



HAL
open science

Etudes pharmacologiques in vitro et in vivo de la circulation pulmonaire: Applications à la circulation pulmonaire périphérique en air et en hypoxie in vivo

François Chabot

► **To cite this version:**

François Chabot. Etudes pharmacologiques in vitro et in vivo de la circulation pulmonaire: Applications à la circulation pulmonaire périphérique en air et en hypoxie in vivo. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1998. Français. NNT: 1998NAN12008 . tel-01748364

HAL Id: tel-01748364

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748364v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

1998

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 03 juin 1998



pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

Mention : Science du Médicament

par

François CHABOT

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies :

Pharmacologie

Sujet :

Etudes pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* de la circulation pulmonaire. Applications à la circulation pulmonaire périphérique en air et en hypoxie *in vivo*.

MEMBRES DU JURY

Juges : Pr. J. ATKINSON (Nancy, France) Pr. R. NAEIJE (Bruxelles, Belgique) Pr. S. ADNOT (Créteil, France) Dr. F. SCHRIJEN (Nancy, France)

Rapporteurs : Pr. P. DUROUX (Clamart, France) Pr. S.L. ARCHER (Alberta, Canada)



FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON
Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mlle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M.	LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M. BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mme FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle HASENFRATZ Marie Paule	Biologie Végétale
Mle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M. LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MIGNOT Bernard	Physique
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe	Anglais
-----------------------	---------

Nom : CHABOT

Prénoms : Jean François

Fonction : Médecin des Hôpitaux-Praticien Hospitalier

Adresse professionnelle : Service des Maladies Respiratoires et Réanimation
Respiratoire

C.H.U. de NANCY-BRABOIS

54500 - VANDOEUVRE-LES-NANCY

Tel : 03 83 15 40 21

Télécopie : 03 83 15 40 23

E. Mail : jm.polu@chu-nancy.fr

Titres et diplômes : Docteur en Médecine, Faculté de Médecine de Paris VI

- DEA de Pharmacologie (Universités de Nancy I et de Reims)
- Interne des Hôpitaux de Nancy
- Assistant des Hôpitaux, Chef de Clinique à la Faculté de Médecine de Nancy

- Praticien Hospitalier - Médecin des Hôpitaux

- Chargé d'enseignement à la Faculté de Médecine de Nancy



A Mademoiselle le Docteur Francine SCHRIJEN
Directeur de Recherches à l'INSERM

Vous nous avez accueilli à l'Unité INSERM 14
où vous nous avez fait découvrir la recherche clinique et fondamentale.

Vous nous avez fait partager votre enthousiasme pour l'expérimentation
et votre intérêt pour des travaux originaux.

Vous avez toujours fait preuve d'une disponibilité remarquable
pour nous aider et nous orienter dans nos projets.

Tout au long de l'élaboration de ce travail, vous nous avez guidé
et fait profiter de vos connaissances sur la circulation pulmonaire.

Vous nous avez encouragé à développer notre expérience auprès d'autres groupes.

Votre rigueur intellectuelle restera un modèle pour nos activités futures.

Que cette thèse soit le modeste témoin de notre reconnaissance
Soyez assuré de notre gratitude et de notre respect.

A Monsieur le Professeur Jeffrey ATKINSON
Professeur de Pharmacologie

Vous nous avez toujours reçu avec attention.

Nous avons été sensible à l'intérêt que vous portiez à nos travaux.

Nous souhaitons avoir le privilège de collaborer à des travaux de recherche avec votre équipe.

Nous vous remercions de l'honneur
que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury.

A Monsieur le Professeur Pierre DUROUX
Professeur de Pneumologie

Votre connaissance de la circulation pulmonaire,
votre intérêt pour la recherche clinique
vous ont permis de développer un Service de réputation internationale
dans le domaine des Maladies Vasculaires Pulmonaires.

Nous vous remercions de l'honneur
que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury
et d'être également rapporteur de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Robert NAEIJE
Professeur de Médecine

La qualité de vos travaux scientifiques, cliniques et expérimentaux,
a largement contribué à une meilleure connaissance de la circulation pulmonaire.

Nous vous remercions de l'honneur
que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury.

A Monsieur le Professeur Serge ADNOT
Professeur de Physiologie

Nous avons eu le plaisir de vous écouter présenter
les résultats de vos travaux, qui font autorité,
sur la circulation pulmonaire,
le rôle de l'endothélium dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire
et les effets de l'hypoxie.

Nous vous remercions de l'honneur
que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury.

A Monsieur le Professeur Stephen ARCHER
Professeur de Médecine

Vous avez eu la gentillesse de venir nous présenter à Nancy
les résultats de vos travaux,
références pour la Communauté Scientifique Internationale,
sur le rôle des canaux ioniques et les effets de l'hypoxie
dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire.

Nous vous remercions de l'honneur
que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury
et d'être également rapporteur de cette thèse.

Soyez assuré de notre gratitude.

A Monsieur le Docteur Claude SAUNIER

Directeur de Recherches à l'INSERM

Professeur Associé de Pharmacologie à l'Université de Montréal

Vous avez guidé nos travaux de pharmacologie avec beaucoup de bienveillance.

Votre enthousiasme communicatif et votre énergie
ont été de véritables stimulants
et nous ont aidé à mener à leur terme ces travaux.

Vous avez toujours corrigé nos erreurs avec délicatesse.
Votre esprit et votre humour ont largement contribué
à maintenir une ambiance particulièrement amicale et chaleureuse
au sein de notre groupe.

Votre esprit d'analyse et votre curiosité constituent des modèles pour nous.

Que cette thèse soit le modeste témoin de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Marie POLU
Professeur de Pneumologie

Nous avons l'honneur d'être votre élève.
Votre rigueur intellectuelle, la qualité de votre analyse,
votre disponibilité
ont toujours été des modèles pour nous.

Vous nous avez sans cesse encouragé dans nos activités de recherche
Vous nous avez permis de les mener à leur terme,
notamment en nous aidant à assumer une partie de nos tâches cliniques.

Vous nous avez incité également à collaborer avec d'autres équipes
à Paris puis à Londres.

Que cette thèse soit le modeste témoin de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Paul SADOUL

Professeur honoraire de Pneumologie

Premier Directeur de l'unité INSERM U14

Vous avez su allier Médecine et Recherche au plus haut niveau.

Nous avons eu l'honneur d'être un de vos élèves.

Votre énergie et votre créativité resteront des exemples pour nous.

A Monsieur le Docteur René PESLIN

Directeur de l'unité INSERM 14

Nous avons toujours été sensible à la qualité de vos critiques.

Que cette thèse soit le témoin de notre sincère reconnaissance.

Au groupe de l'Unité 14

Pour sa disponibilité constante et son accueil chaleureux

et en particulier à

Françoise POINCELOT

Josette LAMBERT

pour leur aide dans la réalisation des expériences.

Marie-Claude ROHRER

Bernadette CLEMENT

Patricia ULMER

pour leur contribution à l'édition de cette thèse.

Soyez assurées de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Anh Tuan DINH-XUAN
Maître de Conférences des Universités

Vous nous avez accueilli dans le laboratoire de Physiologie
de la Faculté de Médecine Cochin Port-Royal.

Vous nous avez fait profiter de votre expérience
pour les techniques d'études de la circulation pulmonaire *in vitro*.

Nous vous assurons de notre gratitude et de notre fidèle amitié.

A Monsieur le Professeur Timothy EVANS
Professeur de Réanimation

Vous nous avez accordé le privilège de travailler avec votre groupe
au National Heart and Lung Institute
et au Royal Brompton Hospital à Londres.

Nous avons pu bénéficier de votre remarquable expérience
et de celle du groupe que vous dirigez.

Que cette thèse soit le modeste témoin de notre reconnaissance.

A Dominique

A Marie-Cécile, Anne-Claire et Caroline

Pour leur patience et leur soutien constant

A la mémoire de mon père

A ma mère

A ma famille

A mes amis

TABLE DES MATIERES

	Page
TABLE DES MATIERES	
Liste des figures	20
Liste des tableaux	22
Liste des abréviations	23
INTRODUCTION	25
I - LA CIRCULATION PULMONAIRE	29
A - Généralités	30
B - Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles	30
C - Relations pression/débit	31
1 - Les résistances vasculaires pulmonaires : définition	31
2 - Mesure des pressions et des débits	31
3 - Les résistances vasculaires pulmonaires	32
4 - Distribution des résistances vasculaires pulmonaires	33
5 - Distribution régionale du débit sanguin pulmonaire : les zones de West	34
6 - Les courbes pression/débit :	36
a - état de base	36
b - variations	37
c - méthodes d'étude	40
D - Contrôle du tonus vasculaire pulmonaire	42
1 - Rôle du système nerveux	43
2 - Mécanismes humoraux	46
3 - Hypoxie et hypercapnie aiguës	49



4 - Rôle de l'endothélium	50
a - NO	51
b - libération de NO à l'état basal	53
c - libération de NO après augmentation du tonus vasculaire pulmonaire	54
d - tonus adrénergique	55
e - réponse cholinergique	57
f - réponse non adrénergique et non cholinergique	57
g - mécanismes humoraux	58
5 - Les seconds messagers	60
a - Les nucléotides cycliques	60
b - Hydrolyse du phosphoinositol	62
c - Les protéines kinases	62
6 - Les canaux ioniques	63
a - Les canaux calciques	63
b - Les canaux potassiques	65
c - Canaux ioniques et endothélium	67
E - Mécanismes de la vasoconstriction hypoxique	71
1 - Rôle d'un médiateur	71
2 - Modulation directe du tonus vasculaire pulmonaire par l'hypoxie	72
a - Endothélium et muscle lisse vasculaire	72
b - Rôle du NO	73
c - Rôle des canaux ioniques	77
3 - Variabilité régionale de la réactivité vasculaire	78
4 - Conséquences de la vasoconstriction hypoxique chronique	80

F - Tonus vasculaire pulmonaire, NO et cirrhose	81
1 - Syndrome hépatopulmonaire	81
2 - Rôle du NO dans le contrôle du tonus vasculaire au cours de la cirrhose	82
G - Tonus vasculaire pulmonaire, NO, peroxy-nitrite et sepsis	85
1 - Synthèse de peroxy-nitrite	85
2 - Cytotoxicité du peroxy-nitrite	85
3 - Effets vasculaires du peroxy-nitrite	87
II - Etudes in vitro	88
A - Technique des anneaux vasculaires	89
1 - Préparation des anneaux vasculaires pulmonaires	89
2 - Etudes pharmacologiques	89
a - Etudes dose-contraction	91
b - Etudes dose-relaxation	91
3 - Préparation des drogues	91
B - Rôle du monoxyde d'azote dans la vasoréactivité pulmonaire au cours de la cirrhose expérimentale	92
1 - Techniques chirurgicales	92
2 - Etudes pharmacologiques	93
a - Etudes dose-contraction	93
b - Etudes dose-relaxation	93
3 - Principaux résultats	93
4 - Publication : Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine on experimental cirrhosis. F. Chabot, H. Mestiri, S. Sabry, J. Dall'ava-Santucci, A. Lockhart, A.T. Dinh-Xuan. Eur Respir J 1996; 9 : 560-564.	

5 - Communication : Pulmonary vascular hyporeactivity of isolated pulmonary arteries from rats with biliary cirrhosis. Role of nitric oxide. F. Chabot, H. Mestiri, S. Sabry, O. Soubrane, D. Houssin, A. Lockhart, A.T. Dinh-Xuan. American Thoracic Society, Seattle May 20-24 May 1995. Am J Respir Crit Care Med 1995, 151 : A622.

C - Effets du peroxy-nitrite sur le tonus vasculaire pulmonaire du rat 94

1 - Préparation du peroxy-nitrite 94

2 - Etudes pharmacologiques 95

3 - Principaux résultats 96

4 - Publication : Characterization of the vasodilator properties of peroxy-nitrite on rat pulmonary artery: role of poly (adenosine 5'-diphosphoribose) synthase. F. Chabot, J.A. Mitchell, G.J. Quinlan, T.W. Evans. Br J Pharmacol 1997; 121 : 485-490.

5 - Communications : Peroxy-nitrite dilates rat pulmonary arteries at concentrations that do not cause endothelial dysfunction. F. Chabot, J.A. Mitchell, G.J. Quinlan, T.W. Evans. American Thoracic Society, San Francisco May 18-23 1997. Am J Respir Crit Care Med 1997, 155 : A195.

Characterization of the vasodilator properties of peroxy-nitrite on rat pulmonary artery: role of poly-ADP ribosyltransferase. F. Chabot, J.A. Mitchell, G.J. Quinlan, T.W. Evans. American Thoracic Society, San Francisco May 18-23 1997. Am J Respir Crit Care Med 1997, 155 : A195.

III - Etudes in vivo : les résistances vasculaires pulmonaires périphériques 97

A- Etude des RVPP à l'état de base 100

1 - Méthodes 100

2 - Principaux résultats de l'étude des RVPP 104

B - Effets de l'hypoxie	105
1 - Méthodes	105
2 - Résultats	105
3 - Publication : Peripheral pulmonary vascular resistance. F. Schrijen, C. Saunier, F. Chabot. J Appl Physiol 1993; 74 : 613-616.	
C - Effets de la perfusion d'un produit de contraste iodé	106
1 - Méthodes	106
2 - Résultats	106
3 - Publication : Change in peripheral pulmonary vascular resistance after ioxaglate infusion in anaesthetized dogs. F. Chabot, C. Saunier, F. Schrijen. Can J Physiol Pharmacol 1997; 75 : 15-18.	
D - Etudes pharmacologiques	107
1 - Méthodes	107
a - Adaptation de la technique	107
b - Etudes pharmacologiques	112
c - Préparation des drogues	112
2 - Résultats	113
a - Effets du vérapamil : importance du mode d'administration	113
b - Effets du glucosé isotonique	118
c - Effets des inhibiteurs des canaux calciques	118
phénylalkylamine : vérapamil	
dihydropyridines : nifédipine et nicardipine	
d - voie de la NO synthétase	118
L-NAME : inhibiteur de la NO synthétase	
Nitroprussiate de sodium : donneur de NO exogène	
L-NAME et nitroprussiate de sodium	

e - Activateurs des canaux potassiques	121
Levcromakalim	
L-NAME et nicorandil	
f - Antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques : urapidil	121
g - Almitrine, almitrine et nicardipine	121
3 - Discussion des résultats non publiés et non soumis pour publication	125
a - Effets du vérapamil : importance du mode d'administration	125
b - Effets de l'urapidil	128
c - Effets de l'almitrine	128
4 - Publication : Role of NO pathway, calcium and potassium channels on peripheral pulmonary vascular resistance, <i>in vivo</i> , during normoxia and mild acute normocapnic hypoxia in dogs. F. Chabot, C. Saunier, F. Schrijen. Soumis pour publication	
5 - Résumés de communications présentées à des Congrès internationaux	
Effect of verapamil on peripheral pulmonary vascular resistance in anaesthetized dogs: role of the route of administration. F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot. International Symposium Pulmonary circulation VI, Prague June 26-29 1994.	
Effect of nicardipine on peripheral pulmonary resistance in anaesthetised dogs. F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot. European Respiratory Society, Barcelone September 16-20 1995. Eur Respir J 1995, 8 : 250S.	
Effect of urapidil on peripheral pulmonary resistance in anesthetized dogs. F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot. American Thoracic Society, New Orleans May 10-15 1996. Am J Respir Crit Care Med 1996, 153 : A586.	
Effect of L-NAME on peripheral pulmonary circulation in anaesthetized dogs. F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot. European Respiratory Society, Berlin September 20-24 1997. Eur Respir J 1997, 10 : 254S.	

Effects of levromakalim and nicorandil on peripheral pulmonary resistance in anesthetized dogs. F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot. American Thoracic Society, Chicago April 24-29 1998. Am J Respir Crit Care Med 1998, 157 : A383.

