus coronarien)	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilise σ (r diminue et s'oppose à P) - Augmente v (r diminue et Q reste stable)
Contrôle métabolique (Effet Gregg)	<ul style="list-style-type: none"> - Augmente σ (r augmente et P reste stable) - Stabilise v (r augmente et s'oppose à Q)

Puisque la relation entre le remplissage vasculaire et la consommation en O_2 existe aussi lorsque les mécanismes d'autorégulation sont présents, nous devons en conclure que même dans des conditions normales (à l'intérieur des intervalles d'autorégulation), une partie de la consommation en O_2 doit être dépendante du remplissage capillaire. Ces expériences démontrent que l'effet Gregg ne devrait pas être vu comme un simple artéfact expérimental mais comme un facteur important du contrôle métabolique cardiaque.

La compréhension des liens qui existent entre les forces mécaniques, les mécanismes de contrôles métaboliques et l'autorégulation coronarienne nous permettra d'approfondir nos connaissances dans divers domaines de cardiologie où ces mécanismes sont directement impliqués. Par exemple, les dynamiques des réponses de chaque système seraient d'importance dans l'hyperhémie réactive. Kanatsuka et coll. (1992), par l'utilisation d'un microscope à objectif flottant, ont montré que la dilatation des vaisseaux et la réponse

hyperhémique étaient diminuées avec le glibenclamide (un bloqueur non-sélectif des canaux K^+ dépendant de l'ATP) (30). La faible dilatation observée pendant l'occlusion et la réponse hyperhémique peuvent toutes deux être expliquées par la lenteur de la réponse régulatrice en présence de glibenclamide. De plus, le modèle de Dankelman prédit que la vitesse de régulation dans un système de perfusion à débit constant est plus lente que dans un système à pression constante (29). Et dans l'une des premières études avec le glibenclamide, Daut et coll. (1990) ont montré que la réponse hyperhémique disparaissait avec le glibenclamide dans ce type de modèle (31).

Finalement, le phénomène de Gregg pourrait s'appliquer à certaines situations pathologiques où les mécanismes d'autorégulation sont défectueux, par exemple dans les cas de greffe cardiaque.

1.1.3. Effets de la perfusion sur la relaxation myocardique

Les résultats obtenus dans ces études qui s'intéressent aux effets de la perfusion coronarienne sur la relaxation myocardique ne sont pas sans rappeler les incertitudes qui entourent le phénomène de Gregg. En dépit du fait qu'il existe moins d'études sur le sujet, les résultats démontrent qu'une augmentation de la perfusion entraîne des dysfonctions dans les propriétés diastoliques du myocarde. Essentiellement, ces changements sont aussi observés dans des préparations de cœur présentant une mauvaise autorégulation, laissant croire que le mécanisme en cause (augmentation du volume coronarien) serait le même que dans l'effet Gregg.

Théoriquement, des altérations de la relaxation du ventricule gauche peuvent être secondaires à une lusitropie intrinsèque (dépendant de la recapture calcique et de la sensibilité des myofilaments), à une altération des propriétés visqueuses du myocarde (dépendant de la vitesse de remplissage du ventricule), à des changements dans la magnitude, la séquence temporelle ou l'uniformité de la charge systolique, aux contraintes extrinsèques (remplissage du ventricule droit, épicarde) ou aux altérations

dans le volume ou la longueur des fibres myocardiques en fin de systole, qui influencent le degré du contre-coup élastique par le phénomène de Frank-Starling (32-34). Salisbury et coll. (1960) seront les premiers à s'intéresser à la relation existante entre la perfusion coronarienne et la relaxation myocardique (lusitropie) (6). Ils ont observé que la pression ventriculaire gauche en fin de diastole était augmentée lorsque la Pp coronarienne était augmentée. Selon eux, cette augmentation de perfusion entraînerait une élévation du flot et du volume vasculaire coronarien; cet engorgement vasculaire produirait un lit vasculaire plus rigide et, par le fait même, une diminution de la compliance ventriculaire. En 1978, Gaasch et coll. reproduisent ces observations dans des cœurs isolés de chiens (35). Mais tout comme l'avait proposé Miller et coll. dans leur étude sur l'effet Gregg, l'équipe de Gaasch a qualifié, en parlant du système de cœur isolé, ces interventions d'extrêmes et croit que ces changements ne pourraient être observés en situation clinique (36). D'autres études (37,38) reproduiront ces observations sans toutefois apporter de nouvelles explications aux mécanismes sous-jacents de la détérioration diastolique. Inversement, Arnold et coll. ont montré dans des cœurs travaillants de chien qu'une augmentation de la Pp menait à une diminution de la pression ventriculaire gauche en fin de diastole (3).

1.2. LE NO

Depuis la découverte d'un facteur relaxant dérivé de l'endothélium par John Robert Furchgott au début des années 80 (39), plusieurs études se succédèrent afin d'identifier ce qui allait devenir l'une des molécules les plus étudiées dans le monde : le monoxyde d'azote (NO). Le voile fut levé quelques années plus tard alors que deux équipes (Ignarro et coll., 1987; Furchgott *et coll.*, 1987) démasquent la molécule qui, sept ans auparavant, apparaissait à nos yeux suite à une erreur technique (40,41). C'est à partir de 1988, alors que l'équipe de Salvador Moncada publie les preuves formelles de la différence entre EDRF et NO, que ce dernier n'est plus simplement considéré comme un gaz toxique et que l'on commencera à en comprendre ses multiples propriétés biologiques (42) (revue : (43).

1.2.1. Propriétés physico-chimiques du NO

Les propriétés physico-chimiques du NO sont déterminées par sa réactivité chimique. Le NO est un composé radicalaire réactif (NO^\bullet), qui se présente, dans des conditions normales, sous forme de gaz (44). Sa charge nulle le rend en outre soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes cellulaires. À cause de sa nature radicalaire, le NO réagit rapidement avec l'anion superoxyde (O_2^-), le produit de réduction à un électron de l' O_2 , pour former l'ion peroxyde (ONOO^-), aussi appelé radical nitrosoperoxyde, un composé connu pour sa toxicité. Dans le cœur, par exemple, le ONOO^- altère irréversiblement la fonction systolique et diastolique (45). Finalement, en solution aqueuse aérobie, le NO est rapidement oxydé en nitrite (NO_2^-) et nitrate (NO_3^-), des composés solubles dans l'eau.

Dépendant du milieu dans lequel il se trouve et de l'état d'équilibre d'oxydoréduction de ce dernier, le NO peut se comporter en tant qu'agent réducteur ou en tant qu'agent oxydant : le radical NO^\bullet , par la perte ou le gain d'un électron, peut prendre respectivement l'aspect de l'anion nitrosyle (NO^-) ou du cation nitrosonium (NO^+) (46). Cette dernière forme est toutefois fortement électrophile et ne peut exister pendant une longue période de temps; le NO^+ est rapidement hydrolysé en HNO_2 , qui génère à son tour les ions nitrate et nitrite. Il est généralement admis que son temps de demi-vie ne dépasse pas 4 secondes. Le NO est fortement hydrophobe et sa diffusibilité accrue lui permettrait tout de même d'atteindre des cibles situées à plus de huit diamètres cellulaires de sa source de production (47). Il a été déterminé que sa constante de diffusion était approximativement de $3000 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et que sa vitesse d'action ne serait pas gênée par la présence de membranes cellulaires (48). Il peut se lier à des sites de coordination libres dans des complexes métalliques. Ainsi, il est rapidement séquestré en présence d'hémoglobine, la forme désoxygénée présentant une affinité prononcée pour le NO comparé au CO et à l' O_2 . En présence d'oxygène (oxyhémoglobine), il se fixe au Fe (II) pour former la S-nitrosohémoglobine, qui est éventuellement oxydée en méthémoglobine et NO_3^- (43). La S-nitrosohémoglobine a été proposée récemment comme donneur de

NO; elle serait libérée dans la circulation capillaire lors de la désoxygénation de l'hémoglobine (49). Les résultats actuels montrent que le NO libre se lie aussi à l'hémoglobine sur un résidu cystéinyl ($\beta 93$) de surface situé à proximité de l'hème (50). Le NO transporté sous cette forme permettrait la préservation de sa fonction vasodilatatrice et d'oxygénation en présence d'oxygène.

De la même façon, il se lie à l'hème de la guanylate cyclase soluble (GCs), l'une de ses principales cibles physiologiques. C'est par l'activation de cette enzyme que le NO va produire, par la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), la majorité de ses effets physiologiques, les plus connus étant la vasodilatation et l'inactivation plaquettaire (effet anti-agrégant).

Il peut aussi se lier à des complexes Fe-S tels que l'on retrouve dans les mitochondries. En plus de ses nombreux effets sur le métabolisme cellulaire, le NO pourrait agir sur les mitochondries en inhibant la respiration cellulaire par l'augmentation du K_m apparent de la cytochrome C oxydase pour l'oxygène, ce qui expliquerait les résultats obtenus dans différentes préparations cellulaires suivant l'inhibition des NO synthases (NOS), la famille d'enzymes responsable de la synthèse endogène de NO (51).

1.2.2. Synthèse du NO en milieu biologique

Le NO est synthétisé dans les cellules endothéliales par une famille d'enzymes appelées les NO synthases (NOS) (52). En consommant de l' O_2 et du β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH), les NOS oxydent l'un des deux atomes d'azote du groupe guanidine de la L-arginine pour former de la citrulline et du NO. Les diverses isoformes de NOS ne pourraient fonctionner sans la présence de ces quatre co-facteurs : la tétrahydrobioptérine (BH_4), les flavines mononucléotide (FAD) et adénine dinucléotide (FMN), et un hème (protoporphyrine IX de fer).

Trois isoformes de NO synthases ont été clonées et exprimées : NOS-1, NOS-2 et NOS-3. Cette classification découle de leur ordre historique de purification et initialement, on nomma les différentes isoformes de NOS selon leur localisation (NOS-1 ou NOS_n, isoforme 'neuronale', NOS-3 ou NOS_e 'endothéliale') ou selon leur mode d'expression (NOS-2 ou NOS_i 'inductible').

1.2.3. Structure des NO synthases

La partie carboxy-terminale des NOS est fortement similaire au cytochrome P-450 réductase, enzyme catalysant le transfert d'électrons du NADPH à des protéines hémiques telles les cytochrome P-450 (CYP-450), famille d'oxygénases à hème-thiolate. Ce domaine est couramment appelé 'domaine réductase'.

Le domaine amino-terminal responsable de la formation des produits est appelé 'domaine oxygénase'. Même s'il existe certains points communs entre ce domaine et le CYP-450, les NOS sont les premières et, à ce jour, les seules oxygénases à hème-thiolate autosuffisantes (fonctionnant en l'absence d'autres enzymes) chez les mammifères. De plus, contrairement au CYP-450, les NOS sont actives seulement sous forme homodimérique. Les conditions d'assemblage des sous-unités et le type d'interaction (ex. réductase-réductase ou oxygénase-réductase) varient selon l'isoforme. Par exemple, si la présence de l'hème et du BH₄ est essentielle au couplage des domaines oxygénases de la NOS-2 (53), seul l'hème sera nécessaire pour induire la dimérisation des NOS de type 1 et 3, le BH₄ servant à stabiliser le dimère ainsi formé.

1.2.4. Mécanismes des NOS

La formation de NO et de citrulline catalysée par les NOS implique, pour l'atome d'azote concerné dans la L-arginine, un changement de degré d'oxydation de $-III$ à $+II$, soit une oxydation à 5 électrons. Cette étape intermédiaire dans la formation du NO et de la citrulline est maintenant bien connue : la N^0 -hydroxy-L-arginine ou NOHA. La L-arginine interviendrait dans l'activation de $l'O_2$ par transfert de H^+ (la NOHA ne peut intervenir de cette façon) avant d'être monohydroxylée en NOHA. La NOHA va ensuite subir une oxydation à 3 électrons pour former un intermédiaire qui se décomposera en citrulline et NO.

1.2.5. Régulation des NOS

Il est mentionné plus haut que la NOS-2 était autrefois appelée NOSi, 'i' pour inductible, caractéristique de son mode d'expression. Hors, la distinction entre isoformes constitutive et inductible s'étend aussi à la régulation par le couplage au complexe calmoduline (CaM)- Ca^{2+} . La biosynthèse du NO par NOS-1 et NOS-3, les deux isoformes constitutives de la famille, est donc régulée principalement par les niveaux du milieu en ions calcium. En effet, ces isoformes ne sont actives qu'après le couplage de la CaM qui permet aux électrons provenant du NADPH de transiter du domaine réductase au domaine oxygénase (54). Les NOS constitutives sont responsables de la synthèse de faibles quantités de NO et ce, sur un court laps de temps.

En revanche, l'activité des NOS inductibles (NOS-2) ne dépend pas des taux calciques puisque cette isoforme est fortement couplée à la CaM. Produisant du NO de façon continue, la NOS-2 est principalement régulée par activation transcriptionnelle. Les signaux inducteurs sont des cytokines (interféron gamma, TNF-alpha, IL-1, etc.) ou des molécules d'origines bactériennes, les endotoxines (lipopolysaccharides), *via* l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B, en réponse à l'infection (55).

L'expression non contrôlée de ce type de NOS peut mener à la production physiopathologique de grandes quantités de NO. Un excès de NO peut être dommageable pour les cellules, être neurotoxique lors d'accidents cérébro-vasculaires, causer une hypotension sévère lors du choc septique (55), caractérisé par l'invasion microbienne de la circulation systémique, causer plus de dommages lors d'une ischémie-reperfusion et la mort cellulaire en défaillance cardiaque chronique (56).

La régulation de la biosynthèse du NO ne se limite pas au niveau transcriptionnel ou à la concentration du milieu en ions calcium. L'assemblage du dimère des NOS ainsi que leurs substrats et produits (L-arginine et NO), ont eux aussi une place importante au sein des acteurs impliqués dans cette régulation.

Chez la NOS-3, la fixation de la calmoduline induit la dimérisation de son domaine oxygénase (57). La dimérisation des NOS pourrait donc s'ajouter aux divers mécanismes de régulation jusqu'à maintenant répertoriés dans la littérature. De ce fait, un inhibiteur endogène, la protéine inhibitrice de la NOS-1 (PIN) a récemment été mise en évidence (58). Elle agirait en déstabilisant le dimère.

N'étant pas absolues, ces règles contiennent néanmoins quelques exceptions qui méritent ici d'être soulignés. C'est le cas de NOS-2 qui ne serait pas uniquement inductible puisqu'elle est exprimée continuellement dans l'épithélium respiratoire humain (59). À l'inverse, il existe un certain contrôle de l'expression de NOS-3 par les contraintes mécaniques endothéliales, ces différentes forces (forces de cisaillements et tension sur la paroi, discutées dans le chapitre antérieur) qui agissent sur la paroi vasculaire lors d'une augmentation de la pression et/ou du débit sanguin (60).

La quantité de substrat disponible a un impact non négligeable dans la régulation de l'activité des NOS. Une absence de L-arginine entraîne la production d'ions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par transfert d'électrons du NADPH à l' O_2 via l'hème. À l'inverse, la saturation du même substrat provoque une diminution de la vitesse d'oxydation d'un facteur 2 à 3 pour la NOS-1, contre une augmentation d'un facteur 4 à 6

pour la NOS-2. L'apport en substrat semble donc constituer un facteur important dans la régulation de l'activité des NOS. La L-arginine présente pourrait à son tour être régulée par l'enzyme responsable de sa dégradation en urée et ornithine, l'arginase (61). Présente, entre autres, dans les cellules endothéliales, l'arginase pourrait moduler la production de NO. De plus, il s'est avéré que la NOHA (voir plus haut : mécanismes des NOS) se situait parmi les meilleurs inhibiteurs de l'arginase (62). Le NO pourrait lui aussi inhiber les NOS en se fixant, avant de quitter le site actif, à l'atome de fer hémérique du domaine oxygénase.

Finalement, la formation de NO peut être inhibée de façon compétitive par des analogues stéréospécifiques de la L-arginine retrouvés naturellement dans la circulation sanguine humaine : la N^G-mono méthyl-L-arginine (L-NMMA), la N^G-diméthylarginine (diméthylarginine asymétrique, ADMA) et la N^G- diméthylarginine (diméthylarginine symétrique, SDMA). En 1998, une équipe montre que l'ADMA pourrait contribuer à l'augmentation de la résistance vasculaire observée dans la défaillance cardiaque congestive suivant un infarctus du myocarde chez le rat, contribuant ainsi aux symptômes et à la grande mortalité associés à cette maladie (63).

En laboratoire, des inhibiteurs synthétiques tels la N^G-nitro L-arginine-méthylester (L-NAME) ou la N-nitro-L-arginine (L-NNA) sont utilisés couramment. Une étude par radio-ligand suggère toutefois la possibilité que certains 'esters alkyles' de la L-arginine, comme le L-NAME, puissent être des antagonistes des récepteurs muscariniques en plus de leur habileté à bloquer la relâche de NO (64). De plus, parce qu'ils n'agissent que sur le domaine oxygénase, les inhibiteurs compétitifs utilisés *in vivo* peuvent mener à un découplage, résultant ainsi en la production de O₂⁻ et de peroxyde d'hydrogène. En effet, comme la L-arginine accélère le transfert d'électrons du domaine réductase à l'hème, toute molécule pénétrant le site actif de l'enzyme est susceptible de produire, mais sans subir de transformation, le même effet (65).

1.2.6. NOS-3 : localisation dans le cœur

Cette isoforme originalement caractérisée dans l'endothélium de gros vaisseaux est maintenant connue pour être exprimée dans le cœur; dans l'endothélium endocardique et épicaudique, dans les coronaires (incluant les capillaires et les veinules), dans la microcirculation des muscles auriculaires, dans les cardiomyocytes, et également, dans les tissus de conduction cardiaque spécialisés (incluant les nœuds auriculoventriculaire et sinusal (66-69).

Suite à quelques études (70) non-spécifiques suggérant la présence de cette isoforme dans des myocytes isolés de ventricules de rats, Balligand et coll. ont rapporté une vaste caractérisation de l'activité des NOS dans les myocytes ventriculaires, documentant l'absence des 'transcripts' NOS-1 et NOS-2, dans des myocytes isolés, par RT-PCR, utilisant des amplimères isoforme spécifique et confirmant la présence de NOS-3, *in vivo* et *in vitro*, dans ces cellules par immunohistochimie avec des anticorps NOS-3-spécifique (66). De plus, la majorité de l'activité enzymatique NOS-3 a été trouvée dans une fraction sub-cellulaire particulée (cavéole-1) (71), suggérant la présence des NOS constitutives à ce niveau, une caractéristique unique parmi les autres isoformes. La structure et la fonction des cavéoles pourraient être modulées par le cytosquelette cellulaire, fournissant un mécanisme de réponse à un stimulus mécanique. La NOS-3 pourrait être directement activée suite à un signal d'étirement pendant le cycle cardiaque, et ce, tant dans les cellules endothéliales que dans les cardiomyocytes (72).

1.2.7. NOS-3 et relation force-fréquence

Relation force-fréquence : Augmentation de la force de contraction myocardique suivant une augmentation de la fréquence cardiaque. Cette relation est affectée dans la cardiomyopathie (relation force-fréquence négative), tel que démontré dans notre modèle expérimental (73).

Depuis qu'il est connu que les cardiomyocytes contiennent une isoforme de NOS sensible au complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et exprimée de façon constitutive, plusieurs groupes se sont penchés sur le rôle des changements de l'activité du Ca^{2+} intracellulaire lors de modifications de la fréquence sur la génération de NO dans des muscles papillaires isolés ou dans des préparations de myocytes cardiaques. Finkel et coll. ont été les premiers à rapporter que le L-NMMA renversait la relation force-fréquence négative observée dans une préparation de muscle papillaire de hamster (74). En effet, le L-NMMA menait à une tension développée plus grande lorsque la fréquence variait de 1 à 5 hertz (batt./sec.) et ce, à chacune des fréquences au-delà de 1 Hz. Cet effet était mimé par le bleu de méthylène, un inhibiteur de la guanylate cyclase soluble, et inhibé par le nitroprussiate de sodium (SNP). Kaye et coll. ont aussi montré que l'activation de la NOS-3, par augmentation de la fréquence dans des myocytes isolés de rats stimulés électriquement, menait à une diminution de l'amplitude positive de la réponse contraction-fréquence dans ces cellules (75).

1.2.8. NO et Vasodilatation

1.2.8.1. Rôle du NO dans le tonus périphérique

L'infusion intraveineuse d'inhibiteurs de NOS cause une augmentation de la résistance vasculaire systémique (et une élévation concomitante de la pression artérielle et de la

postcharge), suggérant que la relâche tonique de NO joue un rôle important dans la modulation du tonus vasculaire basal de la circulation périphérique (76).

1.2.8.2. Relaxation du muscle lisse vasculaire : mécanismes impliqués

Malgré la compréhension grandissante des mécanismes par lesquels le NO est relâché de l'endothélium, ceux par lesquels il relaxe le muscle lisse vasculaire ne sont pas encore complètement élucidés. C'est essentiellement par sa participation dans la régulation des concentrations calciques cytoplasmiques du muscle lisse, le déterminant primaire du tonus contractile vasculaire, que le NO produira ses effets vasodilatateurs. Dans le muscle lisse vasculaire, le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ entraîne l'activation de la kinase des chaînes légères régulatrices de la myosine (KCLM), qui a son tour conduit à la contraction musculaire par phosphorylation de la myosine (77). Par l'intermédiaire du GMPc, le NO peut également mener à une relaxation du muscle lisse vasculaire en activant la phosphatase des chaînes légères de la myosine (PCLM), conduisant ainsi au découplage du complexe acto-myosine (78).

Plusieurs mécanismes ont été proposés dont l'inhibition de l'influx calcique par les canaux de type L ($\text{I}_{\text{Ca-L}}$), incluant leur inhibition par des mécanismes dépendants du GMPc (79), par l'hyperpolarisation membranaire due à des effets directs (80) ou indirects, par le biais du GMPc (81), sur l'activation des canaux K^+ dépendant du Ca^{2+} ($\text{I}_{\text{Ca-K}}$) et par une augmentation de l'extrusion calcique cytoplasmique en accélérant les pompes ATPase (82) ou l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (83) de la membrane plasmique. Enfin, l'implication de l'ATPase du réticulum sarco(endo)plasmique (SERCA), qui, par un mécanisme impliquant la phosphorylation de la protéine régulatrice phospholambane, peut être accéléré, est fortement suggérée (84).