CONCLUSION	131
A - Résultats et limites des études in vitro	132
1 - Vasoréactivité pulmonaire au cours de la cirrhose biliaire expérimentale	132
a - Résultats de l'étude	132
b - Limites de cette étude	132
2 - Propriétés vasodilatatrices du peroxy-nitrite : rôle de la PARS	133
a - Résultats de l'étude	133
b - Limites de cette étude	134
3 - Technique des anneaux vasculaires isolés : intérêts, limites	135
B - Résultats et limites des études in vivo	135
1 - Résultats des études	135
2 - Technique de perfusion périphérique : intérêts, limites	137
C - Perspectives	140
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
ANNEXES	170
- Rapport du Pr. Duroux	
- Rapport du Pr. Archer	
- Réponses aux questions du Pr. Archer	
- Réponse du Pr. Archer	

LISTE DES FIGURES

	Page
Fig 1 : Modèle d'interprétation de l'inhomogénéité de la perfusion pulmonaire	35
Fig 2 : Courbe pression artérielle pulmonaire/débit	37
Fig 3 : Courbes pression artérielle pulmonaire /débit obtenues sur une préparation de poumon isolé de cochon, en normoxie et en hypoxie	39
Fig 4 : Erreurs d'interprétation des RVP calculées	41
Fig 5 : Synthèse endothéliale et action du NO sur le muscle lisse vasculaire	52
Fig 6 : Régulation du tonus vasculaire pulmonaire	59
Fig 7 : Substances vasoactives libérées par l'endothélium	61
Fig 8 : Mode d'action des canaux potassiques et calciques au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire	66
Fig 9 : Mécanismes de relaxation du muscle lisse vasculaire pulmonaire	70
Fig 10 : Technique des anneaux vasculaires isolés : préparation	90
Fig 11 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : préparation	102
Fig 12 : Angiogramme d'un territoire pulmonaire périphérique	103
Fig 13 : Distribution de résistances vasculaires pulmonaires et périphériques en air et en hypoxie	109
Fig 14 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : préparation pour les études pharmacologiques	111
Fig 15 : Courbe pression/débit sous vérapamil par voie générale et par voie générale + locale en «bolus»	116
Fig 16 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets du sérum glucosé isotonique	119
Fig 17 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets du vérapamil en perfusion locale	120
Fig 18 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets de l'urapidil	122

Fig 19 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets de l'almitrine en hypoxie 123

Fig 20 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets de l'almitrine et de la nicardipine en hypoxie 124

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1: Médiateurs et hormones agissant sur le tonus vasculaire pulmonaire	47
Tableau 2 : Variations des RVPP avec le vérapamil par voie locale «en bolus»	115
Tableau 3 : Valeurs hémodynamiques obtenues avec le vérapamil par voie générale et locale «en bolus»	117

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP : adénosine diphosphate

AMP : adénosine monophosphate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ATP : adénosine triphosphate

ANF : facteur atrial natriurétique

canaux Ca^{2+} : canaux calciques

canaux Ca^{2+} type L : canaux calciques «long lasting» ou canaux d'action prolongée

canaux Ca^{2+} type T : canaux calciques «transient» ou canaux d'action transitoire

canaux Ca^{2+} type N : canaux calciques «ni T ni L» ou canaux d'action intermédiaire

canaux K^+ : canaux potassiques

canaux K_{Ca} : canaux potassiques activés par le Ca^{2+}

canaux K_{DR} : canaux «delayed rectifier» ou canaux de rectification retardée

canaux K_{ATP} : canaux potassiques ATP dépendants

CGRP : Calcitonin gene-related peptide

EDHF : Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor

EDRF : Endothelium-Derived Relaxing Factor

ET : endothéline

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GTP : guanosine triphosphate

IP_3 : inositol 1, 4, 5 triphosphate

L-NA ou L-NOARG : N^0 -nitro-L-arginine

L-NAME : N^0 -nitro-methyl ester-L-arginine

L-NMMA : N^0 -nitro-monomethyl-L-arginine

LT : leucotriène

NA : noradrénaline

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NANC : non adrénérgique et non cholinérgique
NO : monoxyde d'azote
NOS : NO synthétase ou NO synthase
cNOS : NOS constitutive
iNOS : NOS inductible
 \bar{P} : pression moyenne
PA : pression alvéolaire
Pa : pression artérielle
PAF : facteur d'activation plaquettaire
 \bar{P}_{ap} : pression artérielle pulmonaire moyenne
 \bar{P}_{ap} - \bar{P}_{og} : pression motrice
PARS : poly (adénosine 5'-diphosphoribose) synthase
 \bar{P}_{cp} : pression capillaire pulmonaire moyenne
PGI₂ : prostacycline
PGs : prostaglandines
PKC : protéine kinase C
 \bar{P}_{og} : pression auriculaire gauche moyenne
Pv : pression veineuse
 \dot{Q} : débit cardiaque
 \dot{q} : débit de la pompe
RVP : résistances vasculaires pulmonaires
RVPP : résistances vasculaires pulmonaires périphériques
ROC : «receptor-operated channel» ou canal activé par un récepteur
SP : substance P
TxA₂ : thromboxane A₂
VIP : «Vasoactive Intestinal Peptide»
VOC : «voltage-operated channel» ou canal dépendant du voltage

INTRODUCTION

Le poumon se caractérise par une double circulation provenant des artères pulmonaires et bronchiques. La circulation bronchique fait partie intégrante de la circulation systémique ; les artères et veines bronchiques ont la même structure que les autres vaisseaux systémiques. La circulation bronchique, peu importante quantitativement et qualitativement, a un rôle «nourricier». La majeure partie du sang perfusant le poumon provient de la circulation pulmonaire qui, seule, participe aux échanges gazeux. La circulation pulmonaire se singularise par un régime de faibles pressions. Chez l'adulte normal, la pression artérielle pulmonaire est 5 à 6 fois plus faible que la pression artérielle systémique. La circulation pulmonaire a des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles particulières. Il existe une régulation très fine de la pression et du débit des vaisseaux pulmonaires qui permet une optimisation des échanges gazeux dont l'objectif est le maintien d'une normoxémie. La circulation pulmonaire est très sensible à l'hypoxie et c'est la seule circulation d'organe dont la réponse à l'hypoxie soit une vasoconstriction.

De nombreuses techniques sont proposées pour réaliser des études pharmacologiques portant sur la circulation pulmonaire. Les études peuvent être faites *in vivo* chez l'animal éveillé ou anesthésié, à thorax fermé ou ouvert. Parmi ces techniques, outre les études de l'ensemble de la circulation pulmonaire par cathétérisme cardiaque droit, citons les techniques de poumon isolé perfusé ou de lobe isolé perfusé qui se rapprochent des études *ex vivo*.

Les études *in vitro* sont éloignées des conditions de l'organisme entier mais sont intéressantes pour préciser les mécanismes d'action des drogues au niveau des différents segments du circuit vasculaire (artère ou veine, segment proximal ou distal), de la paroi vasculaire (endothélium et muscle lisse), des cellules et de leur différents constituants (membrane cellulaire, mitochondrie et noyau, canaux ioniques, seconds messagers). La technique des anneaux vasculaires pulmonaires isolés permet d'étudier l'effet de différentes drogues sur la tension isométrique de segments vasculaires proximaux. Les vaisseaux plus distaux et donc plus fins sont explorés par la technique du myographe de Mulvany. Les techniques d'étude au niveau cellulaire sont multiples et peuvent être basées sur

l'électrophysiologie ou les cultures cellulaires par exemple (cellules endothéliales et musculaires lisses).

Une hypoxémie est fréquemment observée au cours de différentes affections, en particulier cardio-pulmonaires mais aussi hépatiques ou infectieuses. Il existe des interactions entre l'oxygène et le tonus vasculaire pulmonaire. En effet l'oxygène a un rôle fondamental dans la modulation du tonus vasculaire pulmonaire et le tonus vasculaire pulmonaire influence aussi l'oxygénation artérielle. L'importance de ces interrelations en clinique nous a amené à conduire des travaux de recherche en utilisant des méthodes d'études *in vivo* et *in vitro*. L'étude du contrôle du tonus vasculaire pulmonaire notamment au cours de l'hypoxie aiguë est difficile car le siège de la vasoconstriction hypoxique est distal. Il n'existe pas à notre connaissance de modèle animal permettant l'étude de la circulation pulmonaire périphérique *in vivo*, indépendamment de la circulation systémique et pulmonaire générale. C'est pourquoi nous avons développé un modèle d'étude de la circulation pulmonaire périphérique *in vivo*. Après avoir précisé les effets de l'hypoxie sur le tonus vasculaire pulmonaire périphérique, nous avons adapté ce modèle pour la réalisation d'études pharmacologiques. Nous avons étudié les effets, en air et en hypoxie aiguë, de différentes drogues susceptibles de moduler le tonus vasculaire pulmonaire périphérique.

Nous avons associé à ce travail *in vivo* des études *in vitro*. Nous avons pu travailler au sein d'équipes utilisant la technique des anneaux vasculaires pulmonaires isolés. Nous avons étudié la vasoréactivité pulmonaire dans un modèle de syndrome hépatopulmonaire, situation clinique caractérisée notamment par des anomalies de l'oxygénation artérielle et de la vasoconstriction hypoxique et liée en partie à un excès de production de monoxyde d'azote (NO). Le NO a un rôle très important dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire. Ceci nous a amené à étudier également les effets vasculaires pulmonaires du peroxyde d'azote, radical libre de l'oxygène produit en cas d'excès de production de NO et d'anion superoxyde, en particulier au cours du sepsis grave.

Après avoir rappelé quelques points importants de physiologie et de physiopathologie concernant la circulation pulmonaire et son contrôle, nous présentons la méthodologie des travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* et les publications faites dans ce cadre.

I - Circulation pulmonaire

A - Généralités

La principale fonction de la circulation pulmonaire est sa contribution aux échanges gazeux. La circulation pulmonaire débute après les valves sigmoïdes pulmonaires à l'origine du tronc de l'artère pulmonaire qui reçoit le sang veineux mêlé éjecté par le ventricule droit. L'artère pulmonaire et ses branches se ramifient parallèlement aux voies aériennes. A leur entrée dans le poumon, les artères pulmonaires se retrécissent progressivement. Les artères proximales ont une structure élastique ; les branches périphériques, de plus faible calibre, ont une structure musculaire. Entre artères et veines s'interpose un réseau capillaire très dense qui assure les échanges gazeux. Le sang oxygéné est collecté par les veines pulmonaires et se draine dans l'oreillette gauche.

Plusieurs points caractérisent la circulation pulmonaire (Fishman, 1985) :

- elle reçoit l'ensemble du débit cardiaque.
- les pressions, pulsatiles, sont faibles. La pression moyenne de l'artère pulmonaire est de l'ordre de 15 mmHg. La différence de pression entre l'entrée et la sortie de la circulation pulmonaire ou pression motrice est d'environ 10 mmHg chez le sujet sain.
- correspondant à ces faibles pressions, les parois des artères pulmonaires sont fines et contiennent peu de cellules musculaires lisses par rapport aux artères systémiques.

B - Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles

La structure et la fonction des vaisseaux pulmonaires diffèrent selon leur siège proximal ou distal. Les vaisseaux proximaux - tronc pulmonaire, artères principales et intrapulmonaires - sont élastiques. Ils transportent le sang du ventricule droit aux artères de résistance. Les vaisseaux élastiques forment un réservoir distensible et élastique pour le volume systolique ventriculaire droit. En raison de leur compliance, ils se distendent à chaque systole, stockent une partie du volume systolique qui est distribuée pendant la diastole vers les petits vaisseaux. Ceci diminue la charge systolique du ventricule droit, diminue le flux systolique des vaisseaux périphériques et améliore le flux diastolique. En cas d'hypertension artérielle pulmonaire aiguë,

la compliance artérielle pulmonaire est diminuée. Le maintien du volume systolique augmente la charge systolique du ventricule droit et la tension pariétale des artères pulmonaires. Ces vaisseaux élastiques ont également une couche musculaire et peuvent être le siège d'une vasoconstriction.

Les artères pulmonaires distales ont une média formée de cellules musculaire lisses. Ces vaisseaux de résistance sont le siège principal de la vasoconstriction pulmonaire. Quand les artères deviennent intra-acinaires, elles perdent leur muscle lisse. Ces artérioles alimentent les capillaires alvéolaires d'où naissent les veinules pulmonaires, à l'origine des veines pulmonaires.

La réactivité vasculaire pulmonaire est inhomogène. En effet, comme nous le détaillerons ensuite, de nombreux travaux démontrent des variations régionales dans la réactivité vasculaire pulmonaire à certaines molécules et dans l'innervation entre les différents segments de la circulation pulmonaire.

C - Relation pression/débit

1 - Résistances vasculaires pulmonaires : définition

La relation entre les pressions et le débit dans la circulation pulmonaire est exprimée par le calcul des résistances vasculaires pulmonaires (RVP). Cette relation est décrite par analogie avec la loi électrique d'Ohm (Fritts, 1959) :

$$RVP = (\bar{P} \text{ entrée} - \bar{P} \text{ sortie}) / \text{débit} = (\bar{P}_{\text{ap}} - \bar{P}_{\text{og}}) / \dot{Q} \quad (\text{équation 1})$$

où \bar{P} : pression moyenne, \bar{P}_{ap} pression artérielle pulmonaire moyenne, \bar{P}_{og} : pression auriculaire gauche moyenne, $\bar{P}_{\text{ap}} - \bar{P}_{\text{og}}$: pression motrice, \dot{Q} : débit cardiaque.

2 - Mesure des pressions et des débits

La mesure des pressions est obtenue avec un cathéter, par exemple une sonde de Swan-Ganz. Ce cathéter est double avec un orifice proximal permettant la mesure de la pression auriculaire droite et un orifice distal pour la mesure de la pression artérielle pulmonaire. En

pratique, la mesure de la Pog est remplacée par celle de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion ou pression capillaire pulmonaire (Pcp). La Pcp est obtenue en mesurant la pression à l'extrémité du cathéter bloqué dans l'artère pulmonaire. L'occlusion de l'artère pulmonaire est obtenue soit en gonflant un ballonnet situé juste en amont de l'extrémité de la sonde, soit en avançant et bloquant le cathéter dans une artère pulmonaire distale. Le débit en aval, dans les artères, les capillaires et les veines de drainage est alors interrompu. La pression à l'extrémité du cathéter bloqué est égale à la pression régnant dans la première structure en aval comportant un débit sanguin, soit la pression veineuse au confluent d'une veine de drainage du territoire bloqué avec une veine drainant le sang d'un autre territoire. La pression d'occlusion est virtuellement identique à la Pog car la perte de charge est quasi-nulle dans les veines pulmonaires. Elle surestime la Pog en cas d'augmentation de la résistance veineuse pulmonaire (Zidulka & Hakim, 1985).

La mesure du débit cardiaque est réalisée habituellement par des méthodes de dilution basées sur l'application du principe de Stewart-Hamilton. La technique la plus utilisée actuellement est la thermodilution. Un volume déterminé de sérum glucosé isotonique dont la température est connue est injecté dans l'oreillette droite. Cet injectat froid diminue la température du sang. La variation de température, mesurée au niveau de l'artère pulmonaire par une thermistance, dépend du débit cardiaque. L'erreur est de 10 à 20% et il est donc recommandé d'effectuer plusieurs mesures successives pour minimiser cette erreur, et de visualiser la courbe de dilution pour s'assurer de la bonne circulation de l'indicateur. La thermodilution nécessite plusieurs corrections, tenant compte de la déperdition de chaleur le long de la sonde et du gradient de température entre l'injectat et le sang. Le débit cardiaque peut être mesuré avec le cathéter utilisé pour la mesure des pressions pulmonaires (sonde de Swan-Ganz) doté d'une thermistance à son extrémité distale.

3 - Facteurs pouvant modifier les résistances vasculaires pulmonaires

Les RVP sont normalement faibles. Elles peuvent encore diminuer par recrutement (ouverture de capillaires initialement fermés) et par distension (augmentation du diamètre des

vaisseaux). La pression partielle alvéolaire en oxygène est le principal modulateur des RVP, l'hypoxie alvéolaire entraînant une vasoconstriction locale.

Le volume pulmonaire est aussi un déterminant important des RVP. A faible volume pulmonaire, les RVP sont élevées par réduction du diamètre des vaisseaux extra-alvéolaires. Quand le volume pulmonaire augmente, les RVP diminuent puis à grand volume pulmonaire, les RVP augmentent par réduction du diamètre des vaisseaux intra-alvéolaires. Pour générer un débit à travers les vaisseaux collabés, la pression artérielle pulmonaire augmente de plusieurs cm d'eau. La pression minimale pour obtenir un débit est nommée pression critique d'ouverture.

La résistance vasculaire dépend des propriétés géométriques des vaisseaux et également de la viscosité sanguine. La relation entre résistance (R), viscosité (η), rayon (r) et longueur (l) d'un vaisseau est donnée par la loi de Poiseuille :

$$R = 8 \eta l / \pi r^4 \quad (\text{équation 2})$$

L'interprétation des RVP doit tenir compte des nombreux facteurs qui interviennent dans leur détermination. Cependant, elles permettent de comparer différentes circulations ou une même circulation dans différentes conditions (Fishman, 1985).

4 - Distribution longitudinale des résistances vasculaires pulmonaires

La distribution longitudinale des résistances vasculaires pulmonaires influence la réactivité vasculaire régionale et permet l'identification des segments vasculaires sensibles à l'administration d'un produit vasoactif. Dans un poumon sain, les résistances sont à prédominance précapillaire (60% ou plus de l'ensemble de la résistance vasculaire pulmonaire). Cependant, il existe des différences selon le type de préparation expérimentale, le débit, la pression veineuse, le volume pulmonaire et la nature de l'agent vasoconstricteur (Hakim *et al.*, 1982 ; Mitzner, 1983). L'hypoxie aiguë augmente la résistance précapillaire (Hakim *et al.*, 1983).

5 - Distribution régionale du débit sanguin pulmonaire : les zones de West

La distribution de la perfusion pulmonaire n'est pas homogène. La perfusion augmente progressivement des parties supérieures aux parties inférieures du poumon, où elle est toutefois limitée. L'interprétation de ce phénomène développée par West *et al.*, (1964), repose sur une modélisation du poumon en 3 compartiments (fig 1). En position verticale, la zone 1 est située à l'apex du poumon. A ce niveau, en raison de la gravité, la pression dans les vaisseaux capillaires intra-alvéolaires est quasi nulle et est inférieure à la pression alvéolaire. Cette zone ne caractérise que l'extrême sommet du poumon vertical et n'existe pas en position horizontale.

Dans la zone 2, la pression artériolocapillaire est supérieure à la pression alvéolaire et cette dernière elle-même supérieure à la pression veineuse. Dans cette zone, la pression motrice est la différence entre la pression artérielle et la pression alvéolaire. La pression alvéolaire varie peu ; par contre, la pression artérielle augmente de haut en bas et le débit de perfusion s'accroît progressivement. Au niveau de la zone 3, comme la pression artériolocapillaire et la pression veineuse ont augmenté parallèlement (0,75 mmHg par cm de hauteur de poumon), la pression veineuse devient supérieure à la pression alvéolaire.

La cause de la limitation de la perfusion à la partie inférieure du poumon est discutée. Elle a été expliquée par une quatrième zone. Cette zone 4 n'est pas expliquée par les relations entre les pressions régnant dans les vaisseaux intra-alvéolaires et les alvéoles mais fait intervenir les vaisseaux extra-alvéolaires. Ces vaisseaux extra-alvéolaires sont entourés d'une gaine où règne une pression dite interstitielle qui évolue parallèlement à la pression pleurale. Dans les parties supérieures du poumon où la pression pleurale est très négative, les vaisseaux extra-alvéolaires sont distendus. Dans les parties inférieures du poumon, la pression pleurale moins négative diminue le diamètre des vaisseaux extra-alvéolaires, réduisant leur débit et par conséquent le débit dans les vaisseaux intra-alvéolaires qui en dépendent.

Il apparaît donc que de nombreux facteurs influencent les RVP comme la concentration alvéolaire en oxygène, le volume pulmonaire et la distribution régionale du débit sanguin pulmonaire selon les zones de West. La construction des courbes pression/débit a permis de mettre en évidence certaines limites de l'intérêt du calcul des RVP.

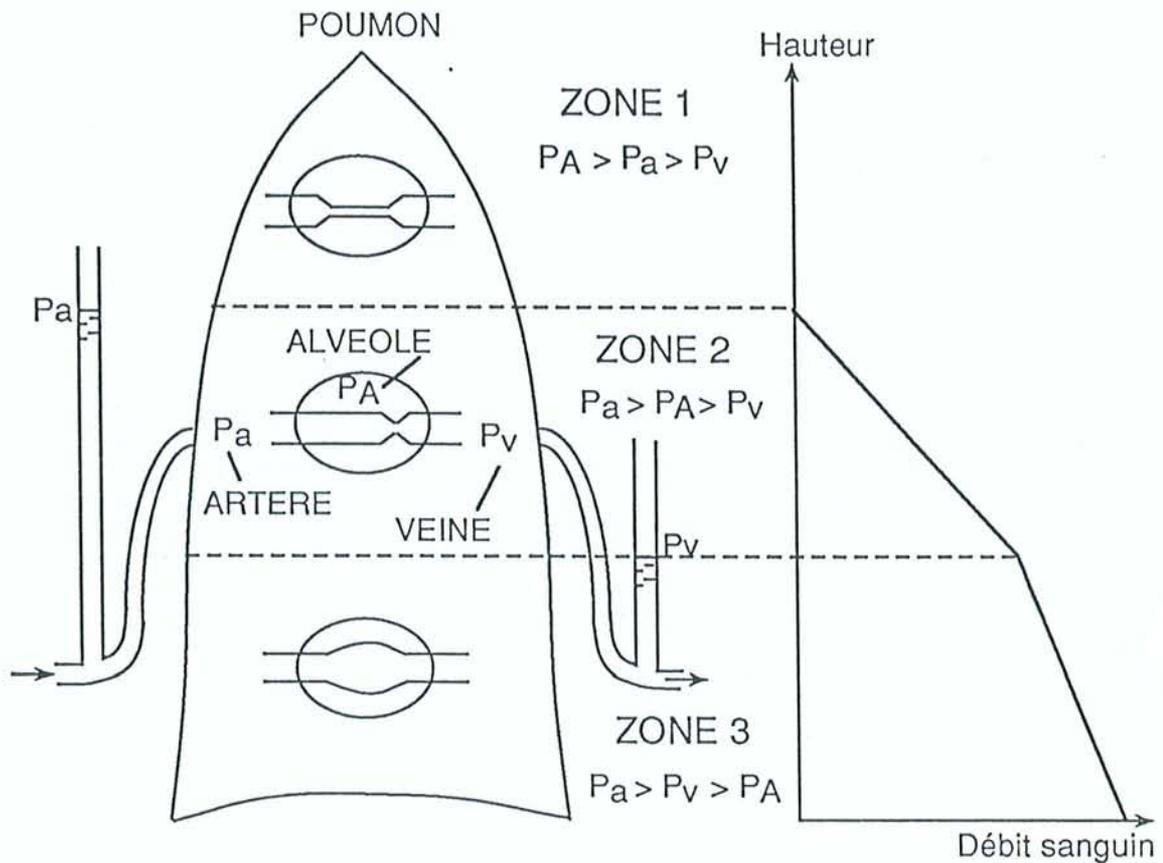


Fig 1 : Modèle d'interprétation de l'inhomogénéité de la perfusion pulmonaire (d'après West *et al.*, 1964).

Les zones de West, représentées sur un poumon en position verticale, sont déterminées par les interactions entre les pressions vasculaires et alvéolaires. Pour simplifier la présentation, seules les zones 1, 2 et 3 sont schématisées ici. La colonne d'eau située à gauche représente la pression artérielle pulmonaire et celle à droite la pression veineuse pulmonaire.

PA : pression alvéolaire ; Pa : pression artérielle pulmonaire; Pv : pression veineuse pulmonaire

6 - Courbes pression/débit

a- état de base

Le calcul des RVP suppose que la relation pression/débit est linéaire et passe par l'origine, ce qui est exact dans un poumon homogène comme chez le sujet sain en décubitus dorsal (peu d'effet de la gravité, poumon dont tous les vaisseaux recrutés sont en zone 3 de West). Toutefois si on étudie l'ensemble de la courbe pression/débit, la courbe obtenue a une forme légèrement hyperbolique, concave vers l'axe des débits (habituellement, la courbe pression/débit est représentée avec l'axe des débits en abscisse et celui des pressions en ordonnée). La courbe devient linéaire aux débits élevés (fig 2 ; Shoukas, 1975). La pente d'une droite reliant l'origine (à débit nul) avec un point de la courbe est égale à la résistance vasculaire pulmonaire, pour le débit correspondant au point choisi, telle qu'elle est calculée selon l'équation 1.

Si la partie constante de la pente est extrapolée à un débit nul, l'ordonnée à l'origine ou intercept sur l'axe des y est interprétée comme représentant la pression de fermeture ou pression critique pour l'ensemble du lit vasculaire pulmonaire. Quand la pression critique est positive, la pression de fermeture est supérieure à la pression auriculaire gauche qui n'affecte pas le débit sanguin pulmonaire tant qu'elle est inférieure à la pression critique.

La nature du phénomène physique responsable de la forme de la relation pression/débit est controversée. Deux modèles sont proposés, celui de la résistance de Starling et celui de la distensibilité vasculaire. Le modèle de la résistance de Starling est caractérisé par une limitation du débit dépendant de la pression critique et par une résistance indépendante du débit et de la pression vasculaire. Quand la pression de sortie est inférieure à la pression critique, le débit est proportionnel à la différence de pression entre pression d'entrée et pression critique. Ce modèle est applicable en zone 2 de West où la pression alvéolaire, supérieure à la pression veineuse pulmonaire, représente la pression critique (Permutt *et al.*, 1962). Quand le débit et les pressions augmentent, la pente de la courbe pression/débit est indépendante du débit et de la pression (Permutt *et al.*, 1962 ; Mitzner, 1983).

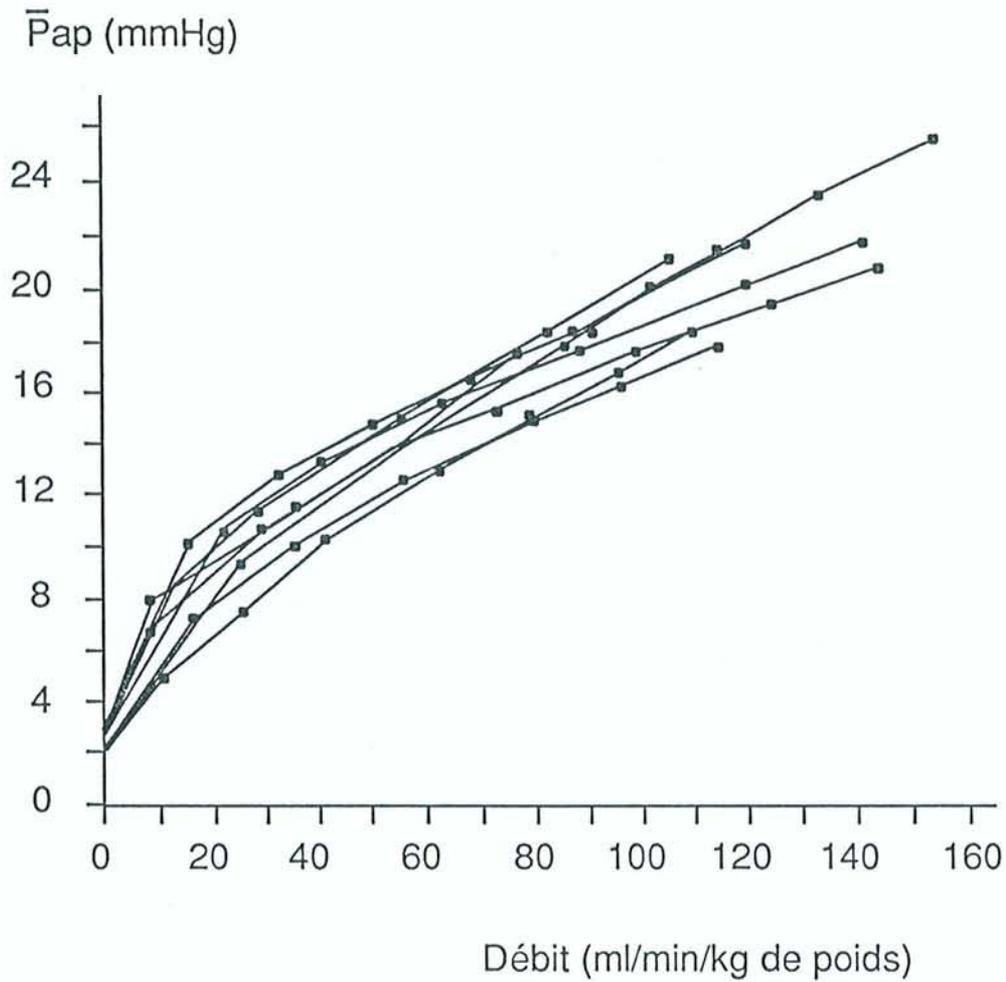


Fig 2 : Courbe pression artérielle pulmonaire/débit (d'après Shoukas, 1975).

Les courbes individuelles pression artérielle pulmonaire/débit ont été obtenues à pression veineuse pulmonaire constante (2 mmHg) sur des lobes isolés perfusés de chien. La relation pression/débit, curvilinéaire à faible débit devient linéaire à débit plus élevé.

Abréviation : \bar{P}_{ap} = pression artérielle pulmonaire moyenne.

Le modèle de la distensibilité vasculaire est aussi utilisé pour expliquer la forme de la relation pression/débit. Dans ce modèle, l'hypothèse est celle d'une augmentation du débit à l'origine d'une augmentation des pressions vasculaires provoquant ainsi une distension vasculaire. La distension vasculaire diminue la résistance vasculaire et une nouvelle augmentation de débit entraîne alors une plus faible augmentation de pression. Dans ce modèle, la distension vasculaire seule diminue la résistance, surtout pour les petits débits (Linehan *et al.*, 1992).

b - variations

In vivo, les changements du tonus vasomoteur sont souvent associés à des variations de débit cardiaque. En raison de la forme de la courbe pression/débit, si le débit cardiaque et la différence de pression varient dans le même sens, une modification du tonus vasomoteur est difficile à mettre en évidence par le simple calcul des RVP. Dans ce cas, l'étude de la courbe pression/débit sur plusieurs points est intéressante car son déplacement traduit la modification du tonus vasomoteur. Quand les pressions sont élevées, tous les vaisseaux sont ouverts et la pente de la relation pression/débit devient constante.

Le déplacement vers le haut de l'ensemble de la courbe pression/débit indique une augmentation des pressions de fermeture témoignant d'une élévation de la résistance de Starling; l'augmentation de la pente indique une vasoconstriction due à une élévation de la résistance ohmique (Mitzner, 1983). Ces paramètres sont intéressants car en l'absence de variation du volume pulmonaire, des pressions pleurale et auriculaire gauche, une modification de la courbe pression/débit est un excellent argument en faveur d'un changement de tonus (figure 3). L'effet d'un stimulus sur l'ordonnée à l'origine ou sur la pente traduit des effets mécaniques différents, peut-être dus à des sites d'action distincts. Pour un stimulus actif sur la circulation pulmonaire, le site d'action est déterminé par l'interaction entre la densité locale en cellules musculaires, l'innervation, les propriétés membranaires électriques, la localisation et les concentrations de récepteurs pour les différents médiateurs (Dawson *et al.*, 1989). Tous ces facteurs varient le long de la circulation pulmonaire.

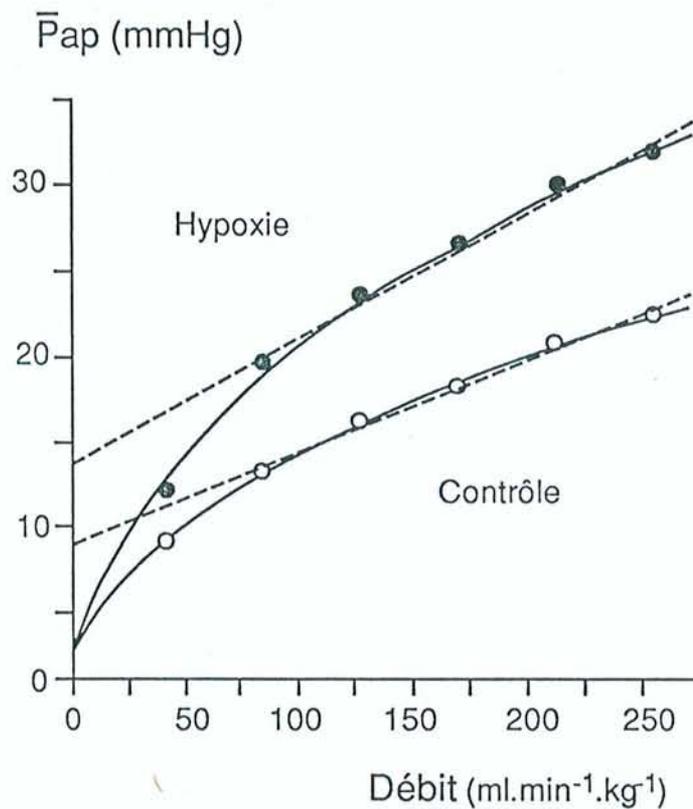


Fig 3 : Courbes pression artérielle pulmonaire /débit obtenues sur une préparation de poumon isolé de cochon, en normoxie et en hypoxie (d'après Nelin *et al.*, 1993).

La pression auriculaire gauche est maintenue constante à 3 mmHg, correspondant au début de la courbe sur l'axe des ordonnées. Les lignes en pointillé correspondent aux extrapolations des parties constantes des droites à l'origine (débit nul). Abréviation : \bar{P}_{ap} = pression artérielle pulmonaire moyenne.

L'hypoxie, l'augmentation de la pression alvéolaire, certains vasoconstricteurs déplacent la relation $(\bar{P}_{ap}-\bar{P}_{og})/\dot{Q}$, qui conserve une linéarité pour les débits importants, vers de plus hautes pressions par augmentation de la RVP et de l'intercept avec l'axe des pressions (fig 3) (Lodato *et al.*, 1985; Dawson *et al.*, 1989 ; Nelin *et al.*, 1993). Quand l'intercept avec l'axe des pressions est positif, la P_{og} ne peut plus être considérée comme la pression de sortie effective du réseau vasculaire pulmonaire. En effet la P_{og} n'affecte pas le débit sanguin pulmonaire si elle est inférieure à la pression de fermeture des vaisseaux pulmonaires ou pression critique. Dans ce cas, le calcul de la RVP peut être associé à des erreurs d'interprétation. La figure 4 (d'après Brimiouille & Naeije, 1996) illustre le fait que la RVP peut sembler inchangée en présence d'une vasoconstriction pulmonaire, ou diminuer en présence d'une augmentation passive de la P_{ap} liée au débit.