Dans les vaisseaux comme dans le cœur, la phospholambane déphosphorylée est étroitement associée au SERCA et agit en tant qu'inhibiteur de la pompe calcique (85). Des études antérieures *in vitro* (86) ont démontré que la PKG pouvait phosphoryler la

phospholambane aux mêmes site et taux que la PKA. Cette action fut ensuite confirmée dans des préparations *ex vivo* d'anneaux vasculaires isolés (85,87). Des études faites sur des fractions particulées ou des cellules intactes de muscles lisses vasculaires ont aussi procuré des évidences que la phospholambane est phosphorylée en présence de SNP (88). De plus, l'association de la PKG à la membrane, près de la phospholambane (89), renforce son implication dans la régulation du contrôle du tonus vasculaire orchestrée par le NO.

Une étude récente et complète propose un nouveau mécanisme par lequel le NO est capable de maintenir une relaxation sur une longue période de temps suivant l'activation par un agoniste (90). En plus de ses effets sur les canaux K^+_{Ca} et, directement ou indirectement, sur les canaux Ca^{2+} de type L (, les auteurs proposent un mécanisme impliquant des canaux Ca^{2+} dépendants des réserves calciques (SOC : 'store-operated channel') du SERCA. Donc, indirectement, par un effet activateur sur le SERCA impliquant la dissociation de la phospholambane par la PKG, le NO pourrait maintenir une relaxation en dépit de variations dans l'activité de la PKG. En effet, les effets du NO sur les concentrations calciques du muscle lisse vasculaire et sur la relaxation persistent malgré l'inhibition subséquente du GMPc et de sa kinase associée (91) (voir figure 1, p.36).

1.3. Le NO et ses effets cardiaques

La littérature portant sur les effets cardiaques du NO est vaste, diversifiée et abonde d'une multitude d'ouvrages aux résultats discordants et contradictoires. Comme nous le verrons plus tard, cette disparité des résultats peut être expliquée, entre autres, par la relation existante entre le NO ou son principal second messenger, le GMPc, et l'AMPc : l'effet du 'yin yang' (revue : (92)

Ce chapitre est divisé en trois sections : les études *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*, permettant ainsi de débiter par un aperçu global des effets systémiques et cardiaques du NO

(principalement en conditions pathologiques) et de poursuivre en focalisant graduellement sur ses effets directs sur le myocarde, avec une emphase particulière sur la relaxation. Aussi, les études *in vivo* n'incluent pas les préparations de cœur travaillant (cœur éjectant) dans lesquelles certains paramètres sont maintenus constants (ex. précharge et postcharge) : Elles se retrouvent plutôt dans la section *ex vivo*. Finalement, la dernière section fait état de certaines études *ex vivo* ou *in vivo*; essentiellement, les idées traitées dans une grande proportion d'études *in vitro* découlent de résultats originalement obtenus dans des cœurs intacts ou isolés (voir figure 1, p.36).

1.3.1. Les vasodilatateurs et donneurs de NO : études *in vivo*

La fonction cardiaque est affectée par quatre déterminants majeurs : la précharge, la postcharge, la fréquence et la contractilité. Dans la défaillance cardiaque aiguë, la diminution du débit cardiaque est compensée par une augmentation de la postcharge et de la fréquence cardiaque. Dans la défaillance cardiaque chronique, ce mécanisme mène rapidement à un cercle vicieux : augmentation de la précharge et de la postcharge et altération du débit cardiaque. Si l'impédance de l'éjection ventriculaire gauche est réduite par vasodilatation, le cercle est interrompu (93,94). Les mécanismes par lesquels les vasodilatateurs produisent une réponse bénéfique incluent la diminution de la postcharge (principalement par dilatation artériolaire), la réduction de la précharge par vénodilatation (déplacement du volume sanguin vers le compartiment veineux) et l'accentuation de la compliance diastolique ventriculaire gauche (94).

La question est de savoir comment atteindre une augmentation efficace du débit cardiaque à un coût moindre pour le cœur (efficacité myocardique). Une façon de mesurer ce coût est la MVO_2 , qui démontre une bonne corrélation avec le double produit cardiaque (pression systolique x fréquence) (95).

Sans même en comprendre son principal mécanisme d'action, le SNP a été employé dans le traitement de l'hypertension pendant de nombreuses années (96), son application

thérapeutique s'est ensuite étendue entre autres à l'infarctus du myocarde aigu (97), à la régurgitation mitrale (98) et aortique (99), et à la défaillance cardiaque chronique (100). Aujourd'hui, avec l'amélioration de nos connaissances et, conséquemment, l'avènement de médicaments plus efficaces, l'utilisation clinique du SNP, bien qu'encore utilisé comme support thérapeutique dans certains cas sévères de défaillance cardiaque (101), se limite principalement à des situations de crises hypertensives ou au contrôle de l'hypertension lors d'une chirurgie. Toutefois, étant un prototype de nitrovasodilatateur, le SNP est largement utilisé en laboratoire.

La majorité des études portant sur les effets *in vivo* du NO ont rapporté une baisse de la pression de remplissage du ventricule gauche. Initialement, on attribua cette baisse de pression à un volume ventriculaire plus petit suivant une réduction de la postcharge (permettant une meilleure éjection systolique) et de la précharge. En 1977, Brodie et coll. montrent que la réduction du volume diastolique n'est pas le seul déterminant de la chute de pression ventriculaire attribuable à l'utilisation du SNP chez des patients souffrants de défaillance cardiaque chronique (ces interventions étaient accompagnées d'une diminution de la pression artérielle moyenne mais d'aucun changement de fréquence cardiaque, des vitesses de contraction et de relaxation ($+dP/dt_{max}$ et $-dP/dt_{max}$) ou du débit cardiaque) (102). En mesurant un déplacement vers le bas de la courbe pression diastolique-volume (déterminant des propriétés diastoliques du cœur et utilisée comme marqueur de la rigidité de la paroi ventriculaire), les auteurs ont montré que d'autres facteurs, tels une altération des propriétés viscoélastiques ou des contraintes externes, un effet direct du NO sur le myocarde, une interaction avec le système nerveux sympathique ou une diminution de la rigidité de la paroi ventriculaire, devaient expliquer la baisse de pression observée.

La résistance opposée par le cœur lors du remplissage ventriculaire n'est pas seulement fonction de l'allongement des fibres cardiaques mais aussi de la vitesse à laquelle se produit cet allongement. De ce fait, un remplissage lent n'entraîne pas d'augmentation de pression ventriculaire majeure alors que l'augmentation de pression est plus importante si le volume sanguin s'accroît rapidement. On parle alors d'entrave visqueuse. Gaasch et

coll. (103) ont trouvé que la courbe pression-volume diastolique déviait de la courbe exponentielle 'idéale' pendant les périodes de remplissage rapide en début de diastole et au moment de la contraction auriculaire, et conclurent que les entraves visqueuses étaient importantes pendant ces périodes. Dans l'étude de Brodie, la vitesse de remplissage était diminuée pendant le premier tiers du temps de diastole, ce qui pourrait expliquer, en partie, les résultats observés.

De façon plus importante, l'effet du SNP sur la relation pression diastolique-volume pourrait être expliqué par une altération des contraintes extrinsèques qui agissent sur le ventricule gauche. Ces contraintes incluent le péricarde, le ventricule droit, la pression pleurale, la pression aortique et les artères coronaires.

Le péricarde n'offre probablement pas de résistance en condition normale mais pourrait être capable d'exercer une certaine restriction lorsque le cœur est distendu à de large volume (104). Parce que le degré de restriction du péricarde et de son influence sur la pression ventriculaire gauche est exclusivement fonction du volume ventriculaire gauche et que le SNP entraîne une diminution de volume, une influence du péricarde ne devrait pas affecter la courbe pression diastolique-volume. L'influence du remplissage ventriculaire droit sur le ventricule gauche a été observée dans différentes études (105,106), montrant qu'une élévation des pressions de remplissage droit pouvait causer un déplacement vers le haut de la courbe pression-volume diastolique.

Au même moment que Brodie et coll., Ludbrook et coll. (1977) publieront une étude sur la relation pression diastolique-volume chez l'homme mais en utilisant la nitroglycérine (NTG) comme donneur de NO (107). Ils ont obtenu des résultats similaires à ceux de Brodie et coll. mais ont remarqué que la courbe, bien que déplacée vers le bas et la gauche, ne subissait aucun changement de pente, suggérant que le déplacement de la courbe soit gouverné indirectement par une diminution des contraintes affectant la distension ventriculaire. En 1983, Paulus et coll. comparent les effets relaxants du SNP et de la nifédipine (un bloqueur des canaux Ca^{2+} de type L) chez des patients cardiomyopathiques et rapportent une diminution similaire des pressions ventriculaires

gauche en fin de diastole avec les deux médicaments (92). Toutefois, cette diminution était accompagnée d'une réduction du volume de la chambre ventriculaire gauche seulement avec le SNP, probablement due à ses effets sur le compartiment veineux.

Dans une autre étude, Crystal et coll. (1996) ont mesuré, chez le chien, les effets directs du NO sur la contractilité et la MVO_2 (108). Ils ont aussi évalué les effets d'une production basale de NO sur les mêmes paramètres en utilisant des analogues de la L-arginine (L-NAME et L-NMMA). À pression constante, une infusion de SNP dans l'artère coronaire interventriculaire antérieure menait à une augmentation de débit de 177% sans changement de la MVO_2 , mesurée par le produit du B et de la différence artério-veineuse en O_2) ou la contractilité (mesuré par raccourcissement segmentaire, SS : 'segmental shortening'). Le L-NAME et le L-NMMA n'affectaient pas le SS, la MVO_2 ou le B coronarien. Aussi, les auteurs ont affirmé qu'une augmentation de SS suivant une augmentation de B (effet Gregg?) n'obscurcissait pas un possible effet inotrope négatif par le SNP à pression constante. Il est important de noter qu'une importante fraction des auteurs qui se sont intéressés à l'effet Gregg ne considérait pas nécessairement le raccourcissement segmental comme un index de contractilité mais aussi comme un facteur ('garden hose effect') pouvant expliquer les augmentations de contractilité (mesurée principalement par la pression développée du ventricule gauche, PVG) et de MVO_2 associées à une augmentation de perfusion coronarienne (voir chapitre 1.1.). La plupart de ces études ont montré que le SS ne pouvait expliquer l'augmentation de contractilité associée à l'effet Gregg. En contraste aux résultats de Crystal et coll., Sherman et coll. (1997) ont montré dans le même modèle animal que le blocage de la synthèse du NO par le L-NAME entraînait une diminution de la MVO_2 et de SS (109). De plus, les résultats obtenus dans cette étude n'impliquaient pas la participation des récepteurs β -adrénergiques.

Dans une autre étude plus récente faite chez des patients présentant une cardiomyopathie dilatée, les auteurs ont montré que le SNP améliorait la relaxation du ventricule gauche; cet effet était attribué à une altération du remplissage et à une amélioration dans la non uniformité de la relaxation (110). Peu après, une étude de Guo et coll. (1995) attribue au

GMPc un effet inotrope négatif chez le chien normal et hypertrophique (111). Ils ont démontré, par l'infusion de bleu de méthylène (inhibiteur de la forme soluble de guanylate cyclase) dans l'artère coronaire gauche descendante, que le travail myocardique régional (mesuré par l'air sous la courbe de la relation force-longueur) était augmenté sans que le flot coronarien, la fréquence cardiaque, la PVG, le dP/dt_{max} , la pression systémique ou la MVO_2 ne soit modifiés. Cette diminution des taux de GMPc (mesurés par radioimmunoessai) était associée à une amélioration de l'efficacité myocardique, telle qu'obtenue par le quotient du travail myocardique sur la MVO_2 . En addition, dans une étude antérieure, les auteurs ont noté que le SNP pouvait produire un effet inotrope négatif, accompagné d'une augmentation modérée des taux cellulaires de GMPc (112).

Dans une étude faite auprès de quarante patients atteints de défaillance cardiaque sévère, Capomolla et coll. (1997) ont exploré davantage les effets du nitroprussiate sur le remplissage diastolique et la fonction auriculaire (101). Ils ont rapporté une amélioration du débit cardiaque avec une réduction concomitante des résistances systémique et pulmonaire et des pressions de remplissage ventriculaire gauche et auriculaire droite. Selon eux, l'amélioration du débit cardiaque était fortement liée à l'augmentation du volume d'éjection auriculaire (par réduction de la régurgitation mitrale), démontrant l'importance de la restauration des réserves diastoliques associée à l'amélioration de la contribution auriculaire. La baisse de la pression de remplissage ventriculaire gauche (36%), associée à une diminution de la rigidité de la chambre ventriculaire gauche (22%), était expliquée par la diminution de la régurgitation mitrale et de la rigidité auriculaire gauche (38%) en fin de diastole.

Afin de démontrer un rôle au NO dans les processus de régulation métabolique, Kal et coll. (2000) ont montré, chez des patients présentant une maladie des artères coronaires, qu'une administration de NTG à forte dose ($2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) annulait l'augmentation de la MVO_2 induite par la stimulation électrique du cœur et pourrait augmenter la vasodilatation coronarienne métabolique chez ceux-ci (113).

1.3.2. Les cœurs isolés et perfusés : études *ex vivo*

La préparation de cœur isolé a la caractéristique principale de permettre l'étude du cœur indépendamment des influences neuro-hormonales ou des pressions de remplissage des ventricules et oreillettes et de permettre le contrôle de la précharge et de la postcharge. Un tel système de perfusion semble être une étape essentielle à la compréhension des effets diastoliques du NO, particulièrement lorsque son influence sur les pressions de remplissage est proposée comme étant l'un des principaux mécanismes pouvant expliquer les effets bénéfiques observés *in vivo*.

Afin de mesurer les effets d'une inhibition de la NOS sur les fonctions basales du myocarde, une équipe a montré, dans des cœurs de rat, que le L-NMMA (500 $\mu\text{mol/L}$) réduisait substantiellement le débit cardiaque de base, un effet attribué à l'ischémie myocardique puisque le B s'en trouvait largement affecté (~40%) (114). Dans des cœurs travaillants (cœurs éjectants, perfusés par la veine pulmonaire de l'oreillette gauche) de cochon d'Inde stimulés électriquement (postcharge et précharge constante), Prendergast et coll. (1997) ont mesuré l'effet du L-NMMA (10 $\mu\text{mol/L}$) sur l'augmentation du débit cardiaque, de la pression ventriculaire gauche en fin de diastole (PDVG) et de la PVG suivant une augmentation de la pression de remplissage gauche (augmentation de la précharge de 10 à 20 cm H₂O) (115). Peut-être dû à la différence des concentrations utilisées, aucun effet de L-NMMA sur les niveaux de base du débit cardiaque n'a été observé dans cette étude. Toutefois, l'augmentation du débit cardiaque induite par l'augmentation de la précharge était atténuée en présence de L-NMMA, suggérant une influence de la production basale de NO dans la réponse de Frank-Starling sur le cœur. Une autre étude a rapporté des effets similaires dans des cœurs de cochon perfusés à pression constante et traités au L-NAME (10⁻⁴M) (116).

La réponse de Frank-Starling, c'est-à-dire, une augmentation de la performance cardiaque en réponse à une augmentation de la longueur des fibres en fin de diastole, contribue à la régulation du débit cardiaque *in vivo*, interagissant avec différents mécanismes tels la fréquence cardiaque, le système neuro-hormonal, le B coronarien et le remplissage

cardiaque (117). Plusieurs évidences impliquent une augmentation dans la réponse des myofilaments au Ca^{2+} comme étant le mécanisme majeur responsable de l'augmentation initiale de la contraction cardiaque induite par l'étirement des fibres (118,119). Au niveau de l'organe, les propriétés diastoliques ventriculaires influenceront le degré de manifestation de la réponse de Frank-Starling.

Utilisant le même modèle expérimental que Prendergast et coll., Grocott-Mason et coll. (1994) ont proposé un nouveau mécanisme par lequel le NO pourrait moduler les propriétés diastoliques du cœur (120). Ils ont montré que le SNP (10^{-7} - 10^{-5} M) augmentait la vitesse de relaxation et causait un déclin prématuré du début de la relaxation, mais sans modifier le tonus diastolique, la pression systolique ou la vitesse de contraction. Afin de distinguer les effets réels du SNP sur le myocarde de ses effets soit mécanique ou métabolique, les auteurs ont utilisé la nicardipine (un vasodilatateur indépendant du GMPc; un bloqueur des canaux Ca^{2+} -L aux effets cardiaques quasi-inexistants), qui ne présentait aucun effet sur la vitesse de relaxation dans ce modèle expérimental.

En parallèle avec les expériences *in vivo* de Guo et coll. (1996) (111) qui attribuaient au GMPc un effet inotrope négatif, Kamelgard et coll. (1995) ont montré que le SNP (10^{-5} M) se comportait comme un agent inotrope positif dans le cœur de rat perfusé par la méthode de Langendorff (121). Le SNP entraînait une augmentation du B coronarien de l'ordre de 97%; les augmentations de la PVG (18%) et de la MVO_2 (49%) entraînaient une baisse de 21% de l'efficacité myocardique (ici, calculée par le quotient de la PVG sur la MVO_2). La contractilité et la compliance cardiaque, mesurées par les vitesses de contraction (+dP/dt) et de relaxation (-dP/dt) étaient aussi augmentées de 17% et 16%, respectivement, sans changement de PDVG. L'analyse conjointe de ces deux ouvrages doit être faite avec une certaine prudence : dans l'étude de Guo et coll., l'effet inotrope positif associé à la baisse des taux de GMPc n'était accompagné d'aucun changement de PVG ou de +dP/dt, les deux déterminants de la contractilité utilisés dans l'étude de Kamelgard et coll. Bien que ces différences puissent s'expliquer par le choix du modèle

expérimental (*ex vivo* vs *in vivo*), cet exemple illustre bien l'absence de consensus associée à l'utilisation des termes 'inotrope' ou 'contractilité' dans la littérature.

Finalement, l'interaction entre le système nerveux sympathique et le NO n'est plus à démontrer dans le cœur. Schwarz et coll. ont rapporté que la production basale de NO, largement dérivée de la NOS-1 des neurones intra cardiaques, et le NO de provenance pharmacologique, diminuaient la relâche de norépinéphrine dans les cœurs de rat lors d'une stimulation électrique des nerfs sympathiques (122). Weiss et coll. (1997) ont mesuré chez le rat les effets du SNP (10^{-6} - 10^{-5} M) sur la fonction cardiaque, la MVO_2 , les taux de GMPc et d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) en présence ou non d'isoprotérénol (ISO, 10^{-8} M) (123). Dans cette étude, le SNP seul ou en présence d'ISO augmentait les taux de GMPc (4 à 30 pmol/g) sans modifier ceux de l'AMPc. De plus, le SNP affectait la contractilité (-25 ± 4 mm Hg) mais seulement en présence d'ISO; cet effet inotrope négatif n'était pas altéré par un inhibiteur de la guanylate cyclase (LY83583), suggérant la participation d'un mécanisme indépendant du GMPc et de l'AMPc. En contraste, De Mulder et coll. (1998) ont montré dans des cœurs travaillants de lapins que le SNP pouvait augmenter la fonction systolique lorsque infusé en présence de dobutamine (124).

1.3.3. Les cardiomyocytes isolés : études *in vitro*

L'utilisation de ce type de préparation a pour but d'éliminer la plupart des facteurs qui peuvent cacher ou accentuer un éventuel effet direct du NO sur le muscle cardiaque. À cet effet, les mécanismes observés sont principalement d'origine intracellulaire ou sont liés aux changements de perfusion, quoi que dans certaines préparations, l'accessibilité à l'oxygène par le muscle est indépendante de la perfusion coronarienne et permet l'élimination des facteurs mécaniques qui y sont rattachés.

L'intérêt pour l'effet contractile du GMPc a débuté lorsque George et coll. (1970) ont montré que les taux de GMPc étaient augmentés dans des préparations cardiaques traitées

avec des concentrations d'agonistes muscariniques connues pour causer un effet inotrope négatif (125). En 1975, Goldberg et coll. s'appuient sur ces résultats et proposent, pour la première fois, l'idée du yin yang : le combat GMPc/AMPc (126). Dans une étude (Diamond et coll.,1977) où l'on tentait de faire un lien entre les taux de GMPc et la contractilité, une augmentation marquée de GMPc (17 fois) par le SNP n'était accompagnée d'aucun effet inotrope négatif (127). Une autre équipe va plus loin en mesurant l'activité d'une kinase activée par le GMPc, la protéine kinase G (PKG), proposée comme étant l'enzyme responsable des effets contractiles observés (128). Ils ont montré que des concentrations d'acétylcholine (ACh) qui diminuaient la contractilité myocardique augmentaient les taux de GMPc et activaient la PKG, alors que le SNP était incapable de produire cet effet bien qu'il augmentait les taux de GMPc et altérait la contractilité. Selon eux, contrairement à l'activation d'un récepteur muscarinique, le SNP ne pouvait activer la PKG puisqu'il menait à l'élévation de taux de GMPc situé dans des pools n'ayant pas accès à cet enzyme.

En 1992, une nouvelle méthode plus spécifique pour mesurer l'activité de la PKG est développée par Jiang et coll., et sera utilisée par Macdonell et coll. (1997) dans une étude sur l'effet contractile du SNP faite dans des ventricules de rats (129). Contrairement à Lincoln et Keely, ils ont montré que le SNP (10^{-7} - 10^{-4} M) augmentait l'activité de la PKG mais que cette activité accrue n'était pas accompagnée d'un effet inotrope positif ou négatif. De plus, le SNP (10^{-5} M) n'avait aucun effet sur les taux d'AMPc.

Tohse et Sperelakis (1991) ont montré dans des cardiomyocytes de poulet, par une technique de patch-clamp, que le 8-bromo-GMPc (0.1 mM), – le 8-b-GMPc est un dérivé de la GMPc perméable aux membranes qui est un puissant activateur de la PKG et ne stimule pas l'hydrolyse de l'AMPc –, pouvait atténuer le courant des canaux Ca^{2+} de type L lent (I_{Ca-L}), alors qu'à plus forte concentration (1 mM), il l'abolissait complètement (130). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de I_{Ca-L} induite par le GMPc soit gouvernée par un mécanisme indépendant de l'AMPc.