La RVP ne permet pas une évaluation correcte des effets d'une intervention physiologique (hypoxie, effort) ou pharmacologique (vasoconstricteurs ou vasodilatateurs) sur le tonus vasculaire pulmonaire à débit variable (Permutt *et al.*, 1962 ; Mitzner, 1983). L'état fonctionnel de la circulation pulmonaire est mieux décrit par une courbe pression/débit à plusieurs points (Shoukas, 1975 ; Lodato *et al.*, 1985).

c - méthodes d'étude

La relation pression/débit dans la circulation pulmonaire a été étudiée *in situ* pour l'ensemble du lit vasculaire pulmonaire (Mitzner, 1983; Dawson *et al.*, 1989). Chez le chien éveillé, la relation pression/débit est linéaire, mais en l'absence d'anesthésie, ne peut pas être étudiée pour des valeurs très faibles de débit cardiaque (Lodato *et al.*, 1985). L'étude de la relation pression/débit pour de faibles valeurs de débit est importante car le débit sanguin peut être réduit dans différentes situations rencontrées en clinique et éventuellement être affecté par des thérapeutiques. Dans des préparations de poumons isolés perfusés, la relation pression/débit est linéaire pour les valeurs physiologiques de débit et devient curvilinéaire pour les petits débits (Shoukas, 1975). La relation pression/débit a été étudiée aussi au niveau de lobes isolés (Fowler *et al.*, 1966), et de lobes *in situ* (Kadowitz *et al.*, 1989). Dans ces différents modèles, la courbe

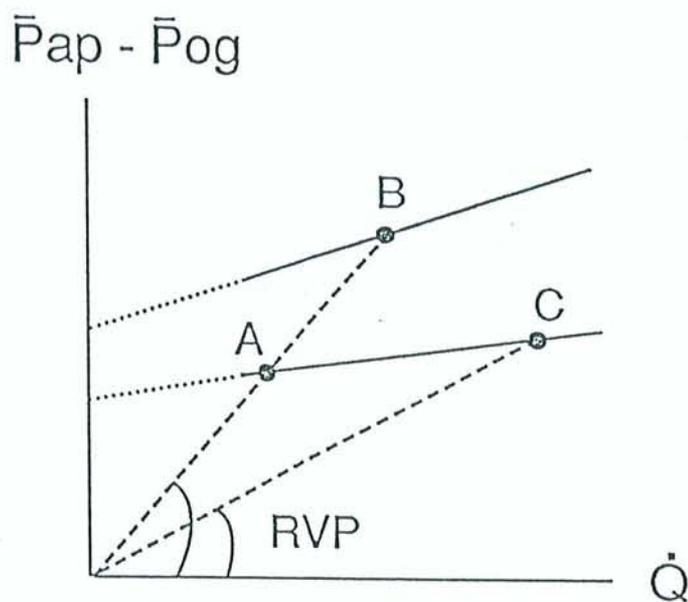


Fig 4 : Erreurs d'interprétation des RVP calculées (d'après Brimiouille & Naeije, 1996 ; adapté de Fishman, 1985).

De A en C, la RVP calculée diminue alors que le tonus vasomoteur défini par la courbe $(\bar{P}_{ap} - \bar{P}_{og})/\dot{Q}$ est inchangé. De A en B, la RVP semble inchangée en présence d'une vasoconstriction pulmonaire (d'après Brimiouille & Naeije, 1996 ; adapté de Fishman, 1985).

pression/débit présente une partie linéaire à partir de laquelle peut être extrapolée l'ordonnée à l'origine ou pression critique de fermeture. Quand le débit diminue dans ces préparations expérimentales, il est difficile de maintenir les autres paramètres stables : par exemple si la consommation d'oxygène est inchangée, le contenu en oxygène de l'artère pulmonaire diminue avec la baisse du débit. Ces modèles ont au moins deux limites :

- la nécessité d'extrapoler pour estimer la pression critique de fermeture.
- les modifications hémodynamiques, systémiques et pulmonaires, induites par les variations de débit.

Ceci nous a conduit à développer un modèle pour déterminer la relation pression/débit dans la circulation pulmonaire périphérique où le débit peut être modifié sans interférer avec la circulation générale et en partant d'un débit nul (Schrijen *et al.*, 1993). Ce modèle est décrit à partir de la page 100.

La relation pression/débit est modulée par de nombreux éléments qui participent au contrôle du tonus vasculaire pulmonaire.

D - Contrôle du tonus vasculaire pulmonaire

Le maintien dans la circulation pulmonaire d'une pression basse est lié aux propriétés de recrutement et de distensibilité des vaisseaux pulmonaires, et au très faible tonus vasculaire pulmonaire à l'état de base. Le tonus basal est un élément important de la réactivité vasculaire pulmonaire à un stimulus. En règle générale, un vasoconstricteur induit une augmentation de tonus d'autant plus importante que le tonus de base est faible ; inversement, un effet vasodilatateur est plus net quand le tonus initial est élevé.

Le principal agent vasoconstricteur pulmonaire «physiologique» est l'hypoxie.

Il existe des différences importantes entre les espèces dans les réponses vasculaires pulmonaires et plus exceptionnellement dans une même espèce, liée à une susceptibilité interindividuelle probablement d'origine génétique (Fishman, 1985).

La circulation pulmonaire est sous l'influence de facteurs actifs et passifs. Les facteurs passifs (débit cardiaque, pression auriculaire gauche, pressions des voies aériennes, alvéolaires et interstitielles, gravité) modifient la résistance vasculaire pulmonaire indépendamment du tonus

vasculaire pulmonaire. Les facteurs actifs régulent le tonus vasculaire pulmonaire en provoquant une contraction ou une relaxation du muscle lisse vasculaire. Ces facteurs incluent, outre la pression alvéolaire en oxygène et dans une moindre mesure la teneur en gaz carbonique du sang veineux mêlé, des mécanismes nerveux et humoraux et des facteurs paracrines et autocrines (Fishman, 1985 ; Liu & Barnes, 1997). L'endothélium a un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire. Les cellules endothéliales libèrent des médiateurs vasoactifs dont certains sont susceptibles d'influencer la croissance et la différenciation des cellules de la paroi vasculaire. Dans l'étude de l'action vasculaire pulmonaire des drogues, il est important d'envisager leurs effets sur les cellules endothéliales et musculaires lisses car la majorité des agonistes modifient le tonus vasculaire pulmonaire par la libération de médiateurs endothéliaux.

Nous décrirons successivement le rôle du système nerveux, des mécanismes humoraux, des médiateurs endothéliaux, des seconds messagers et des canaux ioniques avant d'aborder la vasoconstriction hypoxique. Pour chacun de ces paragraphes, nous détaillerons les mécanismes importants pour les préparations utilisées dans nos expériences. Les autres éléments seront présentés plus succinctement. Nos travaux font intervenir essentiellement les effets aigus de l'hypoxie.

1 - Rôle du système nerveux

Le système nerveux autonome peut modifier le débit sanguin dans des conditions physiologiques et être impliqué dans la physiopathologie de maladies vasculaires pulmonaires. Les mécanismes du contrôle nerveux autonome sont mieux connus depuis l'identification de nouveaux transmetteurs comme les neuropeptides, les purines et le monoxyde d'azote (NO), l'individualisation de différents sous-types de récepteurs et la mise en évidence de multiples mécanismes de contrôle préjonctionnels à l'extrémité des terminaisons nerveuses autonomes.

Les études histochimiques montrent que, dans toutes les espèces, les artères extrapulmonaires ont de nombreuses fibres nerveuses contenant des catécholamines mais leur densité au niveau des artères intrapulmonaires varie considérablement selon les espèces. Chez le rat, il n'a pas été retrouvé de fibres nerveuses contenant des catécholamines (Barnes & Liu,

1995) alors que les artères intrapulmonaires de chien (Kadowitz *et al.*, 1981) et d'homme (Barnes & Liu, 1995) ont une innervation adrénergique dense.

Des récepteurs α - et β -adrénergiques ont été mis en évidence dans les vaisseaux pulmonaires et prédominent au niveau des artères de large calibre. Leur activation induit respectivement une vasoconstriction et une vasodilatation. La stimulation sympathique induit une réduction de la compliance des gros vaisseaux pulmonaires, et une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (Fishman, 1985). Ces effets sont médiés par les récepteurs α -adrénergiques, essentiellement de type α_1 , les récepteurs α_2 ayant un rôle moindre. La noradrénaline agit également sur des récepteurs β -adrénergiques et sur des récepteurs α_2 -adrénergiques endothéliaux, induisant une vasodilatation pulmonaire par une libération de NO (Liu *et al.*, 1991a ; Pepke-Zaba *et al.*, 1993). Dans des conditions physiologiques, la réponse vasodilatatrice est masquée par la contraction médiée par les récepteurs α_1 -adrénergiques. Le tonus sympathique contribue au maintien du tonus vasculaire pulmonaire basal et à sa modulation dans différentes conditions physiologiques, notamment en hypoxie aiguë (Liu & Barnes, 1997) ; l'administration d'antagonistes α -adrénergiques réduit les résistances vasculaires pulmonaires chez des chiens éveillés (Murray *et al.*, 1986) et la vasoconstriction hypoxique chez des chiens anesthésiés (Brimioulle *et al.*, 1997). La contraction du muscle lisse vasculaire pulmonaire est médiée principalement par des récepteurs α_1 -adrénergiques chez le chat (Hyman *et al.*, 1986) et le cochon (Pepke-Zaba *et al.*, 1993).

La localisation des différents sous-types de récepteurs α -adrénergiques n'est pas bien connue chez le chien. Les artères pulmonaires de chien ont une innervation noradrénergique importante (Kobayashi & Amenta, 1994). La noradrénaline induit une constriction des grosses branches des artères pulmonaires (Greenberg *et al.*, 1981 ; Hakim 1988 ; Kobayashi & Amenta, 1994), mais paraît dénuée d'action au niveau des petites artères (Hakim 1988 ; Kobayashi & Amenta, 1994). Dans un modèle de poumon perfusé chez le chien anesthésié, les agonistes α_1 -adrénergiques induisent une vasoconstriction artérielle (Shebuski *et al.*, 1986). Ces résultats contradictoires nous ont conduit à étudier les effets de l'urapidil, un antagoniste α_1 -adrénergique, sur la relation pression/débit dans la circulation pulmonaire périphérique, chez le chien anesthésié (cf. p. 121).

L'innervation cholinergique de la circulation pulmonaire joue un rôle moins important que l'innervation adrénergique dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire. Des terminaisons nerveuses parasympathiques ont été identifiées au niveau des artères mais le rôle physiologique du système cholinergique dans la modulation du tonus vasculaire pulmonaire est discuté. Le système cholinergique ne paraît pas important dans le maintien d'un faible tonus vasculaire pulmonaire car le blocage cholinergique ne modifie pas la pression artérielle pulmonaire basale ni les résistances vasculaires pulmonaires (Murray *et al.*, 1986). La réponse vasculaire pulmonaire à l'acétylcholine dépend du tonus vasculaire, provoquant peu de modification quand le tonus est faible mais une vasodilatation artérielle avec inhibition de la vasoconstriction hypoxique quand le tonus est élevé. La vasorelaxation est médiée par des récepteurs muscariniques de type M₃ dont l'activation provoque une libération endothéliale de NO à l'origine de la vasodilatation. Les facteurs endothéliaux ont un rôle fondamental dans le mécanisme d'action de l'acétylcholine.

Le rôle du système non adrénergique et non cholinergique (NANC) est démontré *in vitro*. Les neurotransmetteurs du système NANC dans les vaisseaux pulmonaires dépendent des espèces étudiées et de la taille des vaisseaux (Barnes & Liu, 1995). Il a été mis en évidence un système excitateur vasoconstricteur dont un des médiateurs est l'ATP et un système inhibiteur vasodilatateur dont le principal médiateur est le NO. Le rôle de neuropeptides comme le «Vasoactive Intestinal Peptide» (VIP), la substance P et le «Calcitonin gene-related peptide» (CGRP) dans la réponse neurogène vasodilatatrice a été évoqué mais n'a pas été confirmé (Barnes & Liu, 1995). Le rôle du système non adrénergique et non cholinergique n'a pas été démontré *in vivo* et son rôle physiologique est donc controversé dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire.

La circulation pulmonaire est sous le contrôle de mécanismes reflexes centraux et périphériques. Une stimulation hypothalamique ou médullaire localisée provoque une vasoconstriction. Le tonus vasculaire pulmonaire est aussi modulé par des chémorécepteurs périphériques et des barorécepteurs. Selon les conditions expérimentales, la stimulation des chémorécepteurs carotidiens et aortiques augmente ou diminue les résistances vasculaires pulmonaires (Barnes & Liu, 1995). La stimulation des barorécepteurs du sinus carotidien et de

la crosse aortique par une élévation de la pression artérielle systémique induit une vasodilatation pulmonaire par diminution de la stimulation sympathique vasoconstrictrice ou par activation des nerfs sympathiques vasodilatateurs. Chez le chien anesthésié, l'occlusion carotidienne bilatérale affecte peu la résistance vasculaire pulmonaire mais ceci n'exclut pas une modulation réflexe du tonus vasomoteur pulmonaire (Pace, 1978). La stimulation des récepteurs intra-pulmonaires provoque une action réflexe. La distension du tronc de l'artère pulmonaire produit une vasoconstriction ; la stimulation de récepteurs dans de petits vaisseaux pulmonaires par de microembols induit une vasodilatation pulmonaire (Barnes & Liu, 1995).

En résumé, le rôle du système nerveux dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire apparaît important. Le système adrénergique participe au maintien du tonus vasculaire basal et à son adaptation physiologique. Le rôle physiologique du système cholinergique et du système NANC n'est pas établi *in vivo*.

Le tonus vasculaire pulmonaire est contrôlé par un réseau complexe d'éléments nerveux mais aussi humoraux.

2 - Mécanismes humoraux

De nombreux médiateurs et hormones ont un effet, médié par de multiples récepteurs, sur le tonus vasculaire pulmonaire (Tableau 1). Cet effet varie selon les espèces, l'âge et le tonus vasculaire. En général, l'angiotensine II, le neuropeptide Y, les prostaglandines D_2 , E_2 , $F_{2\alpha}$ sont vasoconstricteurs, le facteur atrial natriurétique (ANF), le VIP, le CGRP, l'adénosine monophosphate (AMP), les prostaglandines E_1 , I_2 sont vasodilatateurs. La bradykinine, l'arginine vasopressine, les endothélines, la substance P, l'histamine, la sérotonine, l'acide arachidonique, l'adénosine, l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP), le facteur d'activation plaquettaire (PAF) ont des effets variables selon le tonus, provoquant une vasoconstriction quand le tonus vasculaire pulmonaire est bas et une vasodilatation quand le tonus est élevé (Cigarini *et al.*, 1989 ; Adnot *et al.*, 1991 ; Barnes & Liu, 1995).

L'angiotensine II, la bradykinine, l'arginine vasopressine, le VIP, le CGRP, la substance P, le neuropeptide Y, l'histamine, la sérotonine peuvent agir sur le tonus vasculaire pulmonaire mais n'ont probablement pas de rôle physiologique. Le rôle physiologique d'autres

Tableau 1

Principaux médiateurs et hormones agissant sur le tonus vasculaire pulmonaire

(adapté de Barnes & Liu, 1995)

médiateur ou hormone	effet vasomoteur	rôle physiologique	action pharmacologique sur la vasoconstriction hypoxique
acétylcholine	variable	non	oui
acide arachidonique	variable	oui	?
Adénosine	variable		
ADP	variable		
AMP	vasodilatation		
ANF	vasodilatation	oui	oui
angiotensine II	vasoconstriction	non	oui
ATP	variable	oui	oui
bradykinine	VD, variable	non	oui
CGRP	vasodilatation	non	oui
endothéline-1	VC, variable	oui	oui
endothéline-3	VD, variable	oui	oui
histamine	variable	non	
leucotriène C ₄	vasoconstriction		
neuropeptide Y	vasoconstriction	non	
PAF	variable		oui
prostaglandine D ₂	vasoconstriction		oui
prostaglandine E ₂	vasoconstriction		
prostaglandine F _{2α}	vasoconstriction		
prostaglandine I ₂	vasodilatation		oui
sérotonine	variable	non	non
substance P	variable	non	oui
thromboxane A ₂	vasoconstriction		?
vasopressine	variable	non	oui
VIP	vasodilatation	non	

VD, variable : vasodilatation inconstante ; VC, variable : vasoconstriction inconstante

médiateurs est plus probable. L'ANF est un peptide de 28 acides aminés synthétisé essentiellement par l'oreillette. L'artère pulmonaire a de nombreux récepteurs à l'ANF. L'ANF a une action vasodilatatrice pulmonaire, *in vitro* et *in vivo*. La concentration d'ANF augmente transitoirement au cours de l'hypoxie aiguë (Baertschi & Teague, 1989). L'ANF exerce un effet relaxant sur l'artère pulmonaire au cours de l'hypoxie aiguë (Adnot *et al.*, 1988).

Les endothélines (ET) sont des peptides de 21 acides aminés dont il existe au moins trois formes moléculaires distinctes et actives nommées ET-1, ET-2 et ET-3. Ce peptide libéré par les cellules endothéliales peut se fixer sur des récepteurs situés sur les cellules endothéliales (système autocrine) et/ou musculaires lisses (système paracrine). Dans la circulation pulmonaire, l'ET-1 et l'ET-3 ont une action essentiellement vasodilatatrice à faibles doses inhibant la vasoconstriction hypoxique (Hasunuma *et al.*, 1990 ; Crawley *et al.*, 1992). A fortes doses, l'ET-1 a une action vasoconstrictrice ; c'est le plus puissant vasoconstricteur connu.

L'acide arachidonique est un acide gras essentiel et est un des éléments constitutifs de la couche phospholipidique de la membrane cellulaire. L'acide arachidonique est métabolisé par 2 voies. La voie de la 5'-lipooxygénase conduit à la production de leucotriènes et la voie de la cyclooxygénase à la formation de prostaglandines et de thromboxane A₂. La réponse contractile à l'acide arachidonique est due en large partie à la formation de thromboxane A₂ et d'autres prostanoides (McMahon *et al.*, 1991b). Le thromboxane A₂ et son dérivé stable le thromboxane B₂ sont des vasoconstricteurs pulmonaires (Friedman *et al.*, 1979). Le rôle des métabolites de l'acide arachidonique dans la vasoconstriction hypoxique est discuté. Les interactions complexes synergiques ou antagonistes entre ces médiateurs rendent l'évaluation de leur rôle très difficile. L'hypoxie aiguë favorise la libération de prostacycline qui atténue la vasoconstriction hypoxique. L'administration d'inhibiteurs de la cyclooxygénase potentialise la vasoconstriction hypoxique (Leeman *et al.*, 1987).

Les cytokines sont des médiateurs protéiques doués de diverses propriétés biologiques, incluant la médiation ou la modulation de l'inflammation, la croissance cellulaire, l'immunité et la réparation tissulaire. Les cytokines ne sont pas vasoactives en elles-mêmes mais peuvent moduler le tonus vasculaire par l'inhibition ou la stimulation de médiateurs vasoactifs. Ainsi l'endotoxine favorise l'expression d'une enzyme, la NO synthase inductible, au cours du choc

septique. L'induction de la NO synthase inductible conduit à la formation de quantités importantes de NO qui rendent compte de l'hyporéactivité vasculaire pulmonaire lors de l'endotoxémie (Griffiths *et al.*, 1993).

Il apparaît donc que la circulation pulmonaire peut être modulée par de nombreux facteurs humoraux et autocrines mais leurs rôles physiologiques précis et leurs implications physiopathologiques ne sont pas déterminés. L'inhibition de la production de ces substances ou le blocage de leurs récepteurs n'a pas d'effet sur le tonus vasculaire pulmonaire basal, suggérant qu'aucune de ces substances n'est le facteur principal du maintien d'un faible tonus vasculaire pulmonaire (McMurtry, 1986). Ces résultats n'excluent pas la possibilité que ces substances contribuent partiellement au faible tonus vasculaire pulmonaire. Comme le lit vasculaire pulmonaire est sous l'influence d'un grand nombre de substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices, il est possible que la suppression des effets d'un ou deux médiateurs n'induisse pas de changement important du tonus vasculaire pulmonaire car un tel changement pourrait être parfaitement compensé par une augmentation de l'activité des autres médiateurs. En outre, d'autres facteurs comme le recrutement et la distensibilité vasculaire, la faible épaisseur du muscle lisse vasculaire, le faible tonus basal α -adrénergique et l'aptitude des cellules endothéliales à inactiver de nombreuses substances vasoconstrictrices libérées localement ou par la circulation systémique contribuent aussi au faible tonus vasculaire pulmonaire. L'angiotensine II, l'arginine vasopressine, l'ANF, l'ATP, l'acétylcholine, la bradykinine, la dopamine, l'endothéline-1, l'endothéline-3, le facteur d'activation plaquettaire, les prostaglandines D₂ et I₂, et la substance P peuvent inhiber la vasoconstriction pulmonaire hypoxique, suggérant leur participation dans la modulation de la vasoconstriction hypoxique.

3 - Hypoxie et hypercapnie aiguës

La circulation pulmonaire est la seule circulation d'organe dotée d'une vasoconstriction hypoxique. L'hypoxie est le plus important mécanisme de contrôle actif de la circulation pulmonaire. La vasoconstriction hypoxique a fait l'objet de très nombreux travaux depuis sa description par Von Euler et Liljestrand (1946). La baisse de la PO₂ du sang veineux mêlé influence peu la réponse hypoxique (Duke, 1954; Marshall & Marshall, 1983).

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de CO₂ dans le sang veineux mêlé est le principal stimulus de la réponse hypercapnique. L'hypercapnie potentialise la vasoconstriction hypoxique (Emery *et al.*, 1977). La réponse hypercapnique a été l'objet de multiples travaux. Nous ne les détaillerons pas davantage car le sujet de notre travail est l'hypoxie aigue normocapnique.

Le principal stimulus de la vasoconstriction hypoxique est la baisse de la PO₂ alvéolaire au-dessous de 60 mmHg (Duke, 1954; Marshall & Marshall, 1983). Chez le sujet sain, la vasoconstriction pulmonaire débute quelques secondes après l'installation du stimulus hypoxique, est maximale au bout de quelques minutes et est rapidement réversible à l'arrêt de l'hypoxie. Dans le poumon adulte, la vasoconstriction hypoxique permet l'ajustement de la perfusion capillaire pulmonaire à la ventilation alvéolaire. La baisse de la pression alvéolaire en oxygène dans l'ensemble du poumon (altitude, inhalation d'un mélange gazeux hypoxique) induit une hypertension artérielle pulmonaire (Rotta *et al.*, 1956). En cas d'hétérogénéité des rapports ventilation-perfusion, la vasoconstriction hypoxique réduit la perfusion des zones mal ventilées et ainsi améliore l'oxygénation artérielle.

Le siège de la vasoconstriction hypoxique se situe au niveau des artères musculaires. Chez le chat, seules les artères pulmonaires d'un diamètre inférieur à 300 µm répondent à l'hypoxie par une vasoconstriction (Madden *et al.*, 1985). La vasoconstriction hypoxique est rapide, reproductible, atteint un maximum pour une PO₂ de 30 à 50 mmHg et décroît pour une PO₂ inférieure à 20 mmHg. Les cellules musculaires lisses en cultures obtenues à partir d'artères pulmonaires se contractent en hypoxie (Murray *et al.*, 1990). Les mécanismes de la vasoconstriction hypoxique sont détaillés plus loin.

4 - Rôle de l'endothélium

L'endothélium joue un rôle très important dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire. En 1980, Furchgott et Zawadzki démontrent que la vasorelaxation d'anneaux vasculaires aortiques induite par l'acétylcholine nécessite la présence d'un endothélium vasculaire intact (Furchgott & Zawadzki, 1980).

a - Le NO

La relaxation du muscle lisse, induite par l'acétylcholine, dépend de la libération endothéliale d'une substance labile, non prostanoïde, dénommée «Endothelium-Derived Relaxing Factor» ou «EDRF» (Cherry *et al.*, 1982). Ce phénomène de relaxation dépendante de l'endothélium a été observé ensuite dans de nombreuses préparations vasculaires, incluant des artères, veines et microvaisseaux en réponse à différents stimuli physiques et pharmacologiques. La similitude des actions pharmacologiques a permis de démontrer que le NO est l'EDRF (Palmer *et al.*, 1987). Un autre facteur relaxant dépendant de l'endothélium non prostanoïde, différent du NO, a été proposé et dénommé «Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor» ou «EDHF» (Komori & Vanhoutte, 1990). La nature de l'EDHF n'est pas identifiée mais son action n'est pas inhibée par l'hémoglobine et le bleu de méthylène comme celle du NO. Le rôle physiologique de l'EDHF n'est pas connu mais il pourrait participer à la vasodilatation induite par certains vasodilatateurs comme l'acétylcholine. En effet, dans une préparation de poumon perfusé isolé de rat, la vasodilatation induite par l'acétylcholine n'est pas inhibée par les inhibiteurs de la NOS alors que la relaxation induite par la bradykinine, un autre médiateur dépendant de l'endothélium, est inhibée par les inhibiteurs de la NOS (Archer *et al.*, 1989).

Le NO est formé à partir de l'atome d'azote de la L-arginine et d'oxygène (Palmer *et al.*, 1988). La réaction est catalysée par une enzyme, la NO synthétase nommée également NO synthase (NOS), en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Différents analogues de la L-arginine inhibent la synthèse de NO par compétition avec la L-arginine, comme le N^ω-nitro-L-arginine (L-NA), le N^ω-nitro-L-arginine-méthyl ester (L-NAME) et le N^ω-nitro-monométhyl-L-arginine (L-NMMA). Ces molécules sont souvent dénommées inhibiteurs de la NOS. Plusieurs NOS ont été identifiées dans différentes cellules dont la NOS inducible (iNOS) et la NOS constitutive (cNOS). La cNOS est cytosolique, dépendante du calcium et libère du NO en quantité limitée en réponse à une stimulation physique ou à l'activation d'un récepteur (figure 5). Le NO libéré par cette enzyme agit comme un mécanisme de transduction dans différentes réactions physiologiques, en particulier au niveau vasculaire.

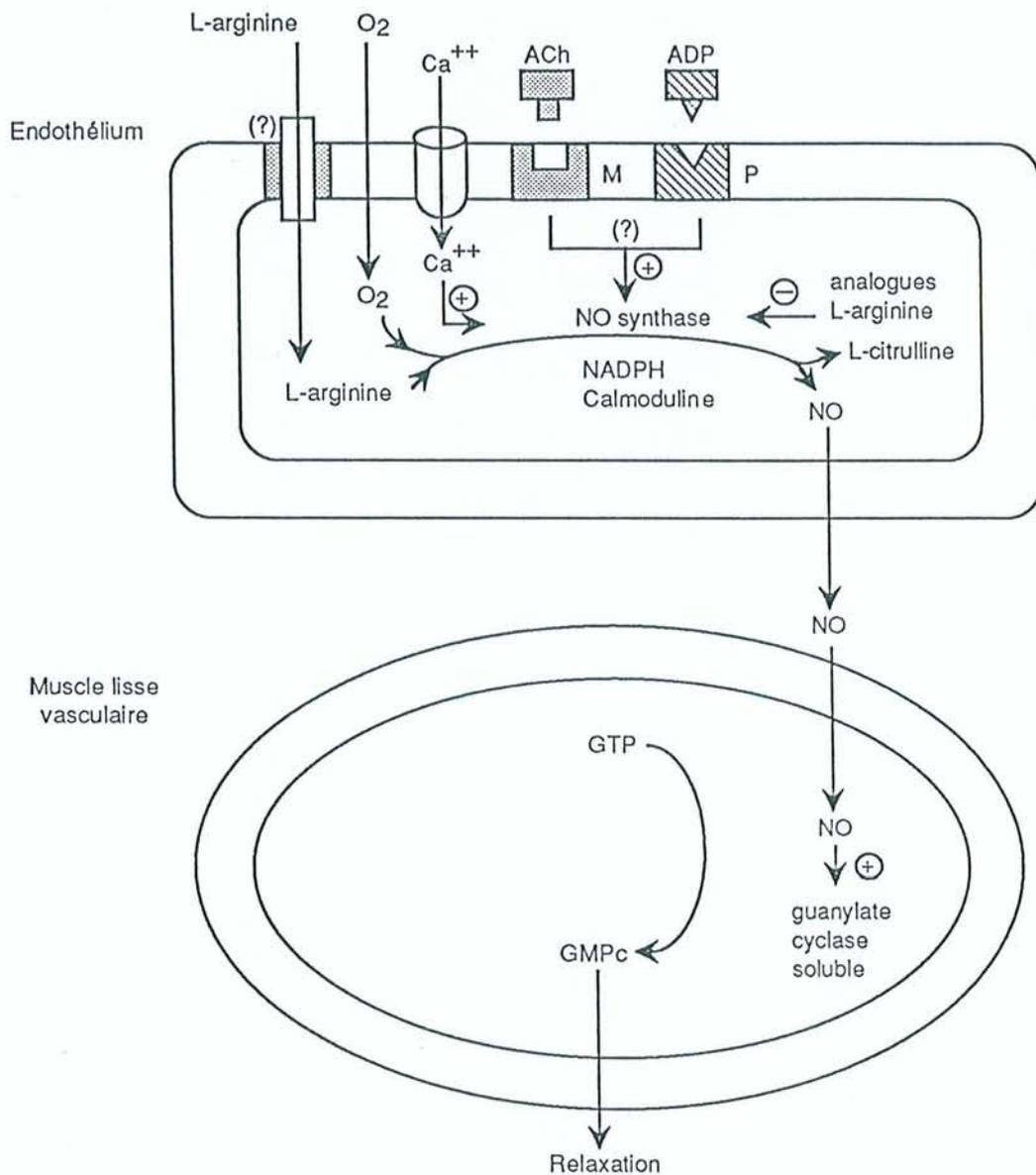


Fig 5 : Synthèse endothéliale et action du NO sur le muscle lisse vasculaire (d'après Dinh-Xuan, 1992).

La stimulation de récepteurs endothéliaux spécifiques ou une augmentation de la concentration de calcium cytosolique active la NO synthétase qui catalyse la formation de NO à partir de L-arginine, en présence de co-facteurs. La synthèse est inhibée par les analogues de la L-arginine. Le NO, libéré par l'endothélium, active la guanylate cyclase soluble, augmentant la concentration de GMPC à l'origine de la vasorelaxation.

L'autre enzyme, iNOS, est indépendante du calcium, est induite par l'activation de macrophages, de cellules endothéliales et d'autres cellules par des cytokines et synthétise des quantités importantes de NO. Le NO libéré dans ces conditions a un rôle cytotoxique et peut être à l'origine d'une vasodilatation pathologique et de lésions tissulaires (Moncada *et al.*, 1991).

Dans la cellule endothéliale, l'activité de la cNOS est régulée par l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium en réponse à des stimuli physiques (forces de cisaillement) ou pharmacologiques (acétylcholine, sérotonine) (Moncada *et al.*, 1991). Les études immunohistochimiques révèlent la présence de cNOS au niveau de l'endothélium bordant les branches proximales des artères pulmonaires et peut-être aussi au niveau des vaisseaux de résistance (Kobzik *et al.*, 1993). Le NO agit en stimulant la guanylate cyclase cytosolique des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, augmentant la concentration de GMP cyclique intracellulaire. L'action du NO est inhibée par le bleu de méthylène qui inhibe la guanylate cyclase et également par l'hémoglobine sur laquelle il se fixe très rapidement dans le sang.

b - Libération de NO à l'état basal

Le rôle du NO libéré à l'état basal par les cellules endothéliales dans le maintien d'un faible tonus vasculaire pulmonaire est discuté. Son importance est suggérée par le fait que de nombreux facteurs humoraux et autocrines induisent une vasodilatation pulmonaire par l'intermédiaire d'une libération de NO. Parmi ces facteurs, citons l'acétylcholine (McMahon *et al.*, 1991a), la noradrénaline (Liu *et al.*, 1991a), la bradykinine (Ignarro *et al.*, 1987), la substance P (McMahon & Kadowitz, 1993), l'ATP (Liu *et al.*, 1992), l'histamine (Szarek *et al.*, 1992), l'endothéline-1 et l'endothéline-3 (Crawley *et al.*, 1992).

Cependant, le rôle du NO endogène dans la modulation du tonus vasculaire à l'état de base varie selon les espèces. L'inhibition de la synthèse du NO par des analogues de la L-arginine ne modifie pas la pression ou la résistance vasculaire pulmonaire chez le rat (Archer *et al.*, 1989 ; Hasunuma *et al.*, 1991a ; Dumas *et al.* ; 1996), le chien (Nishiwaki *et al.*, 1992 ; Barnard *et al.*, 1993). A l'inverse, la tension pariétale de vaisseaux résistifs de rat est augmentée par le L-NAME (Steeds *et al.*, 1997). La résistance vasculaire pulmonaire basale est aussi augmentée par l'inhibition de la cNOS chez le lapin (Persson *et al.*, 1990), l'agneau (Fineman *et*

al., 1991) et l'homme (Stamler *et al.*, 1994 ; Cooper *et al.*, 1996). Le bleu de méthylène augmente aussi la pression artérielle pulmonaire chez le chat (Hyman *et al.*, 1989). L'inhibition de la NOS ne modifie pas le tonus basal d'anneaux vasculaires pulmonaires isolés de rats (Crawley *et al.*, 1990), mais augmente la tension d'anneaux de porc ou de cochon d'Inde (Liu *et al.*, 1992b). Ces résultats contradictoires sont attribués à des différences liées aux espèces animales et aux conditions expérimentales.

Les mesures directes des taux de base de NO et de ses produits d'oxydation, les nitrites, donnent également des résultats contradictoires avec des valeurs élevées (Rich *et al.*, 1993) ou basses (Isaacson *et al.*, 1994) de NO dans l'effluent de poumon perfusé isolé. Dans ce dernier travail, la synthèse de NO des cellules endothéliales en culture est minime à l'état de base (Isaacson *et al.*, 1994).

Au vu des résultats contradictoires des différentes expériences, il est difficile de conclure sur l'importance de la libération de NO dans le maintien du tonus vasculaire pulmonaire à l'état basal. Ceci nous a amené à étudier les effets du L-NAME sur la relation pression/débit dans la circulation pulmonaire périphérique, *in vivo*, chez le chien anesthésié (cf p. 118). Nous avons également étudié l'effet d'un autre inhibiteur de la NOS, le L-NA, sur la tension isométrique d'anneaux vasculaires pulmonaires isolés de rats, à l'état basal et après administration de phényléphrine, un agoniste α_1 -adrénergique (cf p. 92-93).

c - Libération de NO après augmentation du tonus vasculaire pulmonaire

Les effets du NO dépendent également du tonus vasculaire pulmonaire. Les inhibiteurs de la synthèse de NO n'ont pas d'effet à l'état de base sur la pression de perfusion dans une préparation de poumon isolé perfusé (Archer *et al.*, 1989 ; Hasunuma *et al.*, 1991) mais augmentent la pression artérielle pulmonaire ou la résistance vasculaire en cas d'hypertension artérielle pulmonaire préexistante (Oka *et al.*, 1993) ou d'augmentation de la pression veineuse telle que l'ensemble du lit vasculaire pulmonaire soit en zone 3 de West (Barnard *et al.*, 1993). Dans ce dernier travail, l'indométacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase, n'a pas d'effet sur les résistances vasculaires pulmonaires de rat mais augmente celles de chiens suggérant pour les auteurs que les prostaglandines vasodilatatrices régulent le tonus vasculaire pulmonaire chez le

chien et que le NO contrôle le faible tonus vasculaire pulmonaire chez le rat (Barnard *et al.*, 1993).