En 1993, Mery et coll. ont rapporté que le 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), le métabolite actif de la molsidomine, avait un effet biphasique sur les I_{Ca-L} dans des myocytes ventriculaires de grenouille (131). Bien que le donneur de NO avait peu d'effets sur les courants Ca^{2+} -L basaux (I_{Ca-L}), de faibles concentrations de SIN-1 (0.1 à 10 nmol/L) pouvaient induire une stimulation modérée des I_{Ca-L} , alors que des concentrations élevées (>100nmol) supprimaient les I_{Ca-L} de façon marquée après stimulation de l'adénylate cyclase par la forskolin ou l'isoprotérénol. Puisque cette stimulation initiale des I_{Ca-L} par le SIN-1 pouvait être inhibée par la milrinone (inhibiteur de phosphodiesterase (PDE) de type III), alors que la suppression de l'effet 'forskolin' sur les I_{Ca-L} pouvait être inhibée par la dialyse intra cellulaire avec du 8-bromo-AMPC, les auteurs interpréteront les résultats en indiquant que ces deux actions de SIN-1 étaient modulées par une PDE d'AMPC inhibée par le GMPc (type III) et une PDE stimulée par le GMPc (type II), respectivement. En contraste, dans une étude antérieure, la même équipe avait rapporté que la suppression de I_{Ca-L} dans des myocytes de ventriculaires de rats adultes qui ont été pré-traités avec l'inhibiteur de PDE, le 3-Isobutyl-1-méthyl-xanthine (IBMX), ou un analogue d'AMPC non-hydrolysable, était probablement due à l'activation de PKG et non à une PDE régulée par le GMPc (132). Wahler et Dollinger (1995) ont rapporté une conclusion similaire en utilisant le SIN-1 dans des myocytes ventriculaires de cochon d'inde (133). Le SIN-1 avait peu d'effet sur I_{Ca-L} , alors que de faibles concentrations causaient une faible stimulation de I_{Ca-L} en présence de concentrations sub-maximales d'isoprotérénol (10 nmol/L). De plus, une forte concentration de SIN-1 (100 μ mol/L) inhibait I_{Ca-L} lorsque pré-stimulé par l'IBMX, l'isoprotérénol ou le 8-b-AMPC. Cependant, l'effet inhibiteur de SIN-1 sur ce courant était bloqué par le LY83583 ou le KT5823, des inhibiteurs sélectifs de la guanylate cyclase et de la PKG, respectivement. Il est important de souligner que l'inhibiteur de PDE, l'IBMX, utilisé dans ces deux études, est non-spécifique et que les PDE inhibée (type III) ou activée (type II) par le GMPc sont alors toutes deux bloquées, ce qui pouvait mener à un effet nul. Afin d'expliquer la divergence de ces observations, Wahler et coll. (1990) ont suggéré que les mécanismes d'action du GMPc, impliquant une interaction avec l'AMPC ou non, soient dépendants de l'espèce étudiée (134).

D'autres études portant sur le NO ont également montré des effets contractiles biphasiques dépendants de la concentration des donneurs de NO utilisée. C'est le cas de Kodja et coll. (1996) qui ont mesuré les effets de différents nitrates organiques (bioactivés en NO) et donneurs de NO, le S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) et le diéthylamine (DEA)-NO, sur la réponse contractile de ventricules de rats adultes (135). Ils ont aussi mesuré les taux d'AMPc et de GMPc. À forte concentration (100 $\mu\text{mol/L}$), les donneurs de NO diminuaient la réponse contractile mais l'augmentaient lorsque infusés en présence de KT5822 ou à faible concentration (1 $\mu\text{mol/L}$). Dans cette étude, l'effet inotrope obtenu suite à l'infusion de l'isoprénaline était augmenté par 1×10^{-6} M de SNAP. De plus, les nitrates organiques, qui menaient à une faible augmentation des taux de GMPc, entraînaient une augmentation de la réponse contractile par une élévation des taux d'AMPc et l'activation de sa kinase associée, la PKA.

Cet effet dualiste du NO sur le cœur ne semble pas restreint aux cardiomyocytes. Une étude récente a montré, dans des cellules du nœud sinusal, que le NO pouvait avoir des effets antagonistes sur les courants potassiques entrants (I_f): l'effet inhibiteur (chronotrope-) serait modulé par une PDE stimulée par le GMPc, et l'effet stimulant à une action directe du GMPc sur ces canaux (136).

D'après les travaux de Mohan et coll. (1995), dans des cardiomyocytes de rats, cet effet biphasique serait seulement observable dans un cadre de concentrations basales de NO déterminé; des taux peu ou trop élevés, conduisant à des effets contractiles unidirectionnels inverses : inotrope positif ou négatif, respectivement (137). Dans un même ordre d'idées, les concentrations des nitrovasodilatateurs utilisés affecteront, en modifiant les niveaux de base de NO, la direction de cette réponse contractile. L'année suivante, ils ont aussi montré que le SNP et le SIN-1 présentaient un effet inotrope positif dans le muscle papillaire de chat présentant un dommage à l'endothélium endocardique; ces effets étaient inversés lorsque l'endothélium demeurait intacte, suggérant l'importance de l'intégrité de ce dernier dans la réponse contractile du NO (138).

Parmi les ouvrages les plus intéressants sur le sujet, celui de Vila-Petroff et coll. (1999) est complet et ingénieux. Ce qui était mesuré : les concentrations intra cellulaires de Ca^{2+} , la réponse des myofilaments au Ca^{2+} , les concentrations d'AMPc, de GMPc et de NO, l'activité de l'adénylate cyclase et les effets de deux donneurs de NO (SNAP, NOC5), en présence ou non de différents bloqueurs (le 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1 (ODQ) (bloqueur de la guanylate cyclase), l'IBMX, le KT5823 et l'oxyhémoglobine) et d'un analogue (Rp-8-CPT-AMPc, un inhibiteur spécifique de l'AMPc) (139). En résumé, le SNAP, quand donné à forte concentration (100 $\mu\text{mol/L}$), produisait un effet inotrope négatif qui était précédé de l'activation de la PKG et d'une réduction de la réponse des myofilaments au Ca^{2+} et non d'une diminution des niveaux calciques. Une faible concentration (1 $\mu\text{mol/L}$) de SNAP agissait de façon opposée et produisait un effet inotrope positif, déterminé essentiellement par une augmentation des concentrations de Ca^{2+} intra cellulaire, par un nouveau mécanisme par lequel le NO augmente les taux d'AMPc, dans des cardiomyocytes de rat, par une activation de l'adénylate cyclase indépendante du GMPc. Toutefois, cette étude ne permet pas de préciser par quel(s) mécanisme(s) le NO pourrait activer l'adénylate cyclase : une activation directe ou par une voie impliquant des protéines G? Il est très intéressant de constater les résultats d'études qui démontrent que le NO peut vraisemblablement moduler la fonction des protéines G. Lander et coll. (1993) ont démontré qu'on pouvait modifier l'activité GTPase membranaire de cellules sanguines mononucléées humaines par un traitement au NO et que celui-ci augmentait de façon similaire l'activité GTPase des sous-unités $G_{s\alpha}$ et $G_{i\alpha i}$ pures et recombinantes (140). De plus, Miyamoto et coll. (1997) ont trouvé, dans les cellules endothéliales, que le NO pouvait inhiber sélectivement les protéines G de la famille G_i et G_q et qu'il soit possible, en contre-partie, que cette modulation ait une action permissive sur la voie G_s -adénylate cyclase (141).

Dans une préparation semblable à celle utilisée par Vila-Petroff et coll., Shah et coll. (1994) ont montré que le 8-b-GMPc (50 $\mu\text{mol/L}$) entraînait une diminution de la réponse relative des myofilaments au Ca^{2+} et donc conduisait à une réduction du tonus diastolique, manifestée par une augmentation de la longueur cellulaire au repos (142). Cet effet n'était pas attribuable à une réduction du pH cytosolique par l'échangeur Na^+/H^+ , reconnu

pour produire une diminution de la réponse des myofilaments au Ca^{2+} , contrairement à ce qui a été proposé dans une étude plus récente (143). Une étude de Kaye et coll. (1999) a montré que le NO pouvait aussi altérer la contractilité par un mécanisme impliquant la phosphorylation de la troponine I par la PKG sans modifier les concentrations cytosoliques en Ca^{2+} (144).

La stimulation du SERCA2 cardiaque par un mécanisme impliquant la phosphorylation de la phospholambane par la PKG est un mécanisme moins connu qui pourrait s'ajouter à la désensibilisation des myofibrilles lorsqu'une diminution des taux calciques intracellulaires est observée en présence de NO. Les indices supportant cette hypothèse sont les suivants : (1) Il est bien connu que la PKG phosphoryle la phospholambane et affecte les taux calciques intracellulaires dans le muscle lisse vasculaire (85,87), (2) on retrouve la même isoforme de SERCA dans le cœur et les vaisseaux, et bien que sa concentration soit plus faible dans le muscle lisse vasculaire, elle présente une stœchiométrie similaire à son homologue cardiaque (87) et (3), utilisant des SERCA cardiaques, une étude a démontré que la PKG phosphorylait la phospholambane sur le même résidu sérine et au même taux que la PKA (86). Les auteurs de cette étude ont toutefois été incapables de reproduire cet effet par l'utilisation d'un analogue de GMPc, suggérant que le GMPc n'ait pas d'effet sur la PKG endogène associée au SERCA en conditions physiologiques.

Finalement, ce ne sont pas tous les auteurs qui ont clairement montré un effet sur la contractilité myocardique par le NO de provenance pharmacologique ou par l'activation de NOS constitutives. Weyrich et coll. ont examiné les effets du NO authentique ou des donneurs de NO sur la tension développée dans des muscles papillaires de rats stimulés à 1 Hz (145). Ils ont montré que les différents donneurs de NO utilisés (SNAP, SPM-5185 et C87-3754, de 1 nmol/L à 100 $\mu\text{mol/L}$) n'avaient aucun effet sur la contractilité et qu'une concentration de norépinéphrine relativement haute (5 $\mu\text{mol/L}$) était nécessaire afin d'observer un effet inotrope négatif du NO authentique à concentration physiologique (500 nmol/L). Ils ont aussi montré un effet inotrope négatif de L-arginine (50 mmol/L). Cet effet semblait toutefois non-spécifique puisqu'il pouvait être mimé par

la D-arginine, le stéréo-isomère inactif, à la même concentration. De plus, cet effet n'était pas inhibé par le L-NAME ou le L-NMMA.

Le visage à deux faces du NO dans le cœur représente bien le rôle que nous lui avons suspecté ces vingt dernières années : il est passé d'un gaz toxique à une molécule aux multiples effets bénéfiques. Depuis quelques années, l'émergence explosive d'ouvrages portants sur ses effets dans le cœur a permis de mettre en évidence et de clarifier plusieurs voies de signalisation orchestrées par cette molécule dans diverses préparations, espèces animales et conditions métaboliques ou pathologiques. Un nombre important d'études a montré que si son apport dans les mécanismes de régulation des fonctions cardiaques était important, il le produisait aussi de multiples façons : effets sur les courants I_{Ca-L} et I_f , phosphorylation de la troponine I par la PKG, implication de différentes PDE, antagonisme de l'AMPc et effet du yin yang, effets sur le pH intra cellulaire et les mitochondries.

Il a été démontré dans ce chapitre que le NO, dans un certain cadre de concentrations, pouvait avoir des effets bénéfiques sur la relaxation et la contractilité myocardique, permettant ainsi une amélioration du débit cardiaque dans des conditions pathologiques ou normale. Aussi, il a été montré que l'étude de la régulation de la fonction myocardique par des mécanismes dépendants du GMPc et de l'AMPc demeurait obligatoirement dépendante des conditions expérimentales (espèce, origine des myocytes cardiaques étudiés, présence de l'endothélium endocardique et vasculaire, conditions physio(patho)logiques et changements dans le tonus sympathique de base). Une mise à profit du potentiel thérapeutique du NO dépendra nécessairement des futures découvertes, qui nous permettront une meilleure compréhension de ses nombreux rôles, bien qu'aujourd'hui nous possédions suffisamment d'éléments pour envisager le développement de médicaments qui permettraient de cibler une fraction de ses effets cardiaques. Par exemple, il pourrait être intéressant dans certaines pathologies cardiaques de permettre une dilatation coronarienne et une meilleure relaxation myocardique sans toutefois affecter le nœud sinusal ou la respiration mitochondriale. Finalement, la transformation de molécules thérapeutiques déjà existantes en des produits analogues

mais pouvant libérer du NO est une autre alternative intéressante. En ce sens, le développement d'une nouvelle molécule d'aspirine, l'aspirine-NO, est déjà amorcé (146). La libération de NO pourrait compenser la diminution de prostacycline, protéger la muqueuse gastrique par vasodilatation et protéger le cœur ayant subi un infarctus.

1.4. But du projet de recherche

Plusieurs études suggèrent qu'une augmentation du B coronarien puisse modifier la rigidité de la paroi ventriculaire, en accroissant la rigidité du lit vasculaire, et causer des effets délétères sur les propriétés diastoliques du cœur. L'implication du NO dans la dilatation induite par l'accroissement du flot coronarien est fortement suggérée. Ce médiateur est bien connu en tant qu'important déterminant dans le contrôle du tonus vasculaire mais son influence sur la fonction cardiaque est beaucoup moins claire. Des études antérieures ont montré que des vasodilatateurs NO-indépendants n'affectaient pas la fonction lusitrope au même titre que le font les donneurs de NO.

Notre hypothèse est que la relâche pharmacologique de NO pourrait minimiser les effets diastoliques néfastes observés lorsque le B coronarien est augmenté. De plus, nous croyons que les effets de l'accroissement du B coronarien pourraient être accentués dans des cœurs cardiomyopathiques en période de défaillance. Ces études vont permettre de valider l'utilisation des vasodilatateurs donneurs de NO dans des conditions comme la défaillance cardiaque associée à la cardiomyopathie.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons évalué les effets d'un donneur de NO (le nitroprussiate de sodium, SNP) sur la fonction lusitrope du cœur défaillant de hamster UM-X7.1 en période de défaillance (>225 jours). Ces effets ont été évalués dans un système de cœur isolé (Langendorff) à débit constant. Dans un premier temps, des cœurs isolés perfusés à débit constant sont soumis à des augmentations mécaniques graduelles du débit coronarien de +1 à +5 ml/min. Dans une autre série d'expérience, les cœurs sont pré-traités avec SNP 10^{-6} M puis exposés au même protocole d'augmentations mécaniques du débit. Enfin, un groupe supplémentaire de cœurs isolés a été exposé aux mêmes augmentations alors qu'ils étaient stimulés électriquement (fréquence de base + 30 batt./min).

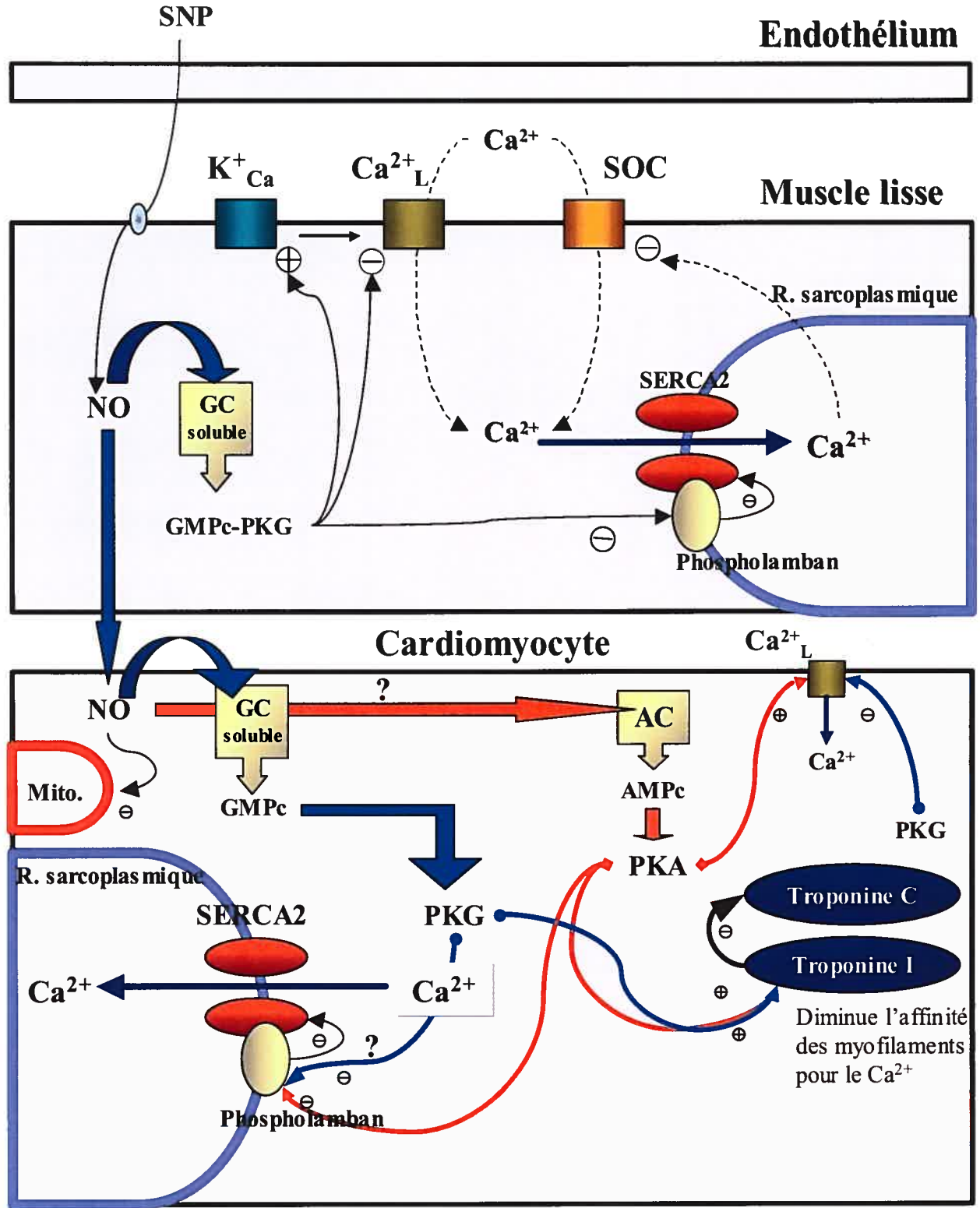


Figure 1. Mécanismes intra-cellulaires sous-jacents aux effets cardiaques et vasculaires du NO

2.0. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Le modèle de perfusion à débit constant

Le modèle de perfusion Langendorff à débit constant a été utilisé dans notre laboratoire, entre autres, afin de mesurer les effets mécaniques directs d'une augmentation fixe et graduelle du débit coronarien dans le cœur de hamster. Nous avons préféré le modèle d'augmentation mécanique du débit coronarien à celui de l'utilisation de vasodilatateurs puisque ces derniers peuvent interagir directement avec la contraction et la relaxation du ventricule gauche. Une étude faite dans notre laboratoire dans le cœur normal de hamster a permis de valider la stabilité de ce modèle lorsque le débit était augmenté graduellement de +2 à +10 ml/min (147). Dans cette étude, les cœurs contrôles étudiés recouvraient leurs valeurs de base de pression ventriculaire gauche diastolique après chaque série d'augmentation mécanique de débit.

2.1.1. Passage de pression de perfusion constante à débit de perfusion constant

Voir figure 2, p.42. Le passage du mode pression constante au mode débit constant se fait en bloquant (à l'aide d'un clamp) la ligne de perfusion du ballon principal (1) et simultanément, en déclampant la ligne de perfusion reliée au second ballon (5). Donc, la source d'approvisionnement du ballon 1 à pression constante devient le ballon principal lors du changement de mode. Avant cette opération, le Krebs contenu dans le tube reliant le ballon 5 à la chambre 4 doit être écoulé et remplacé par du Krebs chaud, puis la pompe est actionnée.

2.2. Modèle expérimental

Des cœurs de hamsters syriens cardiomyopathiques (poids 125-170 g) de la lignée UM-X7.1 âgés de plus de 225 jours (période de défaillance) ont été utilisés comme modèle expérimental dans cette étude (n=22) (144). Après dislocation cervicale et thoracotomie, le cœur a rapidement été perfusé par l'aorte par une solution tampon Krebs-Henseleit modifiée (composition en mM : 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,3 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 25 NaHCO₃ et 15 glucose) puis excisé avant d'être transféré sur notre appareillage de Langendorff. Au cours du prélèvement, le cœur a continuellement été aspergé d'une solution saline maintenue à 4°C afin de diminuer son activité. Le réservoir de perfusion a été placé à une hauteur suffisante afin de fixer le niveau de Krebs à une hauteur de 140 cm par rapport au cœur. Ce niveau a été maintenu constant tout au long des expériences à l'aide d'une pompe reliée à un ballon d'approvisionnement afin de produire une Pp constante de 100 mm Hg dans l'aorte. La solution tampon était saturée en O₂ par un mélange gazeux contenant 95%O₂ et 5%CO₂, résultant en un pH de 7.4 et une pO₂ > 500 mm Hg. De plus, elle était maintenue à 37°C par un système fermé de double-paroi (ballons et serpentins) relié à une pompe et un thermorégulateur. Tout au long de l'expérience, le cœur a été placé dans une chambre reliée au système thermorégulateur afin de le maintenir à une température de 37°C. Le montage de Langendorff utilisé nous permettait de passer aisément du mode de perfusion à pression constante à celui de perfusion à débit constant grâce à une pompe péristaltique (Modèle 325A, Sage instruments, Cambridge, MA, USA) (147). Les valeurs de base du flot coronarien pouvaient ainsi être ajustées au niveau souhaité. À pression constante, la valeur moyenne du débit coronarien a été obtenue en quantifiant l'écoulement du perfusé, provenant de l'oreillette droite (voir section sur le modèle), sur une période de 2 minutes. La Pp a été mesurée à l'aide d'un transducteur de pression (modèle PX272, Baxter Corporation, Mississauga, Ont., Canada) relié à la ligne de perfusion et placé au même niveau que le cœur. Les pressions ventriculaires gauches en fin de systole (PSVG) et en fin de diastole (PDVG) ont été obtenues par l'insertion d'un ballon de latex dans le ventricule gauche via l'oreillette. Le ballon était relié, par une canule en métal fixée à un tube de polyéthylène contenant de l'eau, à une seringue

(permettant d'ajuster le volume d'eau) et un transducteur de pression (modèle PX272, Baxter Corporation) en circuit fermé. Le volume d'eau dans le ballon a été ajusté afin d'obtenir une pression diastolique équivalente à approximativement 10 mm Hg. Ce volume a ensuite été maintenu tout au long des expériences (précharge constante). La fréquence cardiaque (batt./min) a été obtenue à partir des enregistrements de pressions et tous les paramètres hémodynamiques (la pression développée gauche, PVG (la PSVG moins la PDVG), les vitesses de contraction ($+dP/dt_{max}$) et de relaxation ($-dP/dt_{max}$) et la Pp) ont été mesurées en continue sur un physiographe à 5 modules (Modèle 5D, Grass instruments, Quincy, MA, USA). Une série de cœurs supplémentaires a été réalisée à fréquence constante en utilisant un générateur d'influx (Grass stimulator, modèle S48, Quincy, MA, USA) - influx généré 0,75 milliampère, durée : 2 millisecondes - relié à un oscilloscope (modèle COS5020, Kikusui, electronics corp.). Les électrodes ont été placées sur l'oreillette droite et espacées de 2 à 3 mm.