La production permanente de NO dans la circulation pulmonaire de certaines espèces pourrait donc être responsable du faible tonus vasculaire pulmonaire. Il existe cependant des résultats contradictoires et certaines expériences vont à l'encontre de cette théorie. L'administration chronique d'inhibiteurs de la NOS n'induit pas d'hypertension artérielle pulmonaire. Par contre, l'inhibition de la NOS potentialise la vasoconstriction pulmonaire pharmacologique induite par l'endothéline, l'angiotensine II ou la sérotonine suggérant un rôle protecteur du NO face à différents stimuli vasoconstricteurs (Adnot *et al.*, 1991). Il existe des récepteurs situés sur l'endothélium et sur le muscle lisse vasculaire pour ces substances. L'action globale de ces substances sur le tonus vasculaire résulte de leurs deux composantes, vasodilatatrice médiée par le NO endothélial et vasoconstrictrice par la stimulation du muscle lisse. L'abondance des récepteurs endothéliaux au niveau de la circulation pulmonaire rend compte de l'activité essentiellement vasodilatatrice de nombreuses substances. L'inhibition du NO potentialise aussi la vasoconstriction hypoxique dans différents modèles animaux (Brashers *et al.*, 1988). L'effet direct de l'hypoxie sur le NO est confirmé par l'augmentation de l'expression du gène de la NOS de cellules endothéliales soumises à une hypoxie *in vitro* (Arnet *et al.*, 1994).

Outre cette action vasodilatatrice, le NO a des propriétés d'inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire et d'inhibition de la multiplication des cellules musculaires lisses (Moncada *et al.*, 1991).

En résumé, l'endothélium pulmonaire module le tonus vasculaire pulmonaire. La libération basale de NO augmente quand la pression artérielle pulmonaire ou les RVP augmentent, limitant ainsi l'augmentation du tonus vasculaire pulmonaire.

d - Tonus adrénergique

Le tonus adrénergique (cf p. 43-44) est modulé par l'endothélium vasculaire pulmonaire. Les cellules endothéliales capturent et dégradent la noradrénaline, la sérotonine et l'ATP, principaux médiateurs et co-médiateurs des nerfs adrénergiques. Les cellules

endothéliales diminuent ainsi la contraction adrénérique d'une part et d'autre part, activent et libèrent des vasoconstricteurs qui peuvent agir en synergie avec la noradrénaline. Le retrait de l'endothélium vasculaire augmente la réponse contractile aux agonistes adrénériques (Greenberg *et al.*, 1989 ; Crawley *et al.*, 1990) et à la stimulation nerveuse adrénérique (Greenberg *et al.*, 1989). Le mécanisme d'action de l'endothélium a été l'objet de nombreuses investigations. Le rôle des prostaglandines vasodilatatrices synthétisées par l'endothélium (Greenberg *et al.*, 1989 ; Liu *et al.*, 1991a) ou d'une réduction de la dégradation de la noradrénaline (Greenberg *et al.*, 1989) est mineur. Le rôle du NO a été mis en évidence dans des expériences sur des artères pulmonaires isolées de cochon d'Inde. La stimulation électrique des nerfs adrénériques dans la paroi vasculaire provoque une contraction qui est augmentée de manière dépendante de la concentration par les inhibiteurs de la NOS et diminuée par le substrat de la synthèse du NO, la L-arginine. Ce résultat démontre que le NO endogène est responsable de l'inhibition de la contraction médiée par l'endothélium (Liu *et al.*, 1991a). Le rôle d'une activation des récepteurs endothéliaux α_2 -adrénériques conduisant à une libération de NO à partir des cellules endothéliales a été évoqué car il existe des récepteurs α_2 adrénériques endothéliaux sur les vaisseaux pulmonaires (Liu *et al.*, 1991a) et le NO est le médiateur de la vasodilatation pulmonaire induite par les agonistes α_2 -adrénériques (Liu *et al.*, 1991a ; Pepke-Zaba *et al.*, 1993). Cependant le rôle de la libération de NO médiée par des récepteurs α_2 -adrénériques est peu vraisemblable dans les conditions physiologiques car la noradrénaline a un très faible effet vasorelaxant pulmonaire, même quand le tonus vasculaire est augmenté (Liu *et al.*, 1991a). La tension pariétale endothéliale, causée par des changements de vélocité et de viscosité du perfusé, et les déformations mécaniques de la paroi vasculaire induisent une libération de NO capable d'inhiber la contraction adrénérique dans les artères systémiques (Tsefamarian & Cohen, 1988). Ce mécanisme pourrait être en cause mais n'a pas été mis en évidence dans les vaisseaux pulmonaires.

Il apparaît donc que différents facteurs contribuent à l'inhibition de la contraction adrénérique médiée par l'endothélium. Le NO libéré par les cellules endothéliales à l'état basal et lors des stimulations mécaniques est le principal facteur d'inhibition de la contraction

adrénergique. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la réponse contractile à des vasoconstricteurs de mécanismes d'action différents constamment retrouvée après administration d'inhibiteurs de la NOS (Liu *et al.*, 1991a).

e - Réponse cholinergique

Le NO est le médiateur de la vasodilatation induite par l'acétylcholine dans la circulation pulmonaire (McMahon & Kadowitz, 1992). Chez le chat, la stimulation vagale du lit vasculaire pulmonaire précontracté entraîne une vasorelaxation, bloquée par l'atropine et inhibée par le L-NAME et l'inhibition de la guanylate cyclase. Dans la même préparation, le L-NAME n'a pas d'action inhibitrice sur la réponse vasodilatatrice pulmonaire induite par des drogues ayant d'autres mécanismes d'action comme l'adénosine, l'isoproterenol, la PGE₁ mais également le nitroprussiate de sodium et le nicorandil. Ces 2 derniers produits agissent par la voie du NO avec une libération directe de NO qui active la guanylate cyclase augmentant le taux de GMPc à l'origine de la vasodilatation. Le nicorandil a également des propriétés d'activation des canaux potassiques sur lesquelles nous reviendrons. Le mécanisme d'action de l'acétylcholine sur l'endothélium n'est pas connu car le médiateur est libéré à l'extrémité nerveuse parasympathique au niveau de la limite entre l'adventice et la média. L'acétylcholine diffuse probablement à travers la couche de cellules musculaires lisses. Comme cela a déjà été précisé, le rôle controversé du NO dans la vasorelaxation induite par l'acétylcholine exogène (Archer *et al.*, 1989) a été retrouvé par différents auteurs (Fineman *et al.*, 1991 ; McMahon *et al.*, 1991a ; McMahon & Kadowitz 1992 ; Liu *et al.*, 1991a), la différence de résultat pouvant dépendre en partie du modèle animal et expérimental.

f - Réponse non adrénérergique et non cholinergique

La réponse vasodilatatrice du système inhibiteur non adrénérergique et non cholinergique est partiellement dépendante de l'endothélium (Liu *et al.*, 1992a). Le NO est un neurotransmetteur du système inhibiteur non adrénérergique et non cholinergique dans les vaisseaux pulmonaires (Liu *et al.*, 1992b).

g - Mécanismes humoraux

Sous l'action de signaux physiques et pharmacologiques provenant de la circulation, l'endothélium produit des substances vasoactives, des agents agissant sur la multiplication cellulaire et des produits chimiotactiques qui interagissent avec d'autres cellules vasculaires et avec les cellules sanguines (figure 6). Parmi ces substances, le NO, les endothélines et les prostaglandines ont un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire. De nombreux autres systèmes vasoactifs sont synthétisés, libérés et dégradés par l'endothélium (Fishman, 1985). L'endothélium capture et dégrade des amines vasoactives comme la noradrénaline et la sérotonine, métabolise l'ATP en adénosine. Les cellules endothéliales contiennent l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui catalyse la formation d'angiotensine II et dégrade la bradykinine, l'endopeptidase neutre qui dégrade les enképhalines et d'autres petits peptides incluant les tachykinines.

De nombreuses substances vasoactives dont l'histamine, la sérotonine, l'ATP, l'ADP, la substance P et l'acide arachidonique, exercent leur action vasodilatatrice pulmonaire par l'intermédiaire de mécanismes dépendants de l'endothélium.

La tension pariétale est un autre mécanisme important, dépendant de l'endothélium, dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire, à l'origine d'une libération de prostacycline (Frangos *et al.*, 1985). L'augmentation du débit sanguin provoque également une libération endothéliale de NO (Rubanyi *et al.*, 1986). Donc, une augmentation du débit sanguin pulmonaire et peut-être la déformation endothéliale induite par une vasoconstriction provoquent une libération de NO et de prostacycline qui contre-balance l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire.

En résumé, l'endothélium a un rôle très important dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire. Le NO libéré à l'état basal des cellules endothéliales participe au maintien du faible tonus vasculaire pulmonaire et constitue un antagoniste de la contraction adrénergique. Le NO est le médiateur de la réponse vasodilatatrice pulmonaire à la stimulation cholinergique et à l'acétylcholine exogène. Le NO endogène est aussi un transmetteur du système NANC inhibiteur, à l'origine d'une vasorelaxation. L'endothélium module le métabolisme de

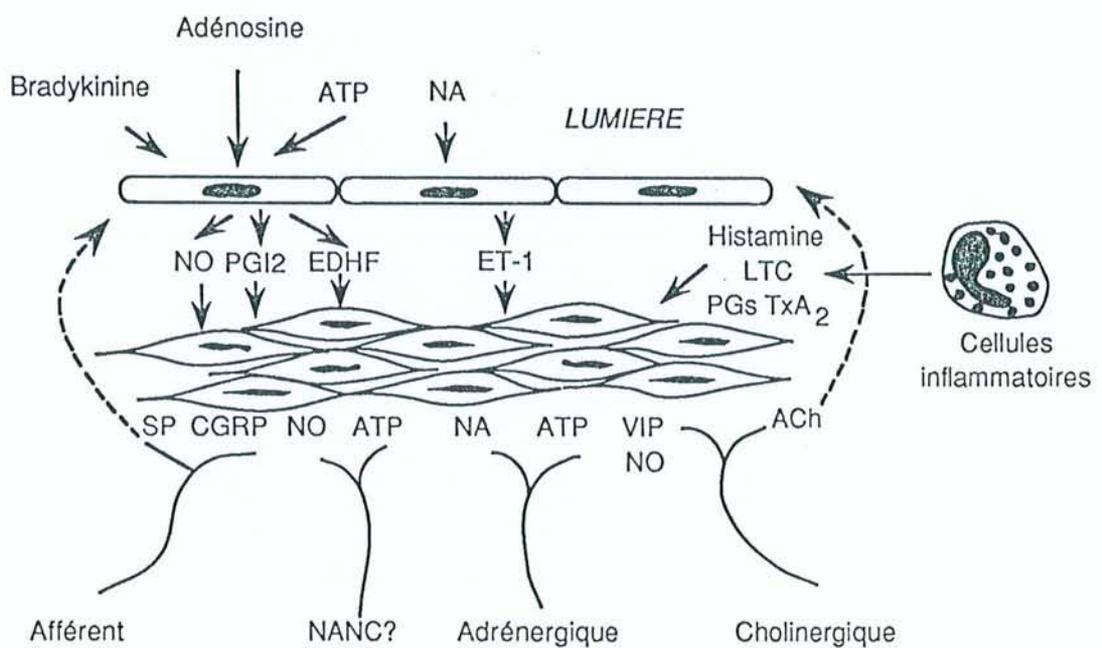


Fig 6 : Régulation du tonus vasculaire pulmonaire par le système nerveux autonome et des médiateurs libérés par les cellules endothéliales et inflammatoires (d'après Barnes & Liu, 1995).

nombreuses substances vasoactives dont le NO et les prostaglandines notamment pour réguler les variations de débit sanguin. Les principales substances vasoactives libérées par l'endothélium et leur mode d'action sont schématisés dans la figure 7.

5 - Les seconds messagers

Une communication très finement régulée entre les cellules est nécessaire pour assurer leur organisation en tissus ou organes possédant les propriétés et fonctions physiologiques appropriées. Cette coordination est assurée par des substances chimiques chargées de transmettre les signaux qui permettent la communication cellulaire. La majorité des messagers extra-cellulaires ne pénètrent pas dans la cellule mais ils s'accrochent à des récepteurs membranaires spécifiques situés à la surface des cellules. Des mécanismes de transduction transforment les signaux externes transportés par les messagers extracellulaires en signaux internes. Ces derniers agissent à l'intérieur des cellules en provoquant des réponses physiologiques adaptées aux messages de la circulation péricellulaire. Ce sont ces signaux intracellulaires qui sont nommés seconds messagers. Malgré le très grand nombre de réactions biochimiques intervenant dans le contrôle des réactions physiologiques, le nombre de voies de communications intracellulaires et donc de seconds messagers actuellement connu est limité.

a - Les nucléotides cycliques

Les nucléotides cycliques ont un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire. La guanosine monophosphate cyclique (GMPc) est le second messenger de la voie du NO et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) le second messenger de nombreux vasodilatateurs dont la prostacycline, les agonistes β -adrénergiques, le CGRP et le VIP. Les GMPc et AMPc exogènes sont de puissants vasodilatateurs pulmonaires (Haynes *et al.*, 1992 ; McMahon *et al.*, 1992 ; McMahon *et al.*, 1993a).

Le mécanisme d'action de la vasodilatation induite par le GMPc est partiellement connu. Il fait intervenir une activation de la protéine kinase G, une inhibition de l'inositol triphosphate (IP₃), une déphosphorylation de la kinase de la chaîne légère de la myosine, une

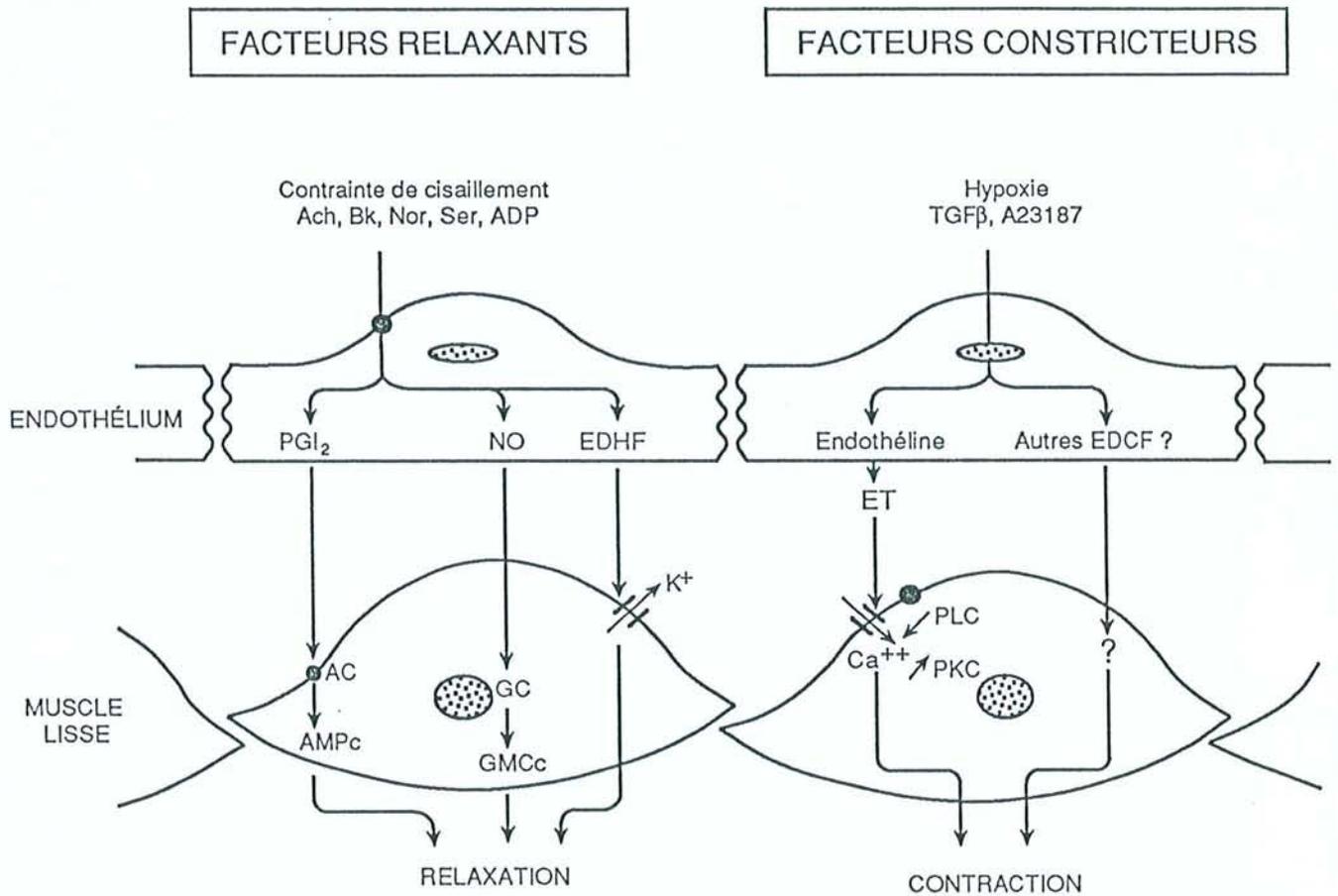


Fig 7 : Substances vasoactives libérées par l'endothélium (d'après Adnot *et al.* , 1996).
 Ach : acétylcholine, BK : bradykinine, Nor : noradrénaline, Ser : sérotonine, ADP : adénosine diphosphate, TGF β : transforming growth factor β, A23187 : ionophore calcique, PGI₂ : prostacycline, NO : monoxyde d'azote, EDHF : facteur endothélial hyperpolarisant, ET : endothéline, EDCF : facteur endothélial contractant, AC : adényl cyclase, GC : guanylate cyclase, PLC : phospholipase C, PKC : protéine kinase C.