2.3. Protocole expérimental

Après l'insertion du ballon, les cœurs ont été amenés à stabilité à pression constante pour une période variant de 20 à 30 minutes, puis les valeurs de base de PDVG, PSVG, $+dP/dt_{max}$, $-dP/dt_{max}$, flot coronarien, et fréquence cardiaque ont été enregistrées. Les paramètres cardiaques ont ensuite été mesurés après passage à débit constant et après chaque augmentation mécanique de débit (de +1 à +5) suivant une période de stabilisation de 2 à 3 minutes (Groupe témoin, n=10 à 11). Dans le second groupe expérimental (n=7 à 8), l'influence du débit coronarien sur le cœur a été mesurée en présence d'une infusion de SNP (10-6M). Dans un premier temps, les différents paramètres cardiaques ont été mesurés à pression constante après 5 minutes d'infusion avec le SNP, puis, sans interrompre l'infusion, le même protocole d'augmentation de débit a été suivi (+1 à +5). Lors du changement de mode de perfusion, le flot a été ajusté à la valeur de base mesurée avant l'infusion de SNP dans le cœur. Dans le troisième groupe expérimental (n=4), à la différence du groupe contrôle, les cœurs ont été stimulés électriquement à +30 batt./min au-delà de leur niveau de base afin de (1) mimer l'effet chronotrope du SNP (10-6M) à

pression constante et (2), éliminer l'influence possible de la fréquence dans l'interprétation de nos résultats. La pompe servant à l'infusion du SNP a été ajustée en réponse aux changements de débit afin d'obtenir une concentration constante tout au long de l'expérience. La concentration de SNP a été choisie à partir d'expériences préliminaires afin d'obtenir une augmentation physiologique du flot coronarien d'environ 2ml/min.

2.3.1. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM. Des tests de t pairés ont été utilisés pour comparer les valeurs obtenues en conditions contrôles et après infusion de SNP à pression constante. Pour déterminer l'effet d'une augmentation du débit coronarien sur chaque groupe et pour comparer l'effet vasculaire du SNP à une augmentation mécanique du débit, des tests de t non-pairés ont été utilisés. Les différences entre les groupes à chaque palier d'augmentation de débit ont été obtenues par 'one-way' ANOVA suivi d'un test de Bonferonni. Une différence significative était acceptée à $P \leq 0,05$.

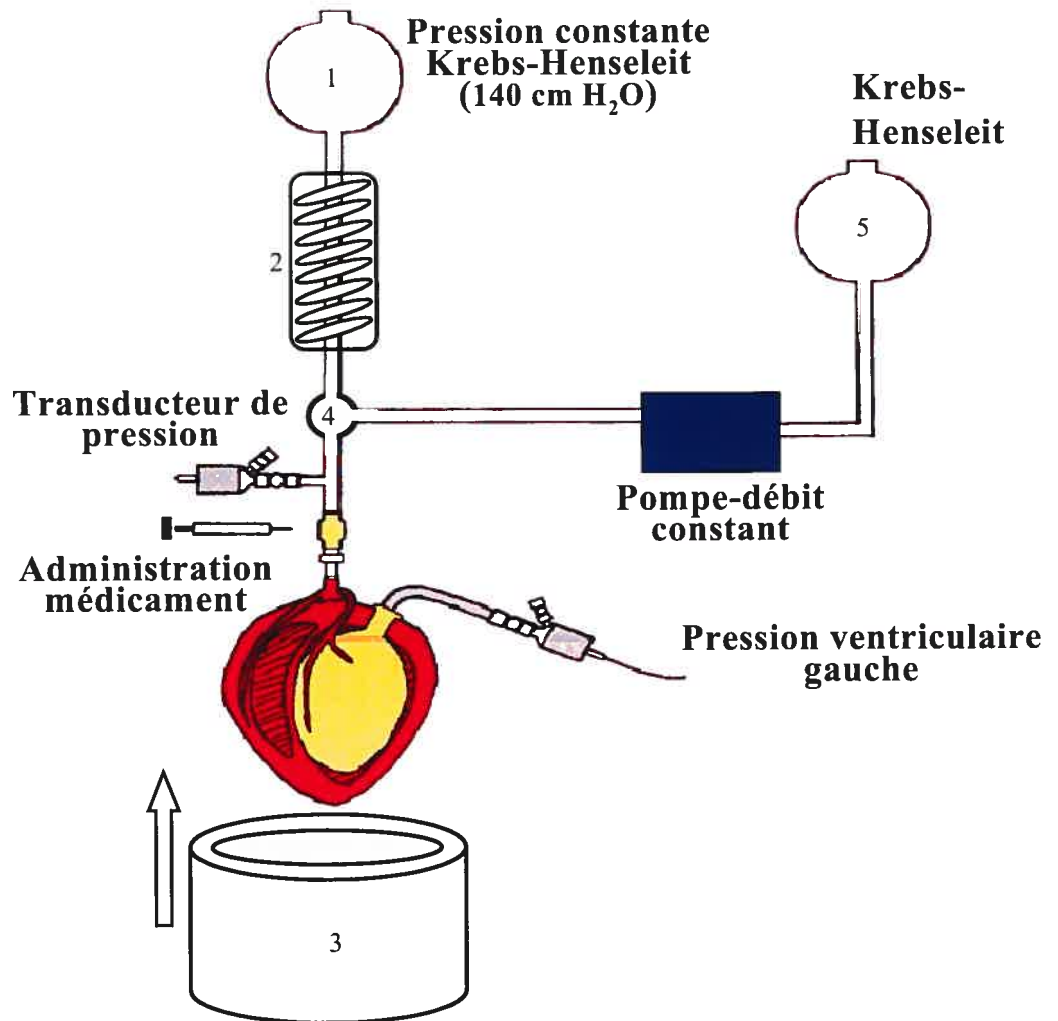


Figure 2 : Montage du cœur isolé

3.0. RÉSULTATS

3.1. Valeurs de bases

Les valeurs de base des différents paramètres cardiaques après passage à débit constant sont illustrées au tableau II (p.47). L'absence d'effet du SNP 10^{-6} M sur le débit provient du choix du protocole expérimental dans lequel le débit est ajusté au niveau de base (la pompe étant ajustée au débit mesuré avant l'effet vasodilatateur du SNP) lors du passage à débit constant. Avec cette alternative, il nous a été possible d'évaluer l'effet direct du NO sur la fonction cardiaque tout en éliminant l'apport du phénomène de Gregg. En contre-partie, cet effet vasculaire du SNP a mené à une Pp plus basse que celle mesurée pour le groupe témoin (69 ± 4 et 108 ± 3 , respectivement), affectant parallèlement les valeurs de base (+0 mm Hg) de résistance coronarienne (10.6 ± 1.3 vs 16.3 ± 1.7 mm Hg*min*ml⁻¹, $P < 0.05$) telles qu'illustrées à la figure 5 (p. 50). Finalement, la fréquence cardiaque est plus élevée dans le groupe SNP par rapport au groupe témoin (164 ± 6 vs 125 ± 6 batt*min⁻¹, respectivement). Ces différences sont aussi rapportées aux figures 4, 5 et 8 (A : variations, Q : valeurs brutes, p. 49, 50 et 53) afin de visualiser l'impact du SNP sur la résistance coronarienne, la Pp et la fréquence cardiaque tout au long des augmentations de débit.

3.2. Conséquence d'un passage à débit constant

Bien qu'en théorie le passage d'un système de perfusion à pression constante à celui d'un système de perfusion à débit constant ne devrait pas modifier les différents paramètres cardiaques, nous avons tout de même noté une différence dans les valeurs de fréquence cardiaque chez les groupes témoin et SNP (avant passage: 148 ± 7 , après : 125 ± 6 ; avant : 189 ± 10 , après : 164 ± 7 , respectivement; $P < 0.05$).

3.3. Effets d'une augmentation mécanique du débit coronarien chez le groupe témoin

Un exemple de tracé des répercussions d'une augmentation du débit coronarien sur la Pp et les pressions ventriculaires gauche est illustré à la figure 3 (p. 48). L'augmentation mécanique du débit coronarien a affecté significativement les compartiments coronarien et cardiaque : la Pp de base avoisinait 100 mm Hg et a atteint 155 mm Hg à plus fort débit. La pression diastolique est passée de 10 à 20 mm Hg au débit le plus élevé, et la pression systolique a atteint 70 mm Hg à +5 ml/min, augmentant ainsi de 25 mm Hg au-delà du niveau de base.

À des fins de clarté et parce qu'aucune différence inter-groupe n'a été observée avec le groupe fréquence constante, seules les figures 5 et 7-B et la figure principale (figure 6-A, p. 50) illustrent ce dernier. Le passage du débit de base (0 ml/min) à +5 ml/min a mené à une diminution de la résistance coronarienne (figure 5, p.50) et à des élévations concomitantes de la Pp (figure 4, p.49) et des pressions diastolique (Figure 6-A, p.51) et systolique (figure 7-A, p. 52) ($P < 0.05$) sans toutefois affecter les vitesses de relaxation (figure 6-B) et de contraction (figure 7-C). La PVG a aussi été augmentée dans les groupes témoin et mécanique mais non dans le groupe fréquence constante (figure 7-B). Inversement, l'augmentation mécanique du débit coronarien a fait chuter la fréquence cardiaque dans les deux groupes principaux (Figure 8, p. 53).

3.4. Effets du SNP 10^{-6} M à pression constante

Les effets du SNP à pression constante sont illustrés aux figures 9 et 10 (p. 54-55). Le débit coronarien de base à pression constante était de 6.9 ± 0.7 ml/min ($n=8$). Après 5 minutes d'infusion avec le SNP, le débit est passé à 9.3 ± 1.0 ml/min, une élévation de 34 ± 5 %, $P < 0.05$). Les effets du SNP sur la relaxation myocardique incluent des

augmentations de la pression diastolique (13 ± 2 à 15 ± 1 mm Hg, $+21 \pm 5$ %, $P < 0.05$) et de la vitesse de relaxation (343 ± 29 à 418 ± 34 mm Hg/s, $+23 \pm 4$ %, $P < 0.05$). La pression systolique a augmenté de 15 ± 4 % (46 ± 4 à 53 ± 2 mm Hg; menant à une PVG plus élevée de 13 ± 4 % : 33 ± 3 à 36 ± 3 mm Hg, $P < 0.05$) et la vitesse de contraction a été augmentée de 17 ± 3 %, passant de 523 ± 65 à 600 ± 62 mm Hg/s, $P < 0.05$. Finalement, la fréquence cardiaque est passée de 167 ± 11 à 183 ± 12 batt./min, une augmentation de 11 ± 3 %). L'effet du SNP sur les différents paramètres cardiaques sera comparé, dans la discussion, à une augmentation mécanique du débit coronarien similaire à celle obtenue avec le vasodilatateur à pression constante.

3.5. Effets du SNP 10^{-6} M en présence de forces de cisaillement

La figure 4-A (p.49) montre que la Pp du groupe témoin augmentait de façon similaire au groupe SNP dans les premiers paliers d'augmentation de débit (+1 à +3 ml/min). À plus fort débit, cette différence s'atténuait jusqu'à devenir inexistante à +5ml/min (151 ± 9 et 137 ± 9 mm Hg). La figure 5 (p.50) permet de bien visualiser l'augmentation constante de Pp en présence de SNP; la stabilité de la courbe de la résistance en fonction du débit indique que le débit et la Pp ont augmenté dans des proportions semblables à chaque palier de débit.

La présence de SNP a atténué significativement l'augmentation de pression diastolique aux paliers d'augmentation de débit de +2 et +3 ml/min (figure 6-A, p. 51) mais n'a pas affecté les élévations de pression systolique (figure 7-A, p.52). De plus, le SNP n'a pas modifié les vitesses de relaxation et de contraction (figure 6-B et 7-C, respectivement). L'effet chronotrope positif du SNP a été maintenu tout au long des augmentations de débit mais s'est atténué graduellement dans les quatre premiers paliers (Figure 8-B, p.53). Il n'y avait toutefois aucune différence dans les variations mesurées.

Tableau II. Valeurs de base avant augmentations du débit coronarien

	Débit ml/min	Pp mm Hg	PDVG mm Hg	PSVG mm Hg	Fréq. bpm	+dP/dt _{max} mm Hg/s	-dP/dt _{max} mm Hg/s
Courbe Mécanique	7.2 ± 0.6	108 ± 3	11 ± 1	44 ± 2	125 ± 6	498 ± 47	380 ± 43
SNP 10 ⁻⁶ M	6.9 ± 0.7	69 ± 4*	14 ± 2	50 ± 3	164 ± 7*	555 ± 45	380 ± 25
Fréquence constante	6.1 ± 0.7	94 ± 16	10 ± 1	44 ± 6	185 ± 9	660 ±	505 ± 75

115

Valeurs : Moyenne ± SEM (Total, n=22; mécanique, n=10, SNP, n=8, fréq. const., n=4). Pp, pression de perfusion, PDV;PSV, pression ventriculaire gauche en fin de diastole et en fin de systole, +dP/dt_{max};-dP/dt_{max}, vitesses maximales de contraction et de relaxation.

* P < 0.05 vs Mécanique (contrôle)

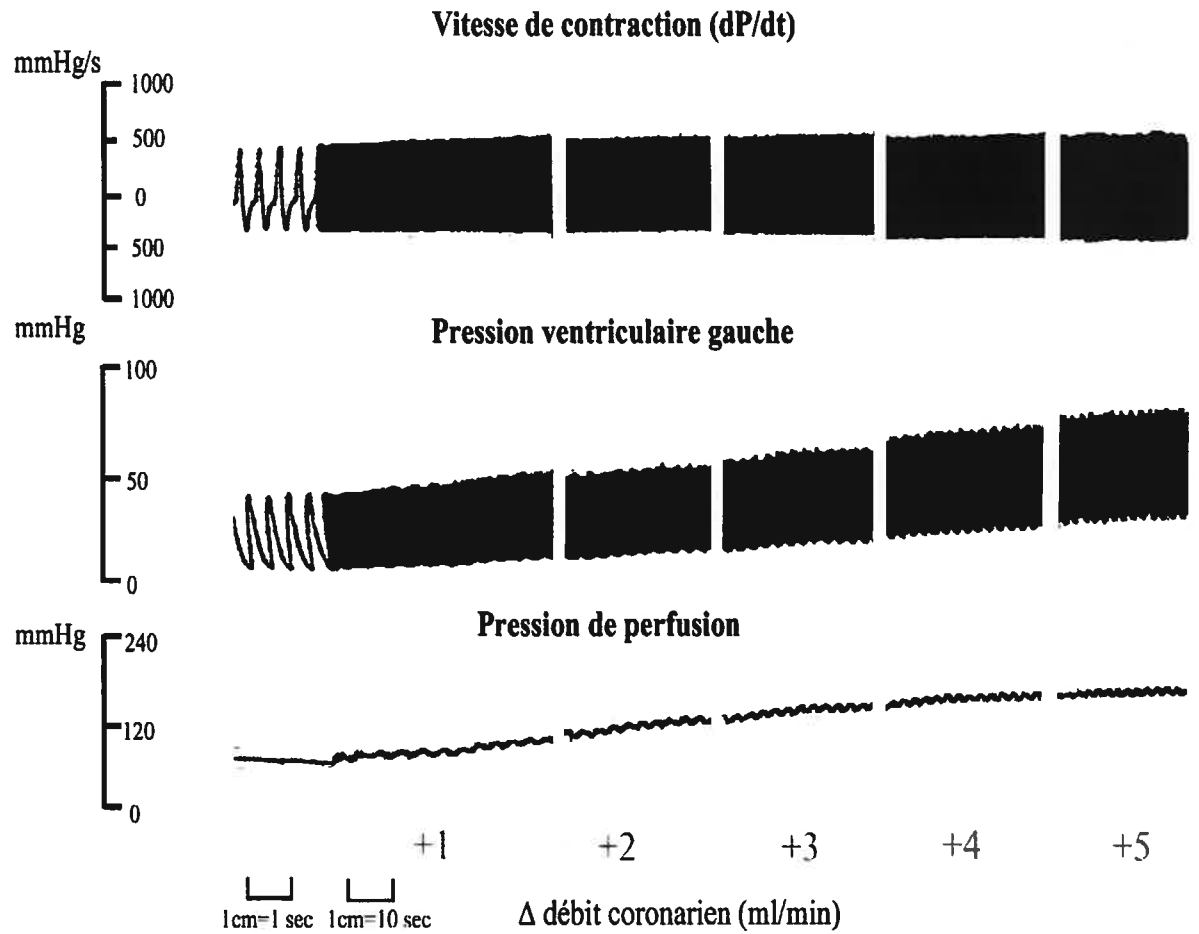
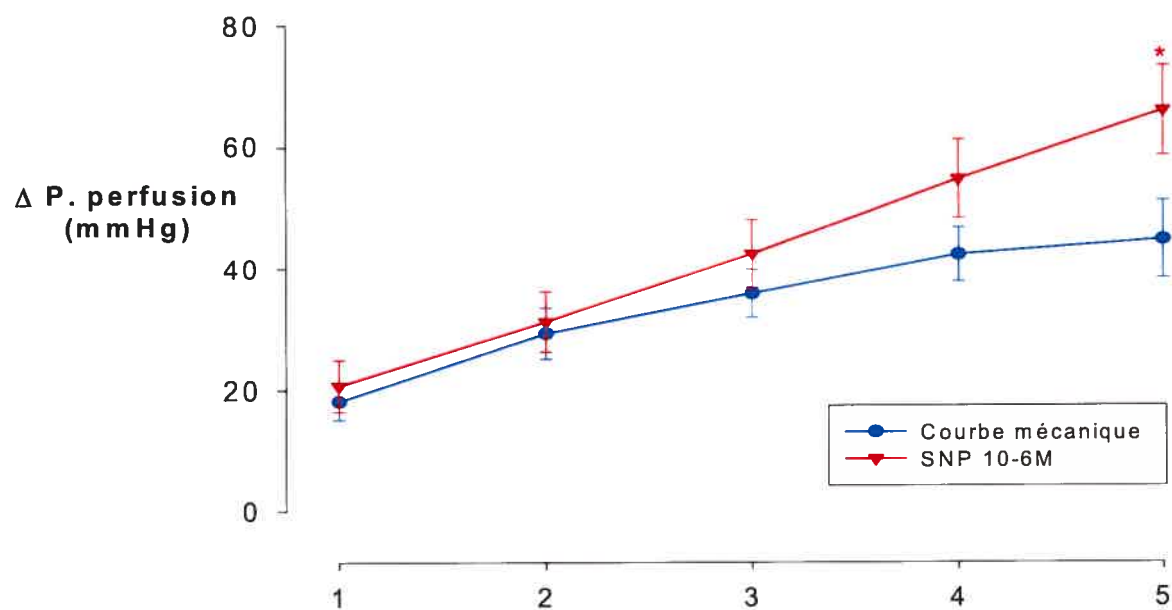


Figure 3. Exemple de tracé

Effet de l'augmentation du débit coronarien sur la force de contraction et sur la PVG

A.



B.

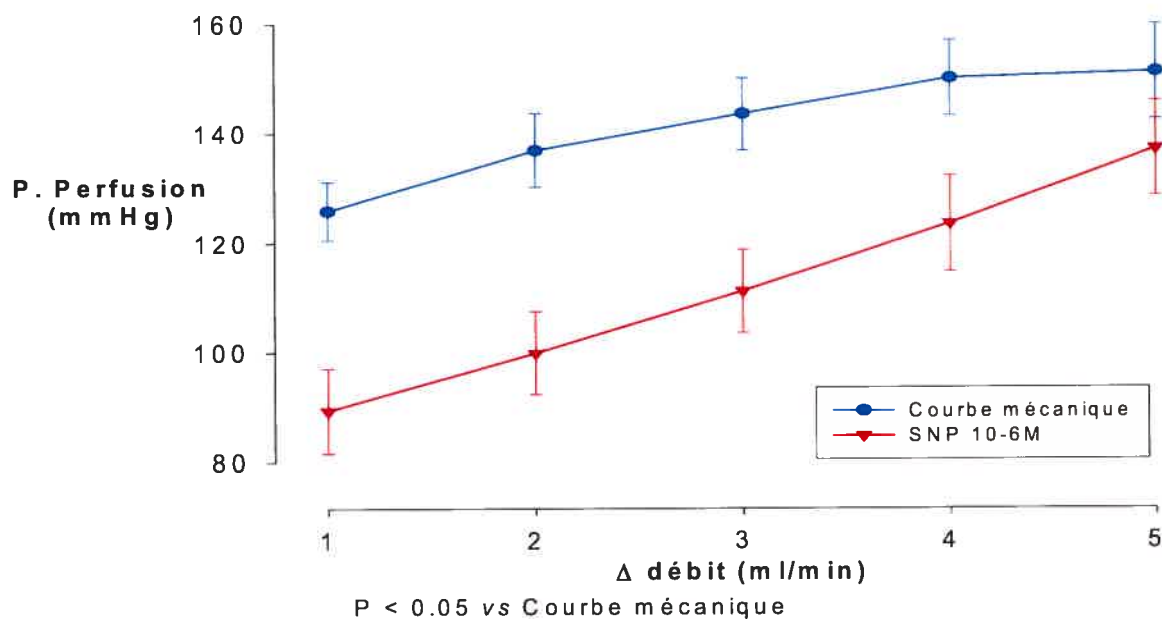


Figure 4-A, B. Effets d'une augmentation de débit sur la pression de perfusion

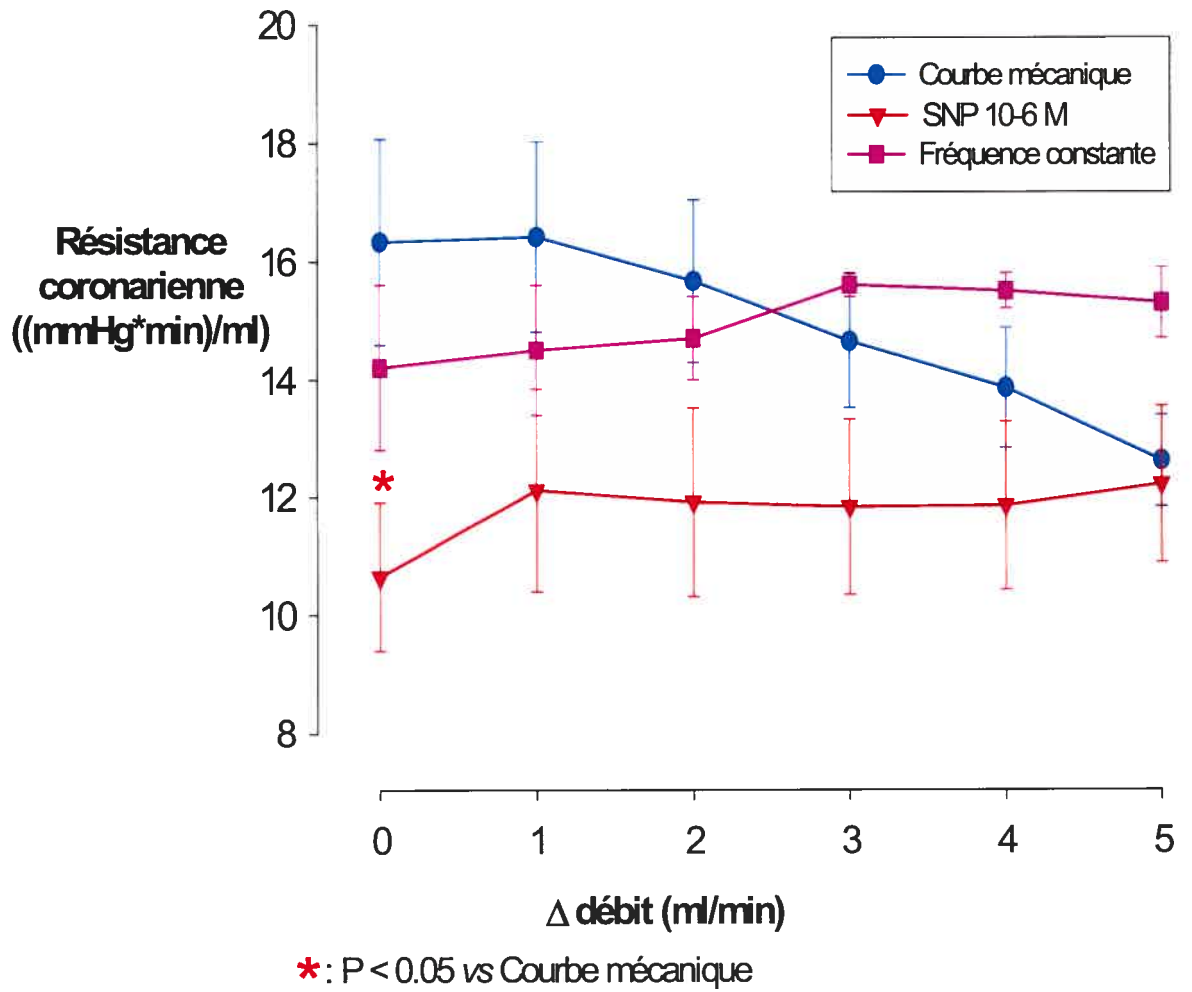
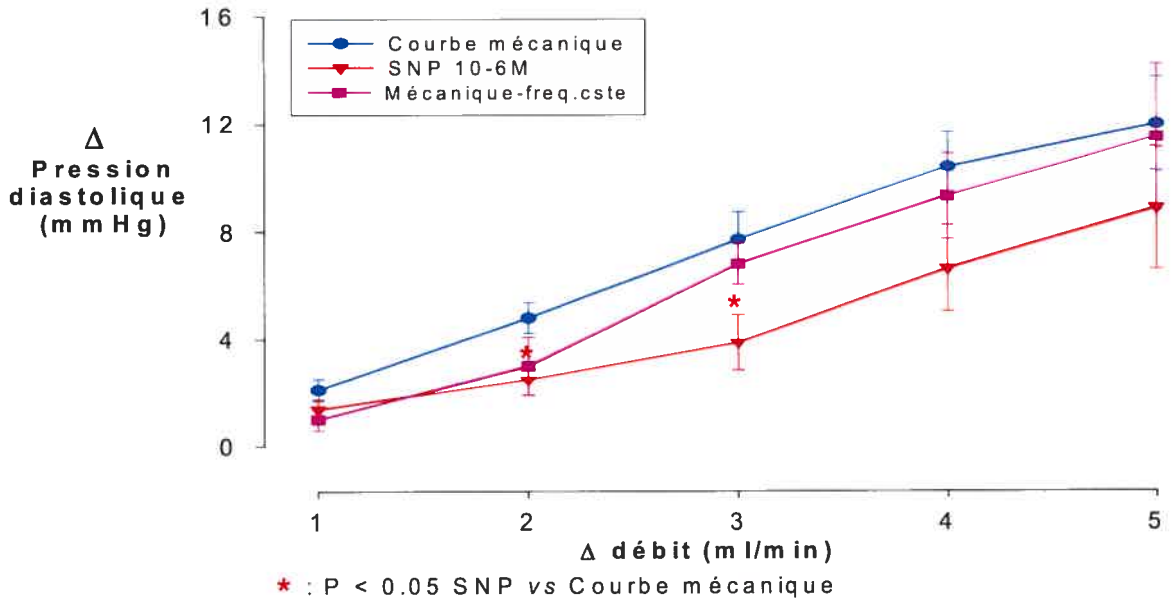


Figure 5. Effets d'une augmentation de débit coronarien sur la résistance coronarienne

A.



B.

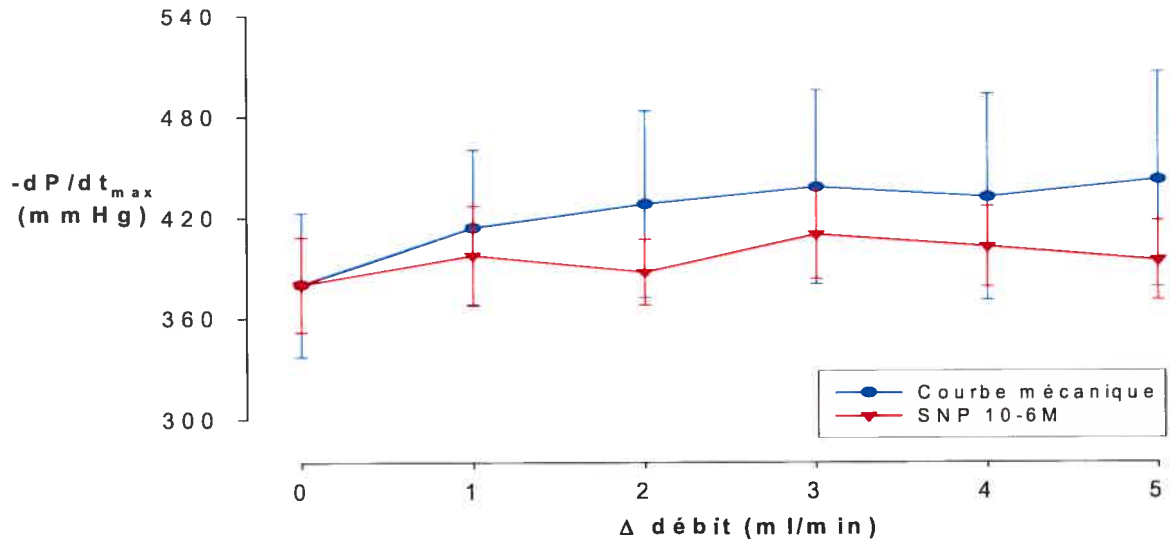
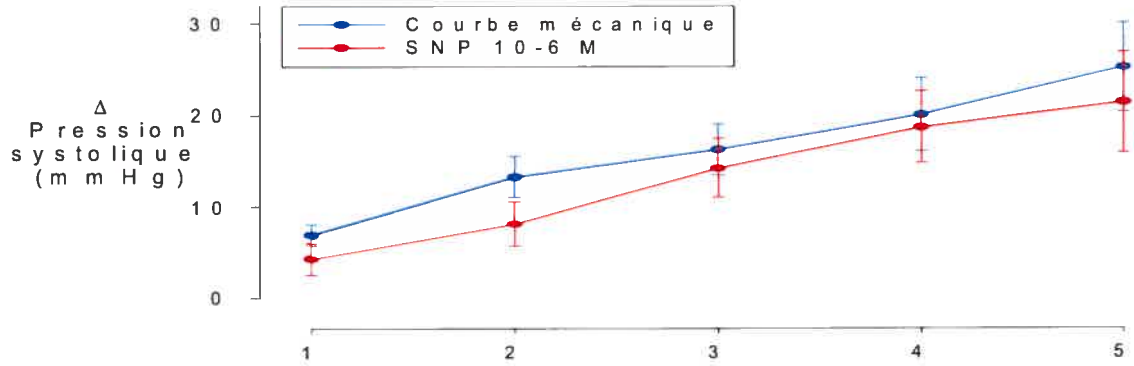
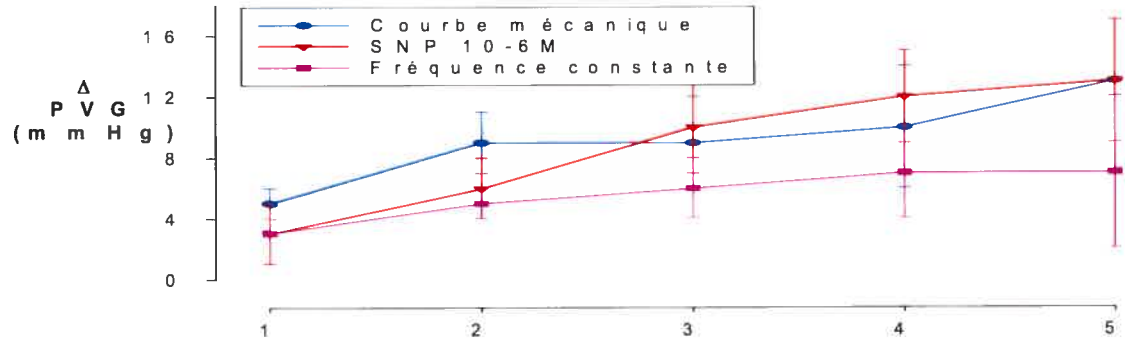


Figure 6-A, B. Effets d'une augmentation de débit sur la pression diastolique et la vitesse de relaxation

A.



B.



C.

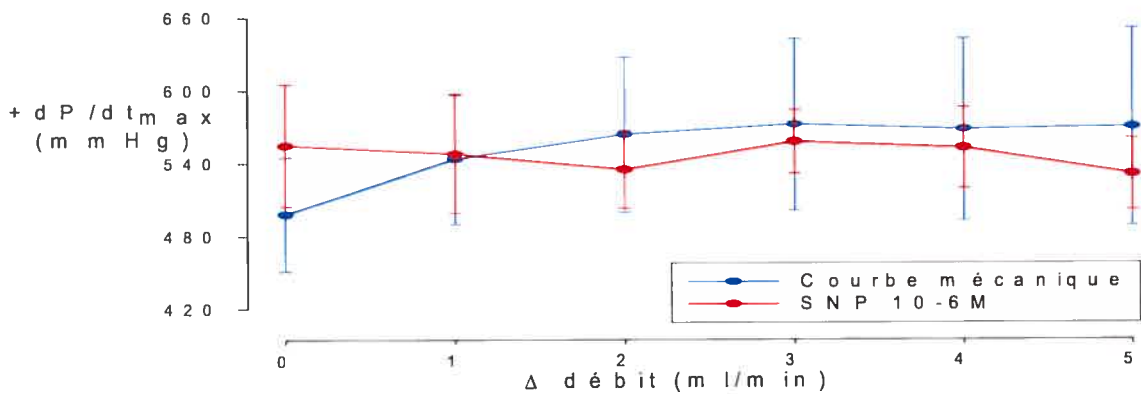
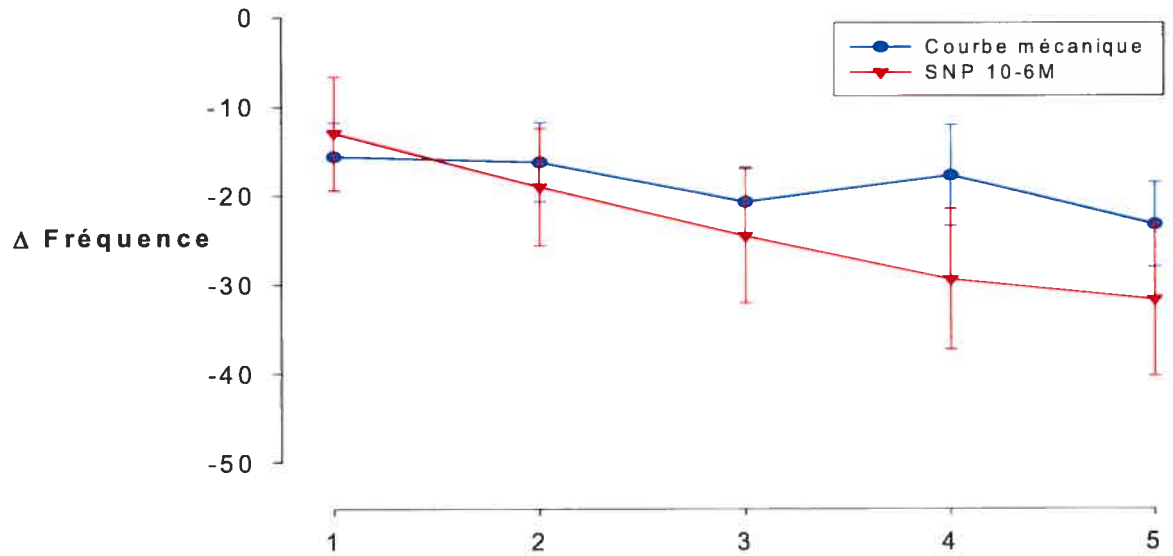


Figure 7-A, B, C. Effets d'une augmentation de d\ebit sur la pression systolique, la pression ventriculaire gauche et la vitesse de contraction

A.



B.

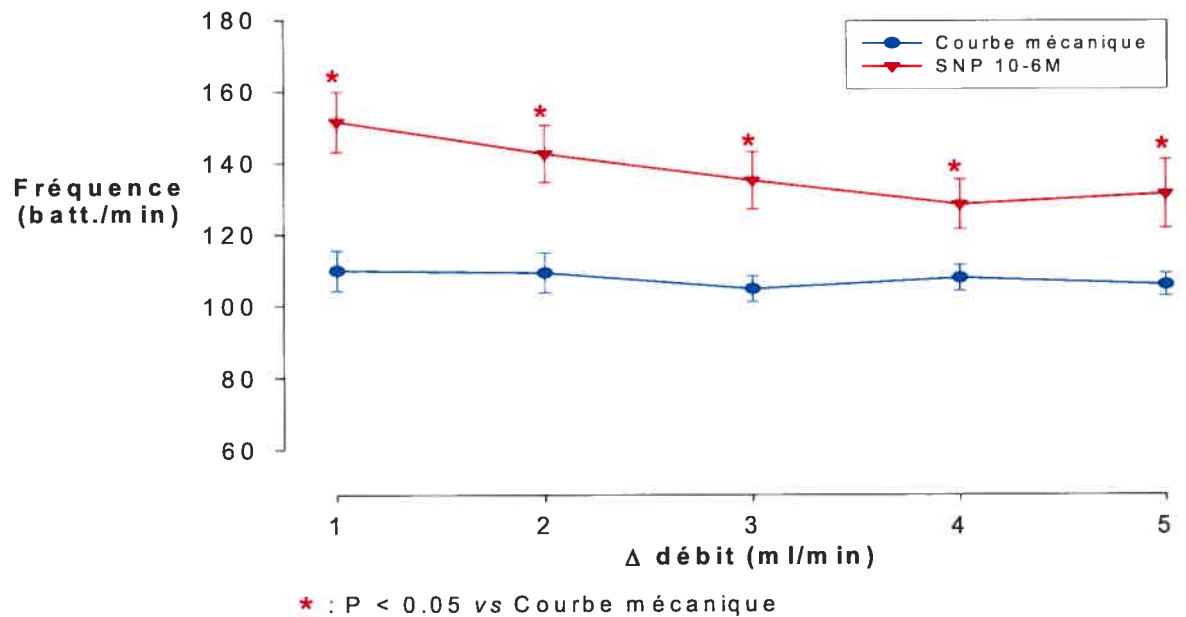
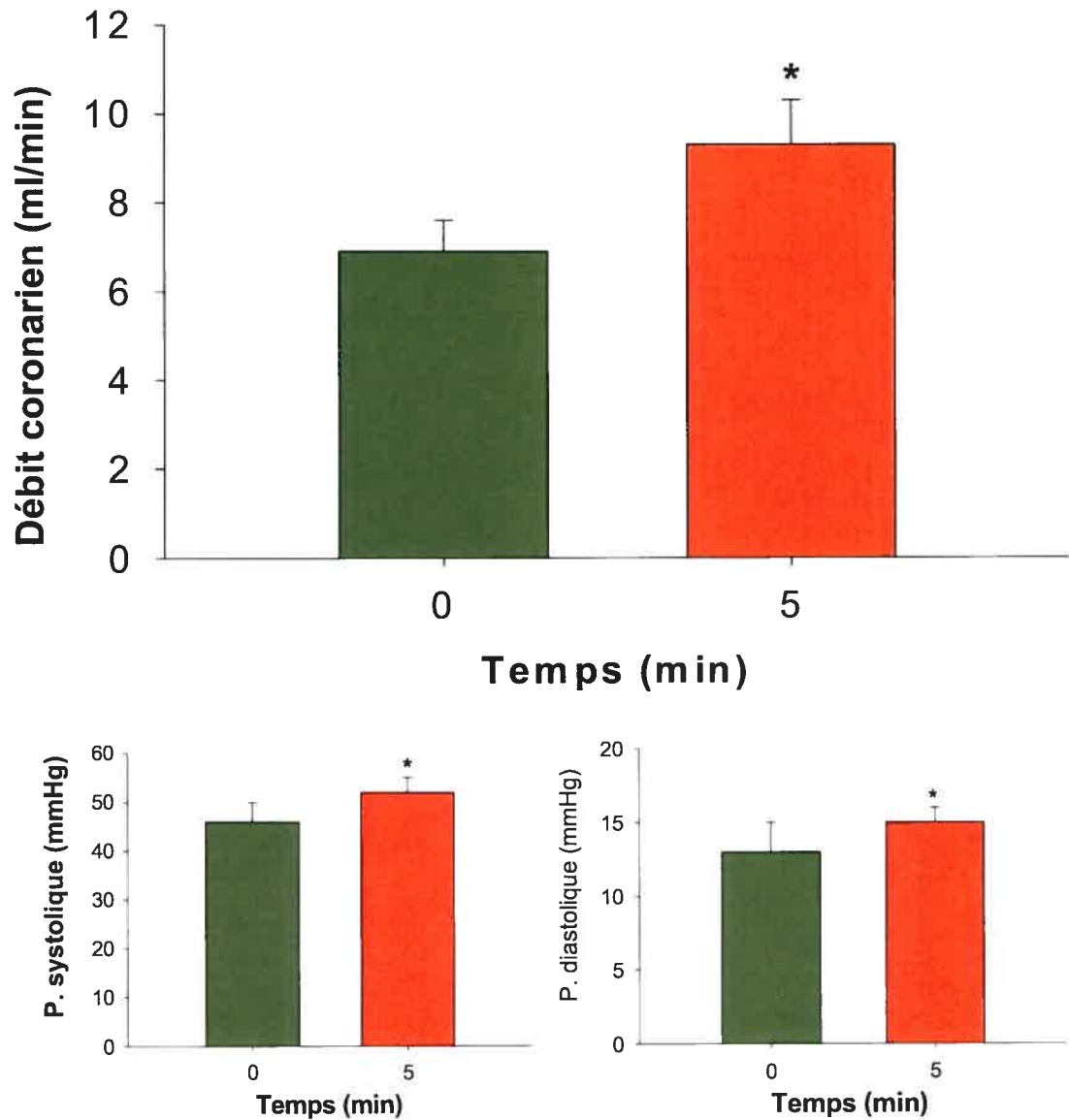
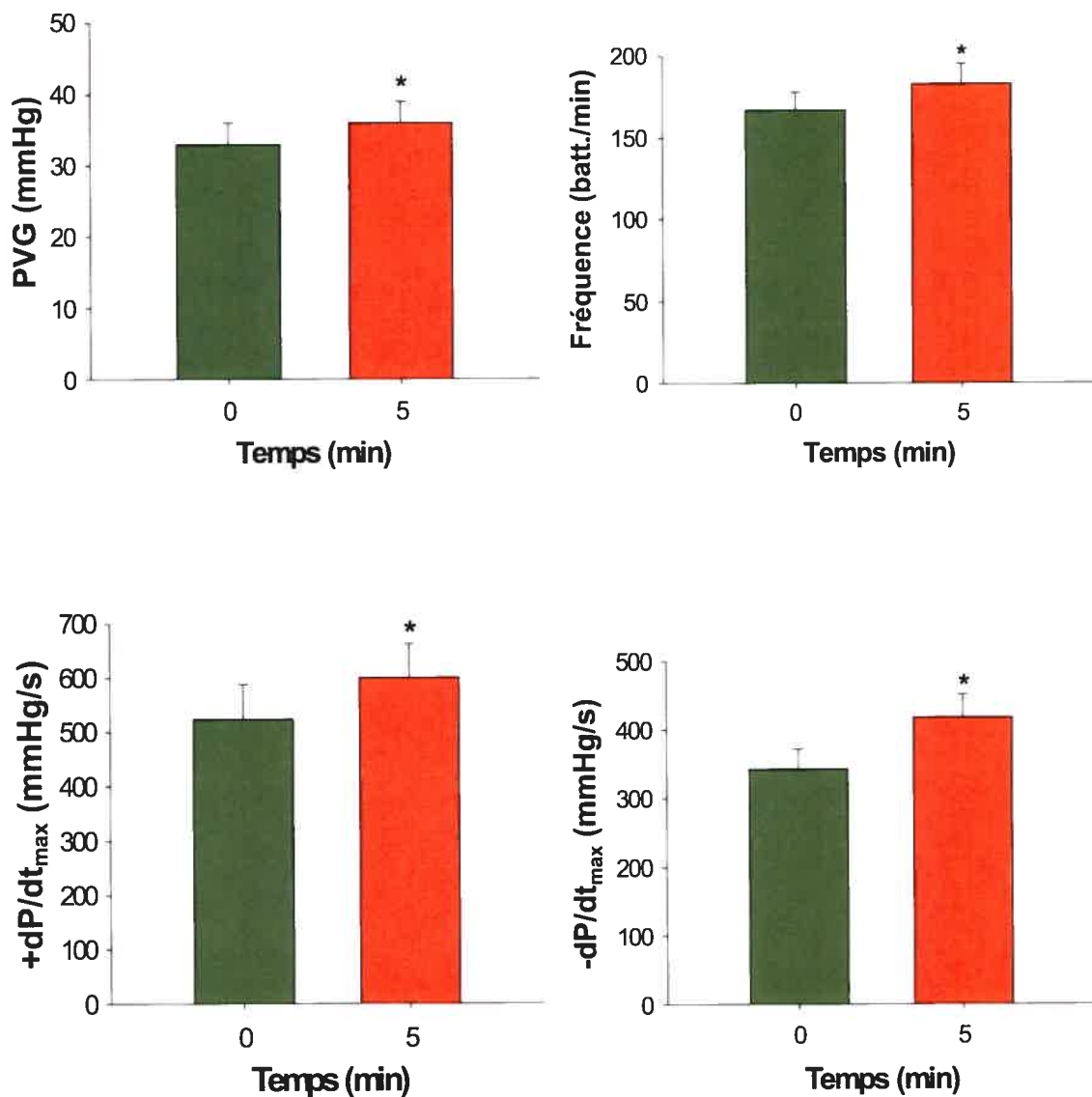


Figure 8-A, B. Effets d'une augmentation de débit sur la fréquence cardiaque



* $P < 0.05$

Figure 9. Effets de 5 min d'infusion du SNP 10-6M sur le débit coronarien et les pressions systolique et diastolique à pression de perfusion constante



*P<0.05

Figure 10. Effets du SNP 10-6M sur la pression ventriculaire gauche, la fréquence cardiaque et les vitesses de contraction et de relaxation à pression de perfusion constante

4.0. DISCUSSION

4.1. Le hamster cardiomyopathique UM-X7.1

Le petit animal est découvert au début des années 60 et devient rapidement, pour plusieurs chercheurs, un outil essentiel à l'étude de certaines formes de cardiomyopathies héréditaires observées chez l'homme (148). Les études subséquentes à partir de la première souche (BIO 1.50) et des générations suivantes (BIO 14.6) ont permis d'attribuer à cette myopathie (du muscle cardiaque et squelettique) un mode de transmission par un gène autosomique récessif (149). Une lignée consanguine de hamsters cardiomyopathiques est ainsi initiée. Le gène autosomique peut être transmis d'une génération à l'autre par croisements homozygotes avec un taux de succès de 100%. Plusieurs lignées ont ainsi été produites, dont celle qui a été développée à l'Université de Montréal à partir de la souche BIO 14.6, le UM-X7.1.