stimulation de la Ca^{2+} -ATPase ouvrant les canaux potassiques et une inhibition de l'entrée de calcium. De même, différents mécanismes peuvent médier la réponse vasodilatatrice à l'AMPC, l'activation de la protéine kinase dépendant de l'AMPC entraînant une diminution de l'activité de la kinase de la chaîne légère de la myosine et une réduction de la phosphorylation, une inhibition de l'entrée de calcium, une stimulation de la sortie de calcium et une ouverture des canaux potassiques dépendants du calcium (Murray *et al.*, 1990). La stimulation de la formation d'AMPC et de GMPC module la vasoconstriction hypoxique et inhibe le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire hypoxique.

b - Hydrolyse du phosphoinositol

L'activation de la phospholipase C, résultant d'une stimulation de récepteurs couplés à la protéine G, conduit à une hydrolyse du phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate provoquant la génération de deux seconds messagers, l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) et le 1-2 diacylglycérol. L' IP_3 provoque une sortie du calcium contenu dans les réserves intracellulaires situées dans le réticulum endoplasmique, provoque une activation de la kinase de la chaîne légère de myosine dépendante de la calmoduline et du Ca^{2+} , une phosphorylation de la chaîne légère de myosine et une contraction du muscle lisse vasculaire (Berridge & Irvine, 1989). Le 1-2 diacylglycérol active les protéines kinases C. La plupart des médiateurs et des substances agissant par voie humorale modulent le tonus vasculaire pulmonaire par une stimulation de récepteurs couplés à la protéine G (Birnbaumer, 1990). La génération d' IP_3 est augmentée lors d'une vasoconstriction induite par la noradrénaline et non par l'hypoxie, suggérant que l' IP_3 n'est pas impliquée dans la contraction hypoxique de l'artère pulmonaire proximale (Jin *et al.*, 1993).

c - Les protéines kinases

Les protéines kinases jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques. Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines kinases dépendantes de l'AMPC et du GMPC ont un rôle dans la vasorelaxation pulmonaire. Une autre famille de protéines kinases, les protéines kinases C (PKC), sont activées par le 1-2 diacylglycérol et sont

présentes à hautes concentrations dans le muscle lisse vasculaire. Les PKC participent au signal de transduction impliqué dans l'excitation-contraction du muscle lisse vasculaire pulmonaire, probablement par le biais d'une phosphorylation de substrats impliqués dans le processus de contraction. L'activation des PKC contracte des anneaux vasculaires pulmonaires isolés de rat et augmente la pression de perfusion du lit vasculaire pulmonaire de rat (Orton *et al.*, 1990).

La transduction du signal fait intervenir, outre ces médiateurs intracellulaires (nucléotides cycliques, IP₃, PKC), les canaux calciques et potassiques.

6 - Les canaux ioniques

a - Les canaux calciques

Les changements de concentration intracellulaire de calcium [Ca²⁺]_i ont un rôle fondamental dans la contraction et la relaxation du muscle lisse et l'initiation d'autres réponses cellulaires. La régulation du [Ca²⁺]_i implique une interaction complexe entre l'entrée et l'extrusion de Ca²⁺ à travers la membrane plasmique, la libération et la recapture de Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique. Le mouvement du Ca²⁺ est contrôlé principalement par les canaux calciques. L'action des canaux calciques est le plus souvent couplée à celle des canaux potassiques. Deux types principaux de canaux calciques sont exprimés dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les canaux Ca²⁺ dépendants du voltage situés sur la membrane plasmique et les canaux de libération de Ca²⁺ intracellulaires sur le réticulum endoplasmique (Marks, 1992). Il existe différents types de canaux Ca²⁺ dont l'ouverture est déclenchée soit par la liaison d'un agoniste spécifique (ROC, «receptor-operated channels») soit par une dépolarisation membranaire, nommés voltage dépendants (VOC, «voltage-operated channels»), incluant les canaux de type L («long lasting»), T («transient») et N (ni T ni L), qui diffèrent par leur structure, leur fonction et leur propriétés pharmacologiques (Hughes, 1995). Les canaux Ca²⁺ dépendants du voltage au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires sont habituellement de type L, alors que la libération de Ca²⁺ intracellulaire est contrôlée par des récepteurs dépendant de l'IP₃ sur le réticulum sarcoplasmique (Marks, 1992).

Il existe peu de données électrophysiologiques sur les canaux Ca²⁺ et les courants Ca²⁺ dans les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires. L'hypoxie provoque une

contraction d'anneaux provenant de petits vaisseaux pulmonaires de chat. La réduction simultanée du potentiel de membrane cellulaire a fait suspecter le rôle d'un potentiel d'action dépendant du Ca^{2+} (Harder *et al.*, 1985). Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence d'une inhibition par l'hypoxie de l'activité des canaux potassiques (K^+), canaux dépendant du voltage et canaux K^+ activés par le Ca^{2+} . L'inhibition de l'activité des canaux K^+ induit une dépolarisation des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (Post *et al.*, 1992) et provoque une entrée de Ca^{2+} dans des cellules musculaires lisses en culture (Salvaterra & Goldmann, 1993). Il est possible que l'hypoxie inhibe les canaux K^+ , provoquant une dépolarisation membranaire des cellules musculaires lisses pulmonaires, à l'origine d'une ouverture des canaux Ca^{2+} avec une entrée de Ca^{2+} qui induit une contraction.

Dans les cellules musculaires lisses artérielles systémiques, l'hypoxie a des effets opposés à ceux observés au niveau pulmonaire. En effet, l'hypoxie provoque une ouverture des canaux potassiques à l'origine d'une hyperpolarisation qui ferme les canaux Ca^{2+} voltage dépendants.

Les études fonctionnelles suggèrent également un rôle important des canaux Ca^{2+} dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire. Les inhibiteurs des canaux Ca^{2+} inhibent la vasoconstriction hypoxique chez l'animal dans une préparation de poumon isolé perfusé (McMurtry *et al.*, 1976) et *in vivo* (Young *et al.*, 1983). Le BAY K 8644, un agoniste calcique, n'a pas d'effet sur la pression de perfusion à l'état de base mais potentialise la vasoconstriction hypoxique (McMurtry, 1985). Chez le chat anesthésié, la nisoldipine, une dihydropyridine, inhibe la réponse vasoconstrictrice au BAY K 8644, réduit dans des proportions équivalentes la réponse vasoconstrictrice induite par des agonistes α_1 - et α_2 -adrénergiques, et par le U46619, un produit mimant l'action du thromboxane A_2 . Ces résultats suggèrent qu'une source extracellulaire de calcium est nécessaire au maintien du tonus vasculaire pulmonaire et à l'action de certains stimuli vasoconstricteurs (Kadowitz *et al.*, 1989). Les antagonistes calciques inhibent aussi, et le BAY K 8644 potentialise, la vasoconstriction induite par l'angiotensine II ou le $\text{PGF}_{2\alpha}$. Cependant, l'effet des agonistes et des antagonistes calciques est plus important sur la vasoconstriction hypoxique que sur la contraction due à l'angiotensine II, suggérant que

la vasoconstriction hypoxique est plus dépendante du Ca^{2+} extra-cellulaire que la vasoconstriction induite par l'angiotensine II (McMurtry *et al.*, 1976 ; McMurtry 1985).

b - Les canaux potassiques

Le potentiel de membrane de la cellule vasculaire musculaire lisse est contrôlé en grande partie par les canaux potassiques. La dépolarisation membranaire et l'hyperpolarisation par l'intermédiaire respectivement d'une inhibition et d'une activation des canaux potassiques sont des mécanismes importants de la régulation de la contraction et de la relaxation du muscle lisse vasculaire. L'ouverture des canaux potassiques permet une sortie des cations potassium, laissant des macromolécules chargées négativement à l'intérieur de la cellule. Cela rend l'intérieur de la cellule encore plus négatif par rapport à l'extérieur de la cellule avec une hyperpolarisation membranaire (Brayden, 1996).

Le développement d'agonistes sélectifs des canaux potassiques a permis de préciser le rôle des canaux potassiques dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire. Différents types de canaux potassiques ont été identifiés et clonés. Différentes classes de canaux potassiques peuvent exister dans une même cellule et inversement une même classe peut être mise en évidence sur des cellules différentes. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires, ont été mis en évidence des canaux potassiques activés par le Ca^{2+} ou canaux K_{Ca} (Post *et al.*, 1992), des canaux potassiques dépendant du voltage ou canaux de rectification retardée, nommés usuellement «delayed rectifier» ou « K_{DR} » (Post *et al.*, 1995) et des canaux potassiques ATP dépendants canaux K_{ATP} (Wiener *et al.*, 1991 ; Clapp & Gurney, 1992) (Fig 8).

L'activité des canaux calciques est également liée à celle des canaux potassiques. Un potentiel de membrane plus négatif que -20 mV inactive des canaux calciques dépendant du voltage, réduit l'influx de calcium et inhibe la vasoconstriction. Les canaux calciques sont activés par la dépolarisation et par l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique et donc tendent à restaurer le potentiel de membrane à son niveau de base quand un stimulus vasoconstricteur provoque une dépolarisation. Les canaux K^+ dépendants du voltage ou activés

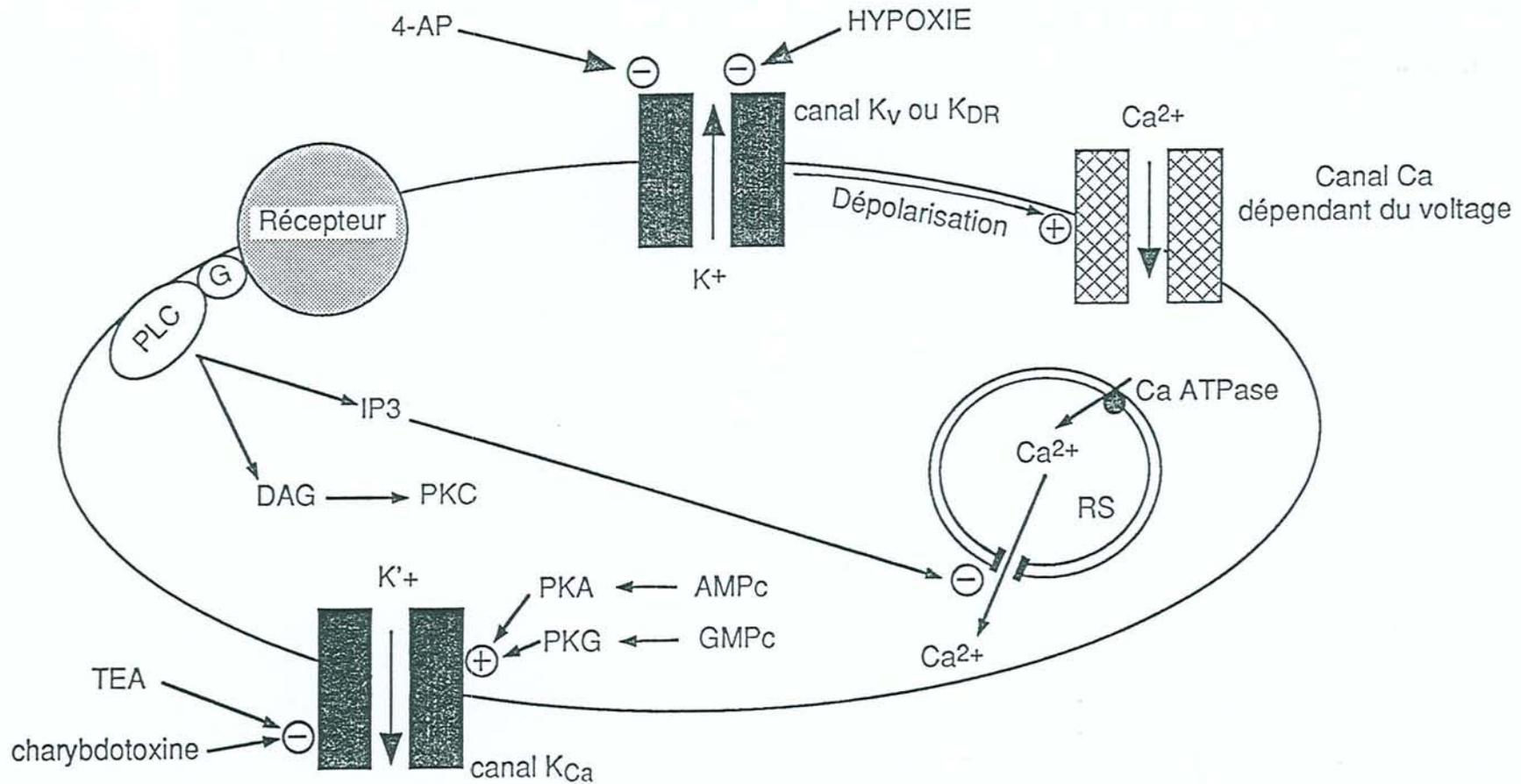


Fig 8 : Mode d'action des canaux potassiques et calciques au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire (d'après Brayden, 1996). Les agents vasoconstricteurs augmentent la concentration cytosolique de calcium. L'hypoxie inhibe le canal K_v, induit une dépolarisation et ouvre le canal Ca dépendant du voltage. Les agents vasodilatateurs peuvent activer les canaux K_{Ca} en augmentant l'activité de l'adenylate ou de la guanylate cyclase qui activent les protéines kinases A ou G.
 Abréviations: PLC : phospholipase C; DAG : diacylglycerol; IP₃ : inositol 1, 4, 5 triphosphate; G : protéine G; PK : proteine kinase; 4-AP : 4 aminopyridine ; +: ouverture du canal ionique; -: fermeture du canal

par le Ca^{2+} peuvent contribuer au maintien du tonus vasculaire pulmonaire basal (Hasunuma *et al.*, 1991b). Cependant, l'absence d'effet de la charybdotoxine, un antagoniste des canaux K_{Ca} , sur la pression de perfusion artérielle pulmonaire à l'état de base, dans un modèle de poumon perfusé isolé de rat, suggère que les canaux K_{Ca} ne jouent probablement pas un rôle important dans le maintien d'un faible tonus de base (Nossaman *et al.*, 1997). Les canaux K_{DR} contrôlent le potentiel de membrane de la cellule vasculaire musculaire lisse. Ces canaux K_{DR} sont inhibés par l'hypoxie (Yuan *et al.*, 1993). L'activation des canaux K_{ATP} réduit la tension des vaisseaux pulmonaires précontractés *in vitro* (Clapp *et al.*, 1993), dilate le lit vasculaire pulmonaire *in situ* (Hood *et al.*, 1991a, b) et *in vivo* à l'état basal (Minkes *et al.*, 1991). Un travail récent effectué sur des anneaux vasculaires pulmonaires de chien suggère que l'interaction synergique entre le NO et la PGI_2 est médiée par l'activation des canaux K_{ATP} , probablement par l'intermédiaire d'un facteur hyperpolarisant endothélial (Gambone *et al.*, 1997). Dans des expériences de poumon isolé perfusé, les canaux K_{ATP} ne sont pas mis en jeu en normoxie (Hasunuma *et al.*, 1991b ; Dumas *et al.*, 1996) ni en hypoxie (Dumas *et al.*, 1996) mais ils pourraient participer à la relaxation de l'artère pulmonaire anoxique (Wiener *et al.*, 1991). L'activité des canaux K^+ dépendants du voltage sur des cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire est inhibée par l'hypoxie et a été impliquée dans la vasoconstriction hypoxique (Post *et al.*, 1992).

c - Canaux ioniques et endothélium

La régulation de la concentration de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans l'endothélium pulmonaire est importante car elle gouverne l'activité de la cNOS. Le potentiel de membrane de la cellule endothéliale et la réponse aux agonistes sont médiés en grande partie par l'activité des canaux ioniques. Le taux d'entrée du calcium est régulé par l'état d'activation des canaux calciques et par le gradient électrochimique qui favorise l'entrée de calcium quand le potentiel de membrane est plus négatif. La relation entre tension pariétale et concentration de calcium intracellulaire dans l'endothélium pulmonaire est mal connue. Dans les vaisseaux systémiques, une augmentation de débit induit une activation des canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} . Il en résulte une vasodilatation due à une libération de NO, et non pas à une hyperpolarisation (Cooke *et al.*,

1991). Enfin, des variations brusques de tension pariétale peuvent induire une libération de calcium des réserves intracellulaires.