Le hamster cardiomyopathique UM-X7.1 a prouvé être un modèle expérimental hautement reproductible qui illustre le développement de la majeure partie des caractéristiques de la maladie cardiaque retrouvée chez l'homme, incluant l'hypertrophie ventriculaire, la dilatation de la chambre gauche et ultérieurement, la défaillance cardiaque. Quatre phases cliniques et histologiques ont été définies dans le développement de la maladie (voir figure 11, p. 59) : (1) une phase nécrotique, impliquant l'apparition de régions disséminées de myolyse cellulaire (30 à 100 jours); (2) une phase de fibrose et de cicatrisation, où aucun signe de défaillance n'est visible et la mortalité est négligeable (100 à 160 jours); (3) une phase d'hypertrophie et de dilatation ventriculaire, associée à une calcification accrue du tissu nécrosé (160 à 200 jours); et (4) une phase de défaillance, caractérisée par une dilatation progressive, une diminution de la fonction contractile et un haut taux de mortalité (200 à 300 jours). À cette étape ultime, plus de la moitié des hamsters meurent avant l'âge de 250 jours (150).

Des anomalies dans la structure, la physiologie et la biochimie myocardique associées à ce modèle de cardiomyopathie ont été démontrées par plusieurs chercheurs. Parmi celles-ci, on peut inclure des troubles de l'homéostasie calcique (150), des altérations membranaires dont celles des complexes tropomyosine-troponine (151) et δ -

sarcoglycane-dystrophine (152), une diminution des taux d'AMPc (153), une diminution de l'activité ATPase de certains canaux calciques dont l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (154) et le réticulum sarcoplasmique (155), une capacité contractile diminuée (156), une relation force-fréquence négative (73), des altérations mitochondriales caractérisées par une capacité respiratoire et une production de créatine phosphate réduites (150), une baisse du pH cytosolique (156), la présence de vasospasmes coronariens (157), une augmentation de la sensibilité des myofilaments vasculaires au Ca^{2+} (158), et finalement, une densité accrue du récepteur calcique sensible à la ryanodine (159).

Au cours des années, sa popularité lui aura donc permis une meilleure visibilité auprès des chercheurs. Ainsi, une abondante littérature traitant des anomalies histologiques, biochimiques, mécaniques et électrophysiologiques est disponible, rendant ce modèle particulièrement intéressant. De plus, l'évolution lente, progressive et bien définie de la cardiomyopathie du hamster s'est avérée être très ressemblante, à plusieurs égards, à celle retrouvée chez l'homme. En conclusion, ces facteurs réunis font du hamster UM-X7.1 un modèle de choix dans l'étude de la cardiomyopathie hypertrophique dilatée.

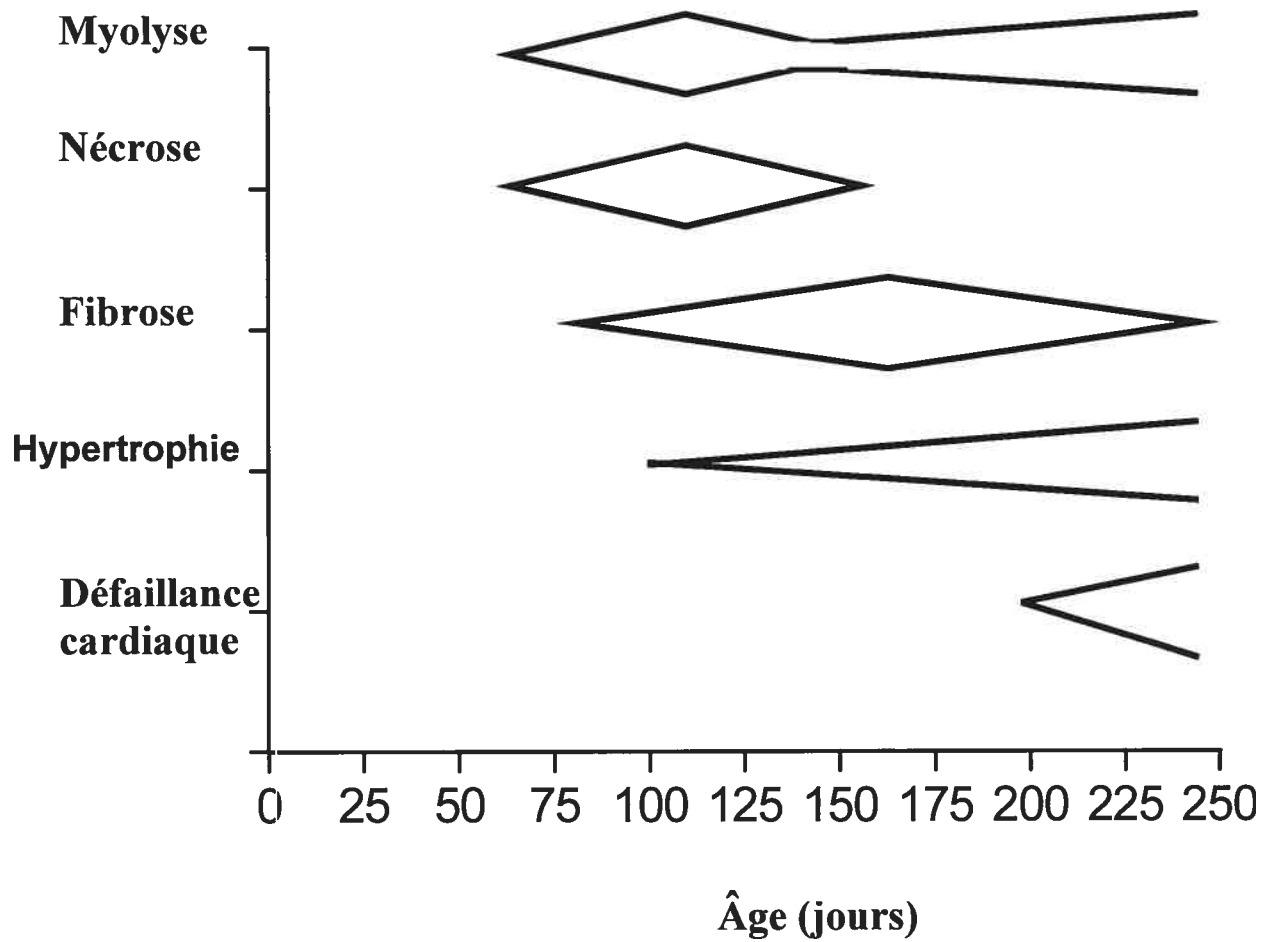


Figure 11. Évolution de la cardiomyopathie du hamster UM-X7.1

4.2. Le montage de Langendorff

Déjà plus de 100 années se sont écoulées depuis la mise au point, par Oscar Langendorff (1895;1897), de la première méthode permettant l'étude de l'activité mécanique d'un cœur de mammifère complètement isolé. Le principe est simple, il consiste à forcer du sang ou une solution pouvant mimer ses effets, par exemple le Krebs, vers le cœur par une canule insérée dans l'aorte ascendante. Cette pression ferme les valves aortiques – tout comme dans le cœur *in situ* en période de diastole – et permet la perfusion du cœur par le passage du perfusé dans les sinus coronariens situés à la base de l'aorte. Le perfusé se retrouve finalement dans l'oreillette droite et est expulsé, soit par l'ouverture laissée par l'excision des veines caves ou, par l'intermédiaire du ventricule droit, par l'artère pulmonaire sectionnée. L'utilisation d'un cylindre gradué conventionnel permet de recueillir le perfusé qui s'écoule de l'apex du cœur et de mesurer le flot coronarien moyen.

Dans sa forme la plus simple, le montage consiste en (1) un ballon d'approvisionnement en Krebs, (2) un échangeur de chaleur (serpentin), (3) une chambre permettant le contrôle de la chaleur et de l'humidité de l'environnement externe du cœur et (4) une chambre permettant l'emprisonnement de bulles d'air et la connexion à un autre ballon d'approvisionnement (5) (voir figure 2, p. 42). Le perfusé s'écoule du ballon d'approvisionnement (placé à la hauteur désirée afin d'établir le niveau de P_p) au cœur par l'intermédiaire de tuyaux de silicone flexibles qui font le lien entre les diverses composantes (1, 2, 4 et 5). Chaque composante est équipée d'une double paroi qui permet la circulation continue, par l'intermédiaire d'une pompe et d'un réseau de tubes supplémentaires, d'une eau chauffée à un niveau permettant de maintenir le Krebs à une température de 37°C. Afin de suppléer à l'utilisation du perfusé par le cœur, ce qui diminue le niveau de Krebs dans le ballon (1), un ballon supplémentaire (5) est utilisé afin de conserver une P_p constante. Cet approvisionnement se fait à l'aide d'une pompe qui est actionnée par l'expérimentateur, en temps voulu, tout au long de l'expérience (dans la figure 2, cet appareillage n'est pas illustré puisque la figure fait référence avant tout au système de perfusion à débit constant, dans lequel le ballon principal devient inutile). La

solution de Krebs contenue dans ces deux ballons est continuellement oxygénée par une bonbonne contenant un mélange d'oxygène et de CO₂ (95% et 5%, respectivement). La pression partielle en O₂ ainsi obtenue ($pO_2 \sim 650$ mm Hg) convient amplement afin de répondre à la demande myocardique en O₂.

4.2.1. Sélection de la pression de perfusion coronarienne

La Pp correspond à la pression aortique diastolique dans le cœur animal *in situ*. Dans le cœur isolé, la sélection d'une Pp adéquate se fera en considérant le modèle animal utilisé et les études qui comparent le métabolisme myocardique de ce modèle à une situation *in vivo*. Aussi, il sera tenu compte de la différence de viscosité qui existe entre le plasma et la solution de Krebs (la viscosité relative du plasma est deux fois supérieure à celle de l'eau). Ce dernier paramètre amènera l'expérimentateur à opter pour une Pp moins élevée que celle retrouvée chez l'animal intact.

4.2.2. Le ballon de latex

L'utilisation du ballon de latex a été introduit par Gottlieb et Magnus (1904). Il permet une mesure précise des pressions développées par le cœur isolé. L'insertion du ballon dans le ventricule gauche se fait par l'intermédiaire d'un cathéter en métal, sur lequel le ballon est initialement enroulé, puis par le passage de ce dernier à travers les veines pulmonaires, l'oreillette gauche et la valve mitrale.

Une fois cette opération terminée, un volume d'eau est injecté dans le ballon et la pression développée par le cœur peut être mesurée. Dans notre étude, la pression diastolique a été ajustée à 10 mm Hg. Ce standard a été obtenu à partir d'études préliminaires et correspond à la précharge qui induit une pression développée maximale par le cœur isolé.

4.2.3. Avantages et limites du modèle

La première raison pour l'utilisation d'un tel système afin de déterminer l'effet d'une substance sur le cœur est l'indépendance du cœur isolé par rapport aux influences neuro-hormonales, aux contraintes mécaniques, aux facteurs relâchés par les éléments circulants du sang et à l'apport en substrats par l'organisme. L'utilisation d'un ballon permet (1) d'exprimer la force développée et la précharge en unités de pression (mm Hg) et (2) de maintenir une précharge et une postcharge constante dans le cœur non stimulé. Lorsque stimulé, ces paramètres peuvent être modifiés; par exemple, l'infusion d'un agoniste β -adrénergique influence favorablement la précharge (pression ventriculaire gauche en fin de diastole) dans le cœur isolé de hamster normal et cardiomyopathique (160). De plus, le système de cœur isolé élimine l'influence des pressions de remplissage auriculaire et ventriculaire droit.

Les limites de ce modèle incluent la nature non-pulsatile de la perfusion. Parce que la pulsation est un puissant stimulus de la relâche basale de NO, il est concevable que cette préparation ait une relâche basale de NO plus basse comparée à un système *in vivo*. De plus, contrairement au cœur isolé qui est perfusé tout au long du cycle cardiaque, le débit coronarien d'un cœur intact est sous l'influence de la force et la durée de la systole. Pendant la systole, il se produit une importante compression des coronaires qui peut même entraîner un reflux partiel du débit coronarien vers l'aorte.

4.3. Modèles de perfusion coronarienne et forces mécaniques pariétales

L'interprétation de résultats provenant d'un système de cœur isolé perfusé à débit constant est complexe parce que cette condition affecte différemment les forces mécaniques qui agissent sur les parois vasculaires coronariennes. Les changements de résistance coronarienne dans un cœur intact mènent à une modification du débit, celui-ci étant maître de sa propre pression de perfusion (24).

Les forces mécaniques qui agissent sur la paroi vasculaire sont directement dépendantes de la pression et du débit, et l'implication de chacune se reflète différemment selon qu'il s'agit d'un système à débit ou à pression constante. Ces forces peuvent être divisées en deux groupes distincts : (1) les contraintes circonférentielles (σ) qui agissent tangentiellement sur la paroi et qui dépendent de trois facteurs : la pression (P), le diamètre vasculaire (r : rayon) et l'épaisseur de la paroi (h), peu utile ici, mais d'importance dans les mécanismes compensateurs (remodelage vasculaire) à long terme, ($\sigma = Pr/h$) et (2), les contraintes (ou forces) de cisaillement qui agissent longitudinalement à l'interface sang-endothélium, et qui sont liées directement à la vitesse (v) d'écoulement du sang ($v=B/r$ où B=débit et r=rayon) (161).

En conditions physiologiques normales, les mécanismes d'autorégulation du cœur (24) maintiennent un débit constant dans les coronaires (en modifiant de façon proportionnelle le diamètre des vaisseaux de résistance suivant un changement de P_p). C'est par ce mécanisme que le débit en amont d'une sténose (rétrécissement pathologique de la lumière d'un vaisseau) peut être maintenu, au repos. Dans un système à débit constant, ces mécanismes sont perturbés et des changements de la résistance ne se manifestent que par des variations de la pression coronarienne.

Le débit coronarien est aussi lié à la demande en O_2 myocardique par des ajustements locaux du tonus vasomoteur liés à des mécanismes de contrôle métabolique. Ce contrôle

local du débit coronarien tend à maintenir une PO_2 constante et donc une extraction en O_2 , constante (108). Ici encore, le coeur pourrait ne plus répondre adéquatement et une demande accrue en énergie (MVO_2) entraînerait une diminution de pression, sans pouvoir payer la dette énergétique.

Si l'on compare, en se référant aux équations vues ci-haut et en faisant abstraction des mécanismes compensateurs du cœur, l'impact immédiat qu'aurait une diminution du diamètre vasculaire (vasoconstriction) sur les deux systèmes de perfusion (pression et débit constants), on constate qu'à pression constante, σ diminuerait (baisse de r) et la baisse de Q tendrait à maintenir (en s'opposant à la baisse de r) les forces de cisaillement constantes. À débit constant, σ augmenterait et l'augmentation de P s'opposerait à la baisse de r .

Cet exemple rend compte des difficultés d'interprétation associées à l'utilisation d'un modulateur du tonus coronarien, tel est le cas pour le SNP dans notre modèle de perfusion; les effets directs du NO sur l'appareil contractile peuvent difficilement être séparés de ses effets vasculaires et de son influence sur les différents médiateurs pouvant affecter la performance cardiaque.

Dans notre étude, par l'observation concomitante des figures 4 et 5 (p. 49-50), on remarque que des augmentations du débit coronarien (courbe mécanique) entraînent des augmentations marquées des contraintes circonférentielles (σ): P et r augmentent. Le SNP atténue cette augmentation des forces pariétales en maintenant une résistance coronarienne constante.

In vivo, par les mécanismes d'autorégulation, l'augmentation de résistance s'oppose rapidement à l'augmentation de σ lorsque la P_p s'élève. À long terme, quand les tensions pariétales σ atteignent des niveaux physiopathologiques, elles sont compensées par un épaissement (h) de la paroi vasculaire et des changements dans sa composition. C'est ce mécanisme compensatoire (remodelage vasculaire) qui, à l'instar de

l'hypertrophie cardiaque, accompagne toute altération des contraintes mécaniques qui n'est plus normalisée.

Inversement, les contraintes de cisaillement sont aussi normalisées par l'augmentation compensatoire du diamètre vasculaire. À court terme, l'action du NO et de la prostacycline, libérés des cellules endothéliales en réponse au changement de débit, entraîne une relaxation du muscle lisse vasculaire sous-jacent et une augmentation du diamètre vasculaire (162). Le remodelage vasculaire à long terme impliquant les forces de cisaillement met en jeu la sécrétion de différentes protéases qui dégradent la limitante élastique interne, favorisant ainsi la distension du vaisseau. Cette augmentation du diamètre vasculaire s'accompagne toutefois d'une augmentation des contraintes circonférentielles (par augmentation de r) menant, à long terme, à l'hypertrophie de la média.

Dans notre étude, la Pp du groupe témoin atteint des niveaux élevés. À ces niveaux supra-physiologiques de pression – en gardant à l'esprit qu'elle fait référence à la pression diastolique – (courbe mécanique, +4 et +5ml/min, figure 4-B, p.49), les mécanismes qui s'opposent à la tension pariétale ne sont peut-être plus efficaces. Autre alternative : la baisse de résistance s'opposerait, dans cette condition particulière, à l'augmentation des forces de cisaillement.

4.4. Effets d'une augmentation mécanique du débit

4.4.1. Influence sur la fonction contractile du cœur : Effet Gregg

Il est désormais bien connu que l'effet Gregg se manifeste principalement dans des modèles de cœurs dont les mécanismes d'autorégulation sont altérés. Plusieurs études (3,5,7,23,163) ont montré qu'une augmentation de la Pp et/ou du flot coronarien augmentait la contractilité myocardique dans des préparations de cœurs isovolumiques et

non-travaillants lorsque la PVG et la vitesse de contraction étaient utilisées comme index de contractilité. De plus, Iwamoto et coll. ont montré qu'une augmentation de la Pp pouvait augmenter la force de contraction et la MVO_2 sans toutefois modifier la longueur des fibres en systole et diastole, puisque, selon eux, la rigidité du mur ventriculaire en systole contre-balançait le raccourcissement du muscle cardiaque (12). Miller et coll. n'ont trouvé aucun changement contractile dans des cœurs travaillants suite à une augmentation de la Pp alors qu'une opération similaire dans des cœurs isolés non-éjectants augmentait de façon indépendante la force de contraction ventriculaire gauche (23). Dans une autre étude, Bai et coll. ont montré que des changements de Pp affectaient la MVO_2 seulement lorsque l'autorégulation était inefficace (11). Inversement, ils n'observaient aucun changement de volume sanguin intra myocardique suite à des changements de Pp lorsque l'autorégulation était fonctionnelle.

Les effets observés dans notre étude sur le compartiment cardiaque sont semblables à ceux rapportés dans le cœur normal de hamster. Avec le même appareillage que celui employé dans notre étude, Beaucage et coll. ont mesuré des variations de Pp de +70 mm Hg lorsque le débit coronarien était ajusté à +4 ml/min par rapport au niveau de base. Malgré la divergence des écarts mesurés au niveau du compartiment vasculaire à ce palier de débit, les pressions diastolique et systolique ont grimpé similairement de +10 mm Hg et de +25 mmHg, respectivement (147).

Dans notre étude, qui est en accord avec celles de Bai et coll. (11), Miller et coll. (23) et Iwamoto et coll. (12), une augmentation du débit coronarien de +5 ml/min au-delà du niveau de base a mené, dans les groupes témoin et SNP, à une augmentation semblable de la PVG de 13 ± 4 mm Hg (figure 7-B, p. 52). Toutefois, l'effet Gregg n'était pas présent dans le groupe fréquence constante. Bien que la fréquence cardiaque du groupe fréquence constante ait été ajustée en fonction de l'effet chronotrope positif du SNP 10^{-6} M à pression constante, cette modification ne pouvait tenir compte de la baisse de fréquence observée dans les groupes contrôle et SNP lors du changement de mode de perfusion et tout au long des augmentations mécaniques du débit (figure 8, p. 53). Cette différence entre les groupes a mené à une fréquence cardiaque de base substantiellement

plus élevée dans le groupe fréquence constante (tableau II). Hors, il est possible que la fréquence élevée de ce groupe ait pu mener à une pression développée moins élevée. Parallèlement, l'effet de l'augmentation mécanique du débit sur la fréquence cardiaque (chronotrope négatif) observée dans le groupe témoin et SNP (figure 8) aurait pu mener à une pression développée plus élevée. Appuyant cette hypothèse, il a été montré que la relation force-fréquence était altérée dans la cardiomyopathie dilatée humaine (164) et qu'elle était inversée dans notre modèle animal de cardiomyopathie, signifiant que, contrairement au hamster sain chez qui la potentialisation fréquence-dépendante de la pression développée gauche était absente, une augmentation de la fréquence cardiaque chez le hamster UM-X7.1 conduisait à une diminution de la contractilité (73). De plus, une étude faite dans notre laboratoire chez le hamster normal n'a montré aucune variation de la fréquence cardiaque lorsque les cœurs étaient soumis à des augmentations mécaniques du débit coronarien (+2 à +10 ml/min) (147). Finalement, Slovut et coll. ont montré dans le cœur porcine normal non-travaillant que la décharge du nœud sinusal était couplée mécaniquement avec la Pp; la fréquence cardiaque moyenne augmentait de 25.8 ± 6.6 batt./min lorsque la Pp était augmenté de 40 à 110 mm Hg (165).

4.4.2. Effets sur la compliance diastolique

Salisbury et coll. ont montré dans le cœur travaillant de chien qu'une augmentation de la Pp coronarienne entraînait des élévations du volume vasculaire et de la rigidité du lit artériel coronarien, causant ainsi une augmentation de la PDVG par réduction de la compliance (6). Alors que peu d'études (37,38) sont en accord avec les conclusions de cette étude, d'autres (3,5,7,12) n'ont pu démontrer une telle relation dans des cœurs intacts ou non-travaillants. Dans le cœur isolé travaillant de chien, Iwamoto et coll. n'ont observé aucun changement de pression diastolique lorsque la Pp était augmentée par paliers successifs de 40 mm Hg (60 à 180 mm Hg) (12). Dans une autre étude faite dans des cœurs intacts ou isovolumiques (non-travaillants) de porcs, la pression diastolique gauche demeurait inchangée lorsque la Pp était augmentée de 80 mm Hg (23). Finalement, dans le même modèle animal que celui utilisé par Salisbury et coll., Arnold et

coll. ont rapporté une diminution de la pression diastolique gauche lorsque la Pp coronarienne passait de 85 ± 8 à 131 ± 9 mm Hg (3).

Dans notre modèle de perfusion à débit constant, nous avons montré que des augmentations physiologiques du débit coronarien (+1 à +5 ml/min) entraînaient une diminution de la compliance diastolique, telle qu'illustrée à la figure 6-A (p. 51) par une augmentation de la pression diastolique chez les trois groupes étudiés. Cet effet sur la pression diastolique n'était accompagné d'aucun changement de vitesse de relaxation (figure 6-B).

Puisque l'augmentation du volume coronarien est fortement suggérée comme étant le principal mécanisme pouvant expliquer ces changements de compliance, nous croyons que notre modèle de perfusion, utilisant des cœurs dénervés et présentant une autorégulation défailante, était particulièrement favorable à l'observation de ce phénomène. De plus, contrairement aux études dans lesquelles le débit coronarien a été changé en modifiant la Pp, nous avons augmenté le débit coronarien mécaniquement, ce qui pourrait avoir perturbé l'influence des mécanismes de contrôle métabolique et provoqué une plus grande élévation du volume coronarien. Cette hypothèse n'est toutefois pas appuyée par l'étude de Scharf et coll. qui montre que pour un changement de Pp approximativement égal (9-12 mm Hg), le volume coronarien (mesuré par changement de poids) augmentait davantage par l'élévation de la pression veineuse coronarienne que par l'augmentation mécanique du débit coronarien ($+3.2 \pm 0.4$ g et 0.8 ± 0.2 g, respectivement) (10). Soulignons toutefois que dans cette étude, le sinus coronarien était canulé et que l'augmentation de la pression sinusale se faisait en bloquant la ligne collectrice et non en augmentant la pression aortique. En condition physiologique, la pression veineuse est constante et les pressions aortique et artérielle coronariennes sont les mêmes (24).

4.5. Effets du SNP 10^{-6} M à pression constante et en présence de forces de cisaillement : Effets bénéfiques sur la relaxation myocardique

Dans cette étude, nous avons utilisé le nitroprussiate de sodium (SNP), un puissant nitrovasodilatateur à action rapide et largement utilisé en laboratoire. Le SNP serait métabolisé en NO par une enzyme de faible poids moléculaire (5 à 11 kDa) associée à la membrane du muscle lisse vasculaire (166). La présence d'agents réducteurs comme le NADPH, le NADH ou la cystéine ne semblerait pas nécessaire mais accentuerait largement l'activité de l'enzyme.

L'infusion de SNP à pression constante a modifié tous les paramètres mesurés dans cette étude (figure 9 et 10, p. 54-55). Dans l'étude de Grocott-Mason et coll., 5 minutes d'infusion avec une concentration de 10^{-6} M de SNP dans des cœurs normaux éjectant de cochon d'Inde stimulés électriquement a augmenté le débit d'un ordre de grandeur similaire (35-40%) à celui obtenu dans notre étude (34 ± 5 %) (120). Cependant, cette intervention n'a pas modifié les valeurs de pression diastolique, de pression développée gauche ou de vitesse de contraction telles qu'obtenues dans notre préparation de cœur isolé. Bien que d'autres facteurs tels la pathologie ou l'espèce animale puissent expliquer ces divergences, ces résultats suggèrent que les effets cardiaques observés dans notre étude proviennent essentiellement de l'effet vasodilatateur du SNP sur les coronaires et moins d'une action directe du NO sur les cardiomyocytes. Il est désormais bien connu que le NO peut augmenter la fréquence cardiaque indépendamment d'une activation du système nerveux autonome (167) par une stimulation GMPc-dépendante des canaux I_f du nœud sinusal (136). Dans notre étude, le SNP augmentait la fréquence cardiaque de 11 ± 3 %. Normalement, une augmentation de la vitesse de stimulation augmente l'amplitude de la vague calcique et abrège la durée de celle-ci, ce qui est compatible avec l'observation d'une augmentation de la PVG et des vitesses de relaxation et de contraction (168). Mais comme il est souligné plus haut, dans notre modèle animal, une augmentation de la fréquence cardiaque aurait plutôt tendance à diminuer la force de contraction plutôt qu'à l'augmenter. Un effet du NO, par l'activation de la voie GC/GMPc/PKG, sur l'affinité de la troponine C pour le Ca^{2+} est aussi envisageable (144).

Une telle action aurait pour effet d'augmenter la vitesse de relaxation et de diminuer la durée de la contraction. Aussi, l'activation de la voie AC/AMPC/PKA par un mécanisme NO et/ou GMPc-dépendant, telle qu'observée dans différentes études *in vitro* (135,139), *ex vivo* (124) et *in vivo* (169), entraînerait, en plus de l'action mentionnée plus haut sur la troponine C, un effet inotrope positif par l'activation des canaux Ca^{2+} de type L et une augmentation de la vitesse de séquestration du Ca^{2+} par le SERCA2 par phosphorylation de la phospholambane, augmentant ainsi la vitesse de relaxation (170) (voir figure 1, p.36). Une autre étude a montré que la phospholambane pouvait aussi être phosphorylé par la PKG au même site et taux que la PKA (86).

Aussi, il est bien connu qu'une augmentation du débit coronarien peut mener, par l'étirement des fibres myocardiques (mécanisme de Frank-Starling), à une augmentation de la performance cardiaque (115).

Le but principal de l'infusion du SNP à pression constante dans notre étude était de pouvoir comparer l'effet vasculaire du NO à une augmentation similaire du débit coronarien obtenue de façon mécanique, permettant ainsi de différencier l'effet direct du NO de ses effets vasculaires (effet Gregg) sur la fonction cardiaque. Nous avons donc comparé les variations des différents paramètres cardiaques lorsque le débit était augmenté par le SNP 10^{-6}M à pression constante (2.4 ± 0.4 ml/min) à celles obtenues par une augmentation mécanique du débit coronarien de +2 ml/min au-delà des niveaux de base. La vasodilatation induite par le SNP 10^{-6}M a eu un effet semblable sur la pression développée gauche lorsque comparé à l'effet mécanique (4 ± 1 et 9 ± 2 mm Hg, respectivement), malgré une tendance vers une PVG plus petite avec le vasodilatateur. La différence est toutefois marquée si l'on compare les pressions systoliques (SNP : 6 ± 1 ; mécanique, 13 ± 2 mm Hg, $P < 0.05$) et diastoliques (SNP, 2 ± 0 ; mécanique, 5 ± 1 mm Hg, $P < 0.01$). Malgré ces effets sur les pressions systoliques et diastoliques, aucune différence entre les vitesses de contraction et de relaxation n'a été mesurée.

En éliminant l'effet strictement vasculaire du NO, on constate que le SNP à 10^{-6}M se comporte davantage comme un agent lusitrope positif et sans effet inotrope significatif

(PVG) dans le cœur de hamster isolé et perfusé à pression constante. Cette conclusion est en accord avec les études *in vitro* de Diamond et coll. (171) et Weirich et coll. (145) mais à l'encontre de ce qui est rapporté par Kamelgard et coll. qui stipulent que le NO agit comme un agent inotrope positif dans le cœur de rat perfusé par la méthode de Langendorff (121). Toutefois, ils baseront leur conclusion en affirmant qu'il a été montré que l'augmentation maximale de MVO_2 , strictement par augmentation du flot coronarien, était de 10% et qu'on ne pouvait expliquer l'augmentation de MVO_2 de 49% obtenue dans leur étude que par un effet direct du NO sur le myocarde. Hors, des augmentations de MVO_2 variant de 10 à 60% ont été mesurées par Iwamoto et coll., Miller et coll. et Abel et Reiss lorsque le débit coronarien était varié par augmentation de Pp dans des préparations de cœur isolé (7,12,23).

Nous avons aussi montré que la relâche de NO par le SNP pouvait atténuer la détérioration diastolique provoquée par une augmentation du débit coronarien de +2 et +3 ml/min sans affecter l'état contractile associé à ces mêmes paliers d'augmentation du débit. Est-il possible que la différence entre les niveaux de base de Pp ait eu une influence sur l'effet relaxant observé? Nous ne pouvons écarter complètement cette hypothèse, ce qui expliquerait, en partie, pourquoi cet effet relaxant n'a pas été observé à plus fort débit; à ces paliers d'augmentation, la différence entre les Pp de base des groupes témoin et SNP s'atténue pour finalement devenir inexistante à +5 ml/min (figure 4-B, p. 49). Aussi, l'absence d'effet sur la relaxation à +1 ml/min pourrait s'expliquer par le fait que cette augmentation n'était pas suffisante pour produire un effet significatif. Toutefois, pour que ces explications soient valables, il faudrait qu'une différence entre les niveaux de base Pp lors d'une augmentation mécanique du débit puisse affecter préférentiellement le tonus diastolique, ce qui n'a jamais été démontré dans le cœur isolé non-travaillant.

Cette étude rejoint les conclusions d'un nombre important de travaux qui attribuent au NO et à son principal second messenger, le GMPc, des effets relaxants sur le myocarde. Plusieurs études cliniques ont montré que la nitroglycérine et le SNP, deux donneurs de NO, avaient des effets bénéfiques sur la compliance ventriculaire gauche

(92,101,102,107,110). Bien qu'initialement on attribua ces effets à un volume ventriculaire plus petit suivant une réduction de la précharge (principalement par vénéodilatation) et de la postcharge, certaines de ces études ont montré que pour expliquer un déplacement vers le bas de la courbe pression diastolique-volume, les effets bénéfiques diastoliques du NO doivent être expliqués par un effet de ce dernier sur d'autres facteurs tels les propriétés mécaniques du myocarde et les influences externes.

Dans une étude *ex vivo*, Grocott-Mason et coll. vont proposer un nouveau mécanisme par lequel le NO puisse moduler les propriétés diastoliques du cœur (120). Dans cette étude, le SNP (10^{-7} - 10^{-5} M) augmentait la vitesse de relaxation en causant un déclin prématuré du début de la relaxation. Les études *in vitro* qui se sont intéressées aux effets diastoliques du NO/GMPc ont rapporté une réduction de la réponse relative des myofilaments au Ca^{2+} associée à une diminution du tonus diastolique, manifestée par une augmentation de la longueur des myofibrilles au repos (139,142,144). Cette hypothèse était supportée par l'habileté du KT5823, un inhibiteur de la kinase dépendante du GMPc (PKG), à inhiber cet effet (139,144). La phosphorylation de la troponine I par la PKG est un mécanisme bien connu permettant de réduire l'affinité de la troponine C pour le Ca^{2+} intra cellulaire (172).

Dans notre étude, nous ne pouvons affirmer si l'effet relaxant du NO était gouverné par une augmentation des taux de GMPc myocardiques et par l'activation de la PKG. Toutefois, cette hypothèse est plausible puisque la diminution modérée de l'affinité des myofibrilles cardiaques au Ca^{2+} ne mène pas nécessairement à une diminution de la contractilité dans le cœur isolé (120).

Est-il possible que l'effet observé provenait non pas d'un effet direct du NO mais de la relâche de facteurs cardioactifs des endothéliums vasculaire et endocardique? Cette possibilité n'a pas été vérifiée dans notre étude. Ce ou ces facteurs devraient toutefois présenter des effets similaires à ceux du NO, c'est-à-dire, un effet marqué sur la relaxation myocardique. Une étude rapporte l'existence d'un facteur non-identifié libéré de l'endothélium endocardique qui présentait des effets relaxants similaires au NO dans

des cardiomyocytes isolés (173). Finalement, le NO pourrait protéger le myocarde des médiateurs impliqués dans la détérioration de la relaxation. Dans une étude faite dans des cœurs et ventricules isolés de rat, il est suggéré que le NO puisse contre-carrer les effets néfastes de l'endothéline (ET-1) sur la PDVG (174). Alors que l'élévation de la pression diastolique orchestrée par l'endothéline (0.5 et 5 nM) était accentuée par le L-NAME (10^{-6} M), elle était totalement bloquée par le SNAP (10^{-6} M), un donneur de NO, ou le 8-bromo-GMPc (50 μ M). De plus, aucun de ces traitements n'a eu un effet sur l'action inotrope positive de l'endothéline dans les deux préparations utilisées, ce qui supporte l'hypothèse qu'une telle interaction ait pu jouer un rôle dans notre étude.

Une autre idée intéressante afin d'expliquer nos résultats est l'influence que le NO pourrait avoir sur la distribution du flot coronarien myocardique dans le cœur isolé. Un déplacement du volume coronarien du compartiment endocardique vers le compartiment épicaudique aurait pu diminuer la rigidité endocardique et permettre une meilleure relaxation. Et une redistribution du flot coronarien vers l'endocarde pourrait se produire à plus fort débit. Bien que spéculative, cette hypothèse est appuyée par une étude faite chez le chien dans laquelle le SNP augmente le ratio du flot épicaudique/endocardique seulement en modifiant le flot sanguin épicaudique (175).

L'utilisation du modèle de perfusion de Langendorff a permis l'élimination de plusieurs facteurs qui aurait pu expliquer l'effet bénéfique du SNP sur la pression diastolique tels que l'influence du système nerveux autonome, du remplissage ventriculaire (vitesses de remplissage) et de diverses influences externes (ventricule droit, péricarde, oreillettes). C'est pourquoi ces facteurs n'ont pas été discutés dans la présente section.

En conclusion, cette étude a montré (1) que des augmentations du débit coronarien de +1 à +5 ml/min dans le cœur défaillant de hamster UM-X7.1 affectaient le compartiment coronarien, en entraînant des augmentations de P_p , et cardiaque, en augmentant la pression diastolique, la PVG et en diminuant la fréquence cardiaque, sans toutefois modifier les autres paramètres cardiaques; (2) que l'infusion de SNP 10^{-6} M à pression constante produisait des effets diastoliques bénéfiques lorsque comparé à l'effet d'une

augmentation similaire de débit coronarien produit mécaniquement; et (3) que le SNP agissait comme un agent protecteur en atténuant la détérioration de la pression diastolique aux augmentations mécaniques du débit coronarien de +2 et +3 ml/min. Nous proposons que l'utilisation du SNP de façon aiguë dans la défaillance cardiaque associée à la cardiomyopathie puisse être bénéfique dans cet état pathologique où les propriétés diastoliques du myocarde sont altérées.

5.0. RÉFÉRENCES

1. Gregg D. Regulation of collateral and coronary circulation of the heart. *Circulat. Proceedings, Harvey Tercentenary Congress*. 1958:168.
2. Gregg D. Effect of coronary perfusion pressure or coronary flow on oxygen usage of the myocardium. *Circ. Res.* 1963;13:497-500.
3. Arnold G, Kosche F, Miessner E, Neitzert A, Lochner W. The importance of the perfusion pressure in the coronary arteries for the contractility and the oxygen consumption of the heart. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere*. 1968;299:339-56.
4. Sarnoff S, Gilmor, J., Skinner, N., Wallace, A., Mitchell, J. Relation between coronary blood flow and myocardial oxygen consumption. *Circ. Res.* 1963;13:514-21.
5. Templeton G, Wildenthal K, Mitchell J. Influence of coronary blood flow on left ventricular contractility and stiffness. *Am J Physiol*. 1972;223:1216-20.
6. Salisbury P, Cross, CE, Rieben, PA. Influence of coronary artery pressure upon myocardial elasticity. *Circ. Res.* 1960;8:794.
7. Abel R, Reis R. Effects of coronary blood flow and perfusion pressure on left ventricular contractility in dogs. *Circ Res.* 1970;27:961-71.
8. Downey J. Myocardial contractile force as a function of coronary blood flow. *Am J Physiol*. 1976;230:1-6.
9. Schouten V, Allaart C, Westerhof N. Effect of perfusion pressure on force of contraction in thin papillary muscles and trabeculae from rat heart. *J Physiol*. 1992;451:585-604.
10. Scharf S, Bromberger-Barnea B. Influence of coronary flow and pressure on cardiac function and coronary vascular volume. *Am J Physiol*. 1973;224:918-25.

11. Bai X, Iwamoto T, Williams A, Fan W, Downey H. Coronary pressure-flow autoregulation protects myocardium from pressure-induced changes in oxygen consumption. *Am J Physiol.* 1994;266:H2359-68.
12. Iwamoto T, Bai X, Downey H. Coronary perfusion related changes in myocardial contractile force and systolic ventricular stiffness. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1331-6.
13. May-Newman K, Omens J, Pavelec R, McCulloch A. Three-dimensional transmural mechanical interaction between the coronary vasculature and passive myocardium in the dog. *Circ Res.* 1994;74:1166-78.
14. Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
15. Brutsaert D, Meulemans A, Sipido K, Sys S. Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle. *Circ Res.* 1988;62:358-66.
16. Li K, Rouleau J, Andries L, Brutsaert D. Effect of dysfunctional vascular endothelium on myocardial performance in isolated papillary muscles. *Circ Res.* 1993;72:768-77.
17. Ramaciotti C, McClellan G, Sharkey A, Rose D, Weisberg A, Winegrad S. Cardiac endothelial cells modulate contractility of rat heart in response to oxygen tension and coronary flow. *Circ Res.* 1993;72:1044-64.
18. McClellan G, Weisberg A, Kato N, Ramaciotti C, Sharkey A, Winegrad S. Contractile proteins in myocardial cells are regulated by factor(s) released by blood vessels. *Circ Res.* 1992;70:787-803.
19. Dijkman M, Heslinga J, Allaart C, Sipkema P, Westerhof N. Reoxygenated effluent of Tyrode-perfused heart affects papillary muscle contraction independent of cardiac perfusion. *Cardiovasc Res.* 1997;33:45-53.

20. Dijkman M, Heslinga J, Sipkema P, Westerhof N. Perfusion-induced changes in cardiac O₂ consumption and contractility are based on different mechanisms. *Am J Physiol.* 1996;271:H984-9.
21. Schulz R, Guth B, Heusch G. No effect of coronary perfusion on regional myocardial function within the autoregulatory range in pigs. Evidence against the Gregg phenomenon. *Circulation.* 1991;83:1390-403.
22. Schwartz G, Schaefer S, Trocha S, Garcia J, Steinman S, Massie B, Weiner M. Effect of supranormal coronary blood flow on energy metabolism and systolic function of porcine left ventricle. *Cardiovasc Res.* 1992;26:1001-6.
23. Miller W, Nellis S, Liedtke A, Whitesell L, Effron B. Coronary hyperperfusion and ventricular function in intact and isovolumic pig hearts. *Am J Physiol.* 1990;258:H500-7.
24. Feigl E. Coronary autoregulation. *J Hypertens Suppl.* 1989;7:S55-8; discussion S59.
25. Rouleau J, Boerboom L, Surjadhana A, Hoffman J. The role of autoregulation and tissue diastolic pressures in the transmural distribution of left ventricular blood flow in anesthetized dogs. *Circ Res.* 1979;45:804-15.
26. Dijkman M, Heslinga J, Sipkema P, Westerhof N. Perfusion-induced changes in cardiac contractility and oxygen consumption are not endothelium-dependent. *Cardiovasc Res.* 1997;33:593-600.
27. Dijkman M, Heslinga J, Sipkema P, Westerhof N. Perfusion-induced changes in cardiac contractility depend on capillary perfusion. *Am J Physiol.* 1998;274:H405-10.
28. Dankelman J, Stassen H, Spaan J. Interaction between Gregg's phenomenon and coronary flow control: a model study. *Med Biol Eng Comput.* 1999;37:742-9.

29. Dankelman J, Stassen H, Spaan J. System analysis of the dynamic response of the coronary circulation to a sudden change in heart rate. *Med Biol Eng Comput.* 1990;28:139-48.
30. Kanatsuka H, Sekiguchi N, Sato K, Akai K, Wang Y, Komaru T, Ashikawa K, Takishima T. Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circ Res.* 1992;71:912-22.
31. Daut J, Maier-Rudolph W, von BN, Mehrke G, Gunther K, Goedel-Meinen L. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science.* 1990;247:1341-4.
32. Brutsaert D, Sys S. Relaxation and diastole of the heart. *Physiol Rev.* 1989;69:1228-315.
33. Gillebert T, Sys S, Brutsaert D. Influence of loading patterns on peak length-tension relation and on relaxation in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol.* 1989;13:483-90.
34. Brutsaert D, Housmans P, Goethals M. Dual control of relaxation. Its role in the ventricular function in the mammalian heart. *Circ Res.* 1980;47:637-52.
35. Gaasch W, Bernard S. The effect of acute changes in coronary blood flow on left ventricular end-diastolic wall thickness. An echocardiographic study. *Circulation.* 1977;56:593-8.
36. Gaasch W, Bing O, Franklin A, Rhodes D, Bernard S, Weintraub R. The influence of acute alterations in coronary blood flow on left ventricular diastolic compliance and wall thickness. *Eur J Cardiol.* 1978;7 Suppl:147-61.
37. Olsen C, Attarian D, Jones R, Hill R, Sink J, Lee K, Wechsler A. The coronary pressure-flow determinants left ventricular compliance in dogs. *Circ Res.* 1981;49:856-65.

38. Vogel W, Apstein C, Briggs L, Gaasch W, Ahn J. Acute alterations in left ventricular diastolic chamber stiffness. Role of the "erectile" effect of coronary arterial pressure and flow in normal and damaged hearts. *Circ Res.* 1982;51:465-78.
39. Furchgott R, Cherry P, Zawadzki J, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984;6 Suppl 2:S336-43.
40. Furchgott R. An historical survey and prospects of research on EDRF. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi.* 1987;23:435-40.
41. Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns R, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:9265-9.
42. Palmer R, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-6.
43. Andrews K, Triggle C, Ellis A. NO and vasculature: Where does it come from and what does it do? *Heart Failure Reviews.* 2002;7:423-45.
44. Kerwin J, Lancaster J, Feldman P. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem.* 1995;38:4343-62.
45. Digerness S, Harris K, Kirklin J, Urthaler F, Viera L, Beckman J, Darley-Usmar V. Peroxynitrite irreversibly decreases diastolic and systolic function in cardiac muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1386-92.
46. Dinh Xuan A. Prix Nobel de médecine 1998, Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad, Nobel 98 : la part belle au NO. *médecine/sciences.* 1998;14:1297-9.
47. Lancaster J. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:8137-41.

48. Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, Tombouliau P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored *in situ* by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193:1076-82.
49. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler J. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 1996;380:221-6.
50. Poyart C, Bursaux, E. L'hémoglobine, le NO, les complexes protéiques nitrosylés et la régulation de la pression vasculaire. *médecine/sciences*. 1996;12:848.
51. Brown G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett*. 1995;369:136-9.
52. Vadon-Le Goff S, Sennequier, N. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *médecine/sciences*. 1998;14.
53. Presta A, Siddhanta U, Wu C, Sennequier N, Huang L, Abu-Soud H, Erzurum S, Stuehr D. Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 1998;37:298-310.
54. Venema R, Ju H, Zou R, Ryan J, Venema V. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem*. 1997;272:1276-82.
55. Titheradge M. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:437-55.
56. Jugdutt B. Nitric oxide in heart failure: friend or foe. *Heart Fail rev*. 2002;7:385-9.
57. Hellermann G, Solomonson L. Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997;272:12030-4.

58. Jaffrey S, Snyder S. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science*. 1996;274:774-7.
59. Guo F, De RH, Rice T, Stuehr D, Thunnissen F, Erzurum S. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7809-13.
60. Ziegler T, Silacci P, Harrison V, Hayoz D. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension*. 1998;32:351-5.
61. Chang C, Liao J, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol*. 1998;274:H342-8.
62. Boucher J, Custot J, Vadon S, Delaforge M, Lepoivre M, Tenu J, Yapo A, Mansuy D. N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:1614-21.
63. Feng Q, Lu X, Fortin A, Pettersson A, Hedner T, Kline R, Arnold J. Elevation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 1998;37:667-75.
64. Buxton I, Cheek D, Eckman D, Westfall D, Sanders K, Keef K. NG-nitro L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res*. 1993;72:387-95.
65. Sennequier N, Stuehr D. Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry*. 1996;35:5883-92.
66. Balligand J, Kobzik L, Han X, Kaye D, Belhassen L, O'Hara D, Kelly R, Smith T, Michel T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1995;270:14582-6.

67. Schulz R, Smith J, Lewis M, Moncada S. Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br J Pharmacol*. 1991;104:21-4.
68. Reiling N, Ulmer A, Duchrow M, Ernst M, Flad H, Hauschildt S. Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur J Immunol*. 1994;24:1941-4.
69. Han X, Kobzik L, Balligand J, Kelly R, Smith T. Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca^{2+} current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res*. 1996;78:998-1008.
70. Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol*. 1992;105:575-80.
71. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith T, Kelly R, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996;271:22810-4.
72. Balligand J, Kelly R, Marsden P, Smith T, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:347-51.
73. Markiewicz W, Wu S, Sievers R, Parmley W, Higgins C, James T, Jasmin G, Wikman-Coffelt J. Influence of heart rate on metabolic and hemodynamic parameters in the Syrian hamster cardiomyopathy. *Am Heart J*. 1987;114:362-8.
74. Finkel M, Oddis C, Mayer O, Hattler B, Simmons R. Nitric oxide synthase inhibitor alters papillary muscle force-frequency relationship. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272:945-52.
75. Kaye D, Wiviott S, Balligand J, Simmons W, Smith T, Kelly R. Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1996;78:217-24.

76. Smith T, Canty J. Modulation of coronary autoregulatory responses by nitric oxide. Evidence for flow-dependent resistance adjustments in conscious dogs. *Circ Res.* 1993;73:232-40.
77. Fattoum A. Régulation de la contraction du muscle lisse. *médecine/sciences.* 1997;13:777-89.
78. Etter E, Eto M, Wardle R, Brautigan D, Murphy R. Activation of myosin light chain phosphatase in intact arterial smooth muscle during nitric oxide-induced relaxation. *J Biol Chem.* 2001;276:34681-5.
79. Blatter L, Wier W. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium.* 1994;15:122-31.
80. Bolotina V, Najibi S, Palacino J, Pagano P, Cohen R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368:850-3.
81. Hampl V, Huang J, Weir E, Archer S. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol Res.* 1995;44:39-44.
82. Furukawa K, Nakamura H. Cyclic GMP regulation of the plasma membrane $(Ca^{2+}-Mg^{2+})ATPase$ in vascular smooth muscle. *J Biochem (Tokyo).* 1987;101:287-90.
83. Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. Cyclic GMP stimulates Na^+/Ca^{2+} exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem.* 1991;266:12337-41.
84. Luo D, Nakazawa M, Ishibashi T, Kato K, Imai S. Putative, selective inhibitors of sarcoplasmic reticulum $Ca^{+}(+)$ -pump ATPase inhibit relaxation by nitroglycerin and atrial natriuretic factor of the rabbit aorta contracted by phenylephrine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;265:1187-92.

85. Sutliff R, Hoying J, Kadambi V, Kranias E, Paul R. Phospholamban is present in endothelial cells and modulates endothelium-dependent relaxation. Evidence from phospholamban gene-ablated mice. *Circ Res.* 1999;84:360-4.
86. Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J.* 1988;252:269-73.
87. Karczewski P, Hendrichke T, Wolf W, Morano I, Bartel S, Schrader J. Phosphorylation of phospholamban correlates with relaxation of coronary artery induced by nitric oxide, adenosine, and prostacyclin in the pig. *J Cell Biochem.* 1998;70:49-59.
88. Sarcevic B, Brookes V, Martin T, Kemp B, Robinson P. Atrial natriuretic peptide-dependent phosphorylation of smooth muscle cell particulate fraction proteins is mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1989;264:20648-54.
89. Cornwell T, Pryzwansky K, Wyatt T, Lincoln T. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 1991;40:923-31.
90. Cohen R, Weisbrod R, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina V. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store-operated Ca^{2+} influx. *Circ Res.* 1999;84:210-9.
91. Weisbrod R, Griswold M, Yaghoubi M, Komalavilas P, Lincoln T, Cohen R. Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1998;125:1695-707.

92. Paulus W, Lorell B, Craig W, Wynne J, Murgo J, Grossman W. Comparison of the effects of nitroprusside and nifedipine on diastolic properties in patients with hypertrophic cardiomyopathy: altered left ventricular loading or improved muscle inactivation? *J Am Coll Cardiol*. 1983;2:879-86.
93. Ross J. Mechanisms of cardiac contraction. What roles for preload, afterload and inotropic state in heart failure? *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl A:19-28.
94. Pouleur H, Covell J, Ross J. Effects of nitroprusside on venous return and central blood volume in the absence and presence of acute heart failure. *Circulation*. 1980;61:328-37.
95. Kieback A, Iven H, Stolzenburg K, Baumann G. Saterinone, dobutamine, and sodium nitroprusside: comparison of cardiovascular profiles in patients with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32:629-36.
96. Mani M. Nitroprusside revisited. *Br Med J*. 1971;3:407-8.
97. Franciosa J, Limas C, Guiha N, Rodriguera E, Cohn J. Improved left ventricular function during nitroprusside infusion in acute myocardial infarction. *Lancet*. 1972;1:650-4.
98. Goodman D, Rossen R, Holloway E, Alderman E, Harrison D. Effect of nitroprusside on left ventricular dynamics in mitral regurgitation. *Circulation*. 1974;50:1025-32.
99. Bolen J, Alderman E. Hemodynamic consequences of afterload reduction in patients with chronic aortic regurgitation. *Circulation*. 1976;53:879-83.
100. Guiha N, Cohn J, Mikulic E, Franciosa J, Limas C. Treatment of refractory heart failure with infusion of nitroprusside. *N Engl J Med*. 1974;291:587-92.
101. Capomolla S, Pozzoli M, Opasich C, Febo O, Riccardi G, Salvucci F, Maestri R, Sisti M, Cobelli F, Tavazzi L. Dobutamine and nitroprusside infusion in patients

- with severe congestive heart failure: hemodynamic improvement by discordant effects on mitral regurgitation, left atrial function, and ventricular function. *Am Heart J.* 1997;134:1089-98.
102. Brodie B, Grossman W, Mann T, McLaurin L. Effects of sodium nitroprusside on left ventricular diastolic pressure-volume relations. *J Clin Invest.* 1977;59:59-68.
 103. Gaasch W, Cole J, Quinones M, Alexander J. Dynamic determinants of left ventricular diastolic pressure-volume relations in man. *Circulation.* 1975;51:317-23.
 104. Junemann M, Smiseth O, Refsum H, Sievers R, Lipton M, Carlsson E, Tyberg J. Quantification of effect of pericardium on LV diastolic PV relation in dogs. *Am J Physiol.* 1987;252:H963-8.
 105. Maruyama Y, Nunokawa T, Koiwa Y, Isoyama S, Ikeda K, Ino-Oka E, Takishima T. Mechanical interaction between the ventricles. *Basic Res Cardiol.* 1983;78:544-59.
 106. Maughan W, Kallman C, Shoukas A. The effect of right ventricular filling on the pressure-volume relationship of ejecting canine left ventricle. *Circ Res.* 1981;49:382-8.
 107. Ludbrook P, Byrne J, Kurnik P, McKnight R. Influence of reduction of preload and afterload by nitroglycerin on left ventricular diastolic pressure-volume relations and relaxation in man. *Circulation.* 1977;56:937-43.
 108. Crystal G, Gurevicius J. Nitric oxide does not modulate myocardial contractility acutely in in situ canine hearts. *Am J Physiol.* 1996;270:H1568-76.
 109. Sherman A, Davis C, Klocke F, Harris K, Srinivasan G, Yaacoub A, Quinn D, Ahlin K, Jang J. Blockade of nitric oxide synthesis reduces myocardial oxygen consumption in vivo. *Circulation.* 1997;95:1328-34.

110. Hayashida W, Kumada T, Kohno F, Noda M, Ishikawa N, Kambayashi M, Kawai C. Left ventricular relaxation in dilated cardiomyopathy: relation to loading conditions and regional nonuniformity. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20:1082-91.
111. Guo X, Kedem J, Weiss H, Tse J, Roitstein A, Scholz P. Effect of cyclic GMP reduction on regional myocardial mechanics and metabolism in experimental left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27:392-400.
112. Roitstein A, Kedem J, Cheinberg B, Weiss H, Tse J, Scholz P. The effect of intracoronary nitroprusside on cyclic GMP and regional mechanics is altered in a canine model of left ventricular hypertrophy. *J Surg Res.* 1994;57:584-90.
113. Kal J, Van WH, Porsius M, Vergroesen I, Spaan J. Metabolic coronary-flow regulation and exogenous nitric oxide in human coronary artery disease: assessment by intravenous administration of nitroglycerin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35:7-15.
114. Amrani M, O'Shea J, Allen N, Harding S, Jayakumar J, Pepper J, Moncada S, Yacoub M. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J Physiol.* 1992;456:681-7.
115. Prendergast B, Sagach V, Shah A. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. *Circulation.* 1997;96:1320-9.
116. Mankad P, Yacoub M. Influence of basal release of nitric oxide on systolic and diastolic function of both ventricles. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;113:770-6.
117. Crozatier B. Stretch-induced modifications of myocardial performance: from ventricular function to cellular and molecular mechanisms. *Cardiovasc Res.* 1996;32:25-37.
118. Allen D, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* 1982;327:79-94.

119. Hibberd M, Jewell B. Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *J Physiol*. 1982;329:527-40.
120. Grocott-Mason R, Fort S, Lewis M, Shah A. Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am J Physiol*. 1994;266:H1699-705.
121. Kamelgard J, Crestanello J, Fullerton D, Whitman G. Nitric oxide as a positive inotropic agent in isolated rat hearts. *J Surg Res*. 1995;59:482-4.
122. Schwarz P, Diem R, Dun N, Forstermann U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ Res*. 1995;77:841-8.
123. Weiss H, Sadoff J, Scholz P, Klabunde R. Nitric oxide reduces myocardial contractility in isoproterenol-stimulated rat hearts by a mechanism independent of cyclic GMP or cyclic AMP. *Pharmacology*. 1997;55:202-10.
124. De MP, De HS, Van KR, Adriaensen H, Gillebert T. Sodium nitroprusside enhances in vivo left ventricular function in beta-adrenergically stimulated rabbit hearts. *Cardiovasc Res*. 1998;38:133-9.
125. George W, Polson J, O'Toole A, Goldberg N. Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970;66:398-403.
126. Goldberg N, Haddox M, Nicol S, Glass D, Sanford C, Kuehl F, Estensen R. Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Yin Yang hypothesis. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1975;5:307-30.
127. Diamond J, Ten ER, Trapani A. Are increases in cyclic GMP levels responsible for the negative inotropic effects of acetylcholine in the heart? *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;79:912-8.

128. Lincoln T, Keely S. Effects of acetylcholine and nitroprusside on cGMP-dependent protein kinase in the perfused rat heart. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1980;6:83-91.
129. MacDonell K, Diamond J. Cyclic GMP-dependent protein kinase activation in the absence of negative inotropic effects in the rat ventricle. *Br J Pharmacol.* 1997;122:1425-35.
130. Tohse N, Sperelakis N. cGMP inhibits the activity of single calcium channels in embryonic chick heart cells. *Circ Res.* 1991;69:325-31.
131. Mery P, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem.* 1993;268:26286-95.
132. Mery P, Lohmann S, Walter U, Fischmeister R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:1197-201.
133. Wahler G, Dollinger S. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol.* 1995;268:C45-54.
134. Wahler G, Rusch N, Sperelakis N. 8-Bromo-cyclic GMP inhibits the calcium channel current in embryonic chick ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990;68:531-4.
135. Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter K, Piper H, Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 1996;78:91-101.

136. Yoo S, Lee S, Choi B, Yeom J, Ho W, Earm Y. Dual effect of nitric oxide on the hyperpolarization-activated inward current (I_f) in sino-atrial node cells of the rabbit. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:2729-38.
137. Mohan P, Sys S, Brutsaert D. Positive inotropic effect of nitric oxide in myocardium. *Int J Cardiol.* 1995;50:233-7.
138. Mohan P, Brutsaert D, Paulus W, Sys S. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation.* 1996;93:1223-9.
139. Vila-Petroff M, Younes A, Egan J, Lakatta E, Sollott S. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res.* 1999;84:1020-31.
140. Lander H, Sehajpal P, Novogrodsky A. Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins. *J Immunol.* 1993;151:7182-7.
141. Miyamoto A, Laufs U, Pardo C, Liao J. Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. *J Biol Chem.* 1997;272:19601-8.
142. Shah A, Spurgeon H, Sollott S, Talo A, Lakatta E. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ Res.* 1994;74:970-8.
143. Ito N, Bartunek J, Spitzer K, Lorell B. Effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside on intracellular pH and contraction in hypertrophied myocytes. *Circulation.* 1997;95:2303-11.
144. Kaye D, Wiviott S, Kelly R. Activation of nitric oxide synthase (NOS3) by mechanical activity alters contractile activity in a Ca²⁺-independent manner in cardiac myocytes: role of troponin I phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256:398-403.

145. Weyrich A, Ma X, Buerke M, Murohara T, Armstead V, Lefer A, Nicolas J, Thomas A, Lefer D, Vinten-Johansen J. Physiological concentrations of nitric oxide do not elicit an acute negative inotropic effect in unstimulated cardiac muscle. *Circ Res*. 1994;75:692-700.
146. Bing R, Yamamoto T, Yamamoto M, Kakar R, Cohen A. New look at myocardial infarction: toward a better aspirin. *Cardiovasc Res*. 1999;43:25-31.
147. Beaucage P, Massicotte J, Jasmin G, Dumont L. Role of nitric oxide synthase, cytochrome p-450, and cyclooxygenase in the inotropic and lusitropic cardiac response to increased coronary perfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2002;40:96-105.
148. Homberger F ea. Primary, generalized polymyopathie and cardiac necrosis in an inbred line of Syrian hamster. *Med. exp. (Basel)*. 1962;6:339-45.
149. Homberger F. Hereditary myopathy in the Syrian hamster : Studies on pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1966;138:14-27.
150. Proschek L, Jasmin G. Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the Syrian hamster. II. Development of heart necrotic changes in relation to defective mitochondrial function. *Muscle Nerve*. 1982;5:26-32.
151. Malhotra A. Regulatory proteins in hamster cardiomyopathy. *Circ Res*. 1990;66:1302-9.
152. Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyo-oka T, Hanaoka F. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13873-8.

153. Harrow J, Singh J, Jasmin G, Dhalla N. Studies on adenylate cyclase-cyclic AMP system of the myopathic hamster (UM-X7.1) skeletal and cardiac muscles. *Can J Biochem.* 1975;53:1122-7.
154. Wagner J, Weisman H, Snowman A, Reynolds I, Weisfeldt M, Snyder S. Alterations in calcium antagonist receptors and sodium-calcium exchange in cardiomyopathic hamster tissues. *Circ Res.* 1989;65:205-14.
155. Owens K, Weglicki W, Ruth R, Stam A, Sonnenblick E. Lipid composition, Ca²⁺ uptake and Ca²⁺-stimulated ATPase activity of sarcoplasmic reticulum of the cardiomyopathic hamster. *Biochim Biophys Acta.* 1973;296:71-8.
156. Sievers R, Parmley W, James T, Wikman-Coffelt J. Energy levels at systole vs. diastole in normal hamster hearts vs. myopathic hamster hearts. *Circ Res.* 1983;53:759-66.
157. Factor S, Minase T, Cho S, Dominitz R, Sonnenblick E. Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: a preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation.* 1982;66:342-54.
158. Sato A, Hattori Y, Fukao M, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. A role of myofilament Ca²⁺ sensitivity in enhanced vascular reactivity in cardiomyopathic hamsters. *Eur J Pharmacol.* 1998;353:247-56.
159. Finkel M, Shen L, Oddis C, Romeo R. Verapamil regulation of a defective SR release channel in the cardiomyopathic Syrian hamster. *Life Sci.* 1993;52:1109-19.
160. Brousseau D, Desjardins J, Jasmin G, Dumont L. Altered coronary and cardiac adrenergic response in the failing hamster heart: role of cyclooxygenase derivatives. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2002;80:218-25.
161. Tedgui A, Bardy, N, Lévy, B. Transmission des signaux mécaniques dans les cellules vasculaires. *médecine/sciences.* 1997;13:790-8.

162. Ben DA, Benessiano J, Poitevin P, Levy B, Michel J. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol.* 1997;272:H851-8.
163. Salisbury P. Coronary artery pressure and strength of right ventricular contraction. *Circ. Res.* 1955;3:633-8.
164. Mulieri L, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen P, Alpert N. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation.* 1992;85:1743-50.
165. Slovut D, Wenstrom J, Moeckel R, Salerno C, Park S, Osborn J. Beat-to-beat modulation of heart rate is coupled to coronary perfusion pressure in the isolated heart. *J Appl Physiol.* 1999;86:694-700.
166. Kowaluk E, Seth, P, Fung, HL. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;262:916-22.
167. Hogan N, Casadei B, Paterson D. Nitric oxide donors can increase heart rate independent of autonomic activation. *J Appl Physiol.* 1999;87:97-103.
168. Hussain M, Drago G, Colyer J, Orchard C. Rate-dependent abbreviation of Ca^{2+} transient in rat heart is independent of phospholamban phosphorylation. *Am J Physiol.* 1997;273:H695-706.
169. Naim K, Rabindranauth P, Weiss H, Tse J, Leone R, Scholz P. Positive inotropy due to lowering cyclic GMP is also mediated by increases in cyclic AMP in control and hypertrophic hearts. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76:605-12.
170. Tada M, Kirchberger M, Katz A. Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1975;250:2640-7.

171. Diamond J, Chu E. A novel cyclic GMP-lowering agent, LY83583, blocks carbachol-induced cyclic GMP elevation in rabbit atrial strips without blocking the negative inotropic effects of carbachol. *Can J Physiol Pharmacol.* 1985;63:908-11.
172. Lincoln T, Corbin J. Purified cyclic GMP-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of cardiac troponin inhibitory subunit (TN-1). *J Biol Chem.* 1978;253:337-9.
173. Shah A, Mebazaa A, Wetzel R, Lakatta E. Novel cardiac myofilament desensitizing factor released by endocardial and vascular endothelial cells. *Circulation.* 1994;89:2492-7.
174. Ebihara Y, Haist J, Karmazyn M. Modulation of endothelin-1 effects on rat hearts and cardiomyocytes by nitric oxide and 8-bromo cyclic GMP. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:265-77.
175. Dube G, Greenfield J. Hemodynamic and myocardial blood flow. Profiles of pinacidil and nitroprusside in conscious dogs. *Am J Hypertens.* 1991;4:144-50.