L'effet direct de l'hypoxie sur l'endothélium pulmonaire est controversé. La dépolarisation membranaire réduirait l'entrée de calcium et le calcium intracellulaire (Stevens *et al.*, 1994) ou au contraire augmenterait le calcium intracellulaire (Arnould *et al.*, 1992). Les différences méthodologiques entre ces deux études rendent l'interprétation des résultats difficile mais une baisse de calcium intracellulaire serait en accord avec une réduction de la production de NO endothélial observée *in vivo* au cours de l'hypoxie aiguë (Warren *et al.*, 1989).

Le NO agit en stimulant la guanylate cyclase cytosolique des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, augmentant la concentration de GMPc intracellulaire. Le GMPc, par le biais de la protéine kinase G, a différentes actions. La phosphorylation du phospholambane, une lipoprotéine acide, sur le réticulum sarcoplasmique provoque une séquestration de calcium. La phosphorylation des canaux potassiques voltage-dépendants conduit à une activation et à une hyperpolarisation, diminuant indirectement l'activation des canaux calciques de type L (Archer *et al.*, 1994). En outre, la sensibilité au calcium de l'appareil contractile est réduite par le GMPc (Lincoln & Cornwell, 1993). Récemment, une activation directe des canaux potassiques par le NO a été démontrée dans le muscle lisse vasculaire (Bolotina *et al.*, 1994). L'importance de ce mécanisme pour la circulation pulmonaire est incertaine. En dépit des nombreux progrès faits dans la compréhension des mécanismes d'action du NO et du GMP cyclique, un certain nombre de questions restent à résoudre. La plupart des observations ont été faites à partir de l'étude de vaisseaux pulmonaires proximaux mais leur signification pour les vaisseaux de résistance est à démontrer. Un des facteurs limitants est l'absence d'étude jusqu'à présent, pour des raisons techniques, des cellules musculaires lisses des vaisseaux résistifs.

L'endothélium artériel pulmonaire peut affecter le taux d'AMPc du muscle lisse par la production de PGI₂, le taux de GMPc par le NO et le potentiel de membrane par l'EDHF. Les productions de PGI₂ et de NO sont stimulées par la tension pariétale (Frangos *et al.*, 1985 ; Rubanyi *et al.*, 1986). Il apparaît donc que le faible tonus vasculaire pulmonaire observé *in vivo* dépend au moins en partie de l'endothélium. Cela n'est pas dû à un seul facteur endothélial car l'inhibition de chaque facteur isolément n'entraîne pas d'augmentation très importante des

résistances vasculaires pulmonaires *in vivo* ou *in vitro*. Le maintien d'un faible tonus vasculaire pulmonaire est assuré par de multiples voies complémentaires (Fig 9).

Dans certaines conditions pathologiques, les effets radicalaires du NO peuvent affecter le tonus vasculaire pulmonaire. *In vitro* et *in vivo*, le NO peut se combiner à l'anion superoxyde pour former le radical peroxynitrite (Beckman *et al.*, 1990). Ce radical agit sur le tonus vasculaire pulmonaire et peut participer à différentes réactions potentiellement délétères incluant la nitration de résidus tyrosine de protéines et la formation d'hydroxyl, un radical très réactif (Kooy *et al.*, 1995). Ces réactions n'ont pas de rôle important dans la circulation pulmonaire normale mais peuvent être importantes au cours d'une inflammation et sont détaillées dans le chapitre consacré au peroxynitrite.

En résumé, les mécanismes responsables du maintien du faible tonus vasculaire pulmonaire ne sont pas bien définis et font intervenir des facteurs passifs (propriétés de recrutement et de distension) et actifs (médiateurs et hormones vasoactifs). Les principales voies de relaxation du muscle lisse vasculaire font intervenir les nucléotides cycliques et la polarisation membranaire qui conditionne le fonctionnement des canaux ioniques. L'AMPC et le GMPc ont des propriétés vasodilatatrices et agissent de façon synergique. Le potentiel de membrane module le tonus vasculaire par l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. La dépolarisation membranaire ouvre ces canaux, permettant l'entrée de calcium dans la cellule conduisant à la contraction musculaire. L'ouverture des canaux potassiques induit une hyperpolarisation membranaire avec fermeture des canaux calciques dépendants du voltage et réduction du tonus vasculaire.

Nous avons étudié les effets d'inhibiteurs des canaux calciques et d'activateurs des canaux potassiques par la relation pression/débit dans la circulation pulmonaire périphérique chez le chien anesthésié, pour préciser le rôle des canaux ioniques *in vivo* (cf p. 118-121).

La circulation pulmonaire se caractérise, outre un très faible tonus à l'état de base, par la propriété unique de vasoconstriction hypoxique dont nous préciserons les mécanismes.

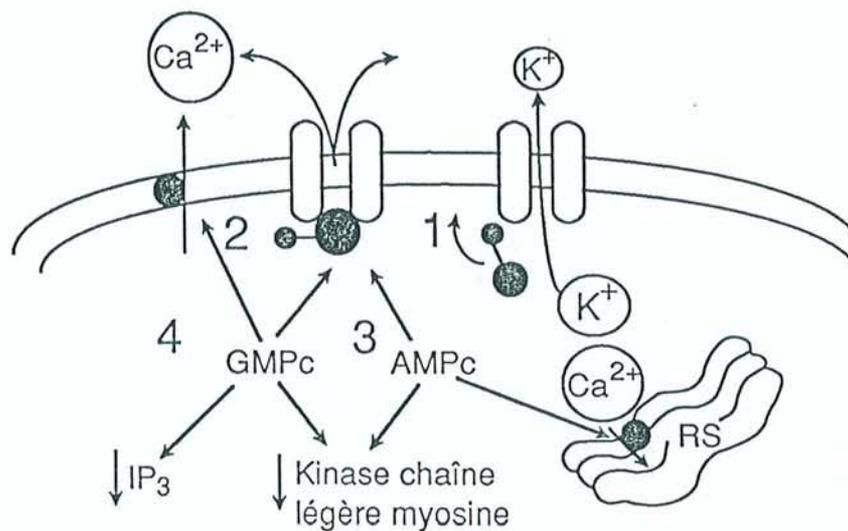


Fig 9 : Mécanismes de relaxation du muscle lisse vasculaire pulmonaire (d'après Rodman & Voelkel, 1997).

L'hyperpolarisation induite par l'ouverture des canaux K entraîne la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage. L'AMPC, augmenté par l'intermédiaire d'une protéine G après une stimulation du récepteur de la PGI₂, et le GMPc, modulé par le NO, agissent sur l'homéostasie calcique par l'intermédiaire de kinases. Les 2 nucléotides cycliques sont synergiques.

Abréviations : RS : réticulum sarcoplasmique ; IP₃ : inositol 1,4,5 triphosphate.

E - Mécanismes de la vasoconstriction hypoxique

Rappelons que la vasoconstriction hypoxique est reproductible, atteint un maximum pour une PO_2 de 30 à 50 mmHg et décroît pour une PO_2 inférieure à 20 mmHg. La vasoconstriction pulmonaire hypoxique améliore l'oxygénation par redistribution du débit sanguin vers les zones les mieux ventilées permettant un ajustement de la perfusion capillaire pulmonaire à la ventilation alvéolaire (von Euler & Liljestrand, 1946). La baisse de la pression alvéolaire en oxygène dans une grande partie ou dans l'ensemble du poumon induit une hypertension artérielle pulmonaire (Marshall *et al.*, 1981).

L'innervation n'est pas nécessaire pour observer une réponse pressive pulmonaire à l'hypoxie. La vasoconstriction hypoxique est donc intrinsèque à la circulation pulmonaire. Deux hypothèses sont proposées pour l'expliquer, celle d'un médiateur avec la production locale d'un vasoconstricteur ou la suppression d'une production locale d'un vasodilatateur, et celle d'une modification directe du tonus du muscle lisse vasculaire par l'hypoxie. Des arguments récents soulignent l'importance de la cellule musculaire lisse vasculaire comme principal effecteur du stimulus hypoxique mais l'effet direct de l'hypoxie sur l'endothélium dans la modulation de la vasoconstriction hypoxique doit être pris en compte.

1 - Rôle d'un médiateur

Dans le cadre de la recherche d'un médiateur, de nombreuses substances vasoactives ont été étudiées. Les cellules endothéliales peuvent moduler le tonus des cellules musculaires lisses adjacentes par différents mécanismes. L'endothélium inactive des substances vasoactives circulantes (noradrénaline, sérotonine, kinines) et active l'angiotensine. Les cellules endothéliales produisent des substances vasoactives dont la prostacycline, les endothélines, le PAF, le NO, l'EDHF et peut-être des facteurs endothéliaux vasoconstricteurs. Le rôle modulateur de certains facteurs endothéliaux est plausible, en particulier celui du NO qui sera discuté dans le paragraphe suivant. L'absence de mise en évidence formelle de médiateurs a conduit à envisager l'hypothèse d'un effet direct de l'hypoxie sur le muscle lisse vasculaire, éventuellement modulé par l'endothélium.

2 - Modulation directe du tonus vasculaire pulmonaire par l'hypoxie

a - Endothélium et muscle lisse vasculaire

Il est difficile d'étudier les effets de l'ablation de l'endothélium dans un poumon intact car une lésion majeure de l'endothélium produit toujours un oedème pulmonaire important. Si l'endothélium d'un poumon isolé est altéré moins sévèrement de façon à éviter le développement d'un oedème pulmonaire important, la vasoconstriction hypoxique tend à augmenter, suggérant qu'un endothélium intact n'est pas nécessaire au développement de la vasoconstriction hypoxique (Hill *et al.*, 1983). Le retrait de l'endothélium des artères pulmonaires proximales est de réalisation technique aisée (Rodman *et al.*, 1990 ; Ogata *et al.*, 1992 ; Omar & Wolin, 1992). Le retrait de l'endothélium des petites artères, siège de la vasoconstriction hypoxique, est difficile mais a pu être réalisé permettant la comparaison d'artères proximales et de vaisseaux plus petits (100-350 μm) résistifs (Leach *et al.*, 1994).

Les anneaux vasculaires pulmonaires artériels de rat, quelle que soit leur taille et dont l'endothélium est intact, ont une réponse biphasique à une hypoxie profonde ($\text{PO}_2 = 33\text{mmHg}$). La contraction initiale transitoire est suivie par une augmentation de tension dont le développement est plus lent et prolongé.

Dans des vaisseaux isolés, proximaux ou distaux, la dénudation endothéliale a peu d'effet sur la contraction transitoire initiale mais empêche le développement de l'augmentation secondaire soutenue de la tension (Leach *et al.*, 1994). L'administration d'un inhibiteur de la synthèse de NO, le L-NA, ne modifie pas l'effet de l'hypoxie. Ce résultat démontre que dénudation endothéliale et administration d'inhibiteurs de la NOS ne sont pas équivalents et que d'autres facteurs endothéliaux que le NO ont un rôle dans la modulation de la vasoconstriction hypoxique.

Au niveau des vaisseaux proximaux après dénudation endothéliale, l'inhibition de la contraction soutenue en réponse à l'hypoxie est observée sur des anneaux vasculaires isolés provenant d'artères pulmonaires humaines (Demiryurek *et al.*, 1993), et de rat (Bennie *et al.*, 1991). Dans d'autres études, la contraction hypoxique soutenue de gros vaisseaux pulmonaires est potentialisée (Yuan *et al.*, 1990 ; Ogata *et al.*, 1992) ou non modifiée (Kovitz *et al.*, 1993)

par la désendothélialisation. Ces résultats contradictoires sont expliqués en partie au moins par l'intensité du stimulus hypoxique. Le retrait de l'endothélium inhibe la contraction des cellules musculaires lisses en cas d'anoxie mais potentialise la réponse si le stimulus hypoxique est moins important (Rodman *et al.*, 1990). Des lésions endothéliales chroniques, comme cela est observé au cours des hypertensions artérielles pulmonaires pourraient majorer la réponse pressive à l'hypoxie. Les résultats contradictoires sont également dus à d'autres éléments qui peuvent varier suivant les expériences et les laboratoires comme des lésions des cellules musculaires lisses faites lors de la dénudation endothéliale. Dans un poumon intact, la vasoconstriction hypoxique peut être abolie par des imperfections techniques mineures lors de la préparation expérimentale (Fishman, 1985).

L'hypoxie ($PO_2 = 50$ mmHg dans l'expérience rapportée) provoque un raccourcissement des cellules musculaires lisses isolées provenant des artères pulmonaires (diamètre $< 600 \mu\text{m}$) et une relaxation des cellules provenant d'artères cérébrales (Madden *et al.*, 1992). Cette expérience confirme que la vasoconstriction hypoxique est un mécanisme intrinsèque de la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire et peut se produire en l'absence d'endothélium. Il apparaît donc que la cellule musculaire lisse artérielle pulmonaire a la propriété de se contracter en réponse à l'hypoxie mais sa réponse est modulée par l'endothélium.

b - Rôle du NO

Le rôle du NO au cours de l'hypoxie est controversé. Pour l'étudier, différents inactivateurs du NO et inhibiteurs de la NOS ont été utilisés. Les premières études sont critiquables car faites avec des inhibiteurs non spécifiques (Brashers *et al.*, 1988) qui sont également des inhibiteurs de la lipooxygénase et des antioxydants, les leucotriènes et les antioxydants pouvant modifier le tonus vasculaire pulmonaire (Rodman & Voelkel, 1997). Le N^o-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), un analogue de la L-arginine qui inhibe la synthèse de NO, double l'intensité de la vasoconstriction hypoxique dans un modèle de poumon perfusé isolé de rat adulte ; l'effet du L-NMMA est aboli par un apport de L-arginine en excès (Archer *et al.*, 1989). Le D-NMMA est un stéréoisomère du L-NMMA dépourvu d'effet sur la NOS (Moncada *et al.*, 1991). Le D-NMMA ne modifie pas la vasoconstriction hypoxique, indiquant

que l'inhibition de la synthèse de NO rend compte des effets du L-NMMA (Archer *et al.*, 1989). La réponse vasoconstrictrice à l'angiotensine II est également potentialisée par le L-NMMA. La contraction hypoxique d'artères pulmonaires proximales isolées est aussi augmentée par le L-NMMA (Archer *et al.*, 1989). L'augmentation de la vasoconstriction hypoxique par une inhibition sélective de la synthèse de NO a été confirmée par d'autres études utilisant divers inhibiteurs de la NOS, L-NMMA, L-NA et L-NAME dans des préparations avec des lapins (Persson *et al.*, 1990) et des chiens (Leeman *et al.*, 1994) anesthésiés, des poumons de rat isolés perfusés (Hasunuma *et al.*, 1991a ; Liu *et al.*, 1991b ; Oka *et al.*, 1993 ; Isaacson *et al.*, 1994), des artères intrapulmonaires de porc isolées (Ogata *et al.*, 1992), des artères périphériques de chats anesthésiés *in vivo* (Shirai *et al.*, 1997).

L'hémoglobine capte le NO après sa libération de la cellule endothéliale. L'hémoglobine potentialise la vasoconstriction hypoxique dans des poumons isolés perfusés (Hasunuma *et al.*, 1991a ; Mazmanian *et al.*, 1989) et dans des artères pulmonaires isolées (Ogata *et al.*, 1992).

Les résultats de ces différentes études suggèrent que la vasoconstriction hypoxique provoque une libération de NO qui réduit l'augmentation de pression artérielle pulmonaire.

Plusieurs études réalisées sur des artères pulmonaires isolées ont mis en évidence des résultats opposés avec une réduction de la vasoconstriction hypoxique par les analogues de l'arginine ou de l'hémoglobine (Johns *et al.*, 1989 ; Omar *et al.*, 1992 ; Kovitz *et al.*, 1993 ; Zelenkov *et al.*, 1993). Cependant dans toutes ces études sauf une (Omar *et al.*, 1992), la réponse hypoxique ne reproduit pas la vasoconstriction hypoxique *in vivo* car il n'est observé qu'une brève contraction suivie d'une vasorelaxation prolongée. Dans une autre étude, la contraction hypoxique de petites et grosses artères pulmonaires n'est pas modifiée par le L-NA (Leach *et al.*, 1994). Ce résultat suggère que l'hypoxie potentialise la synthèse de NO, au moins en partie, en augmentant le débit et la tension pariétale des vaisseaux constrictés. Ces conséquences de la vasoconstriction sont visibles dans le poumon intact *in vivo* mais ne sont pas retrouvées sur des artères pulmonaires isolées. Ceci est confirmé par le fait que les analogues de l'arginine potentialisent la vasoconstriction secondaire à l'hypoxie mais aussi à d'autres stimuli vasoconstricteurs. La tension pariétale est un stimulus connu de la synthèse du

NO (Hecker *et al.*, 1993). Il apparaît donc que les agents qui réduisent le taux de NO augmentent la vasoconstriction, incluant la vasoconstriction hypoxique. L'hypoxie et/ou la vasoconstriction paraît stimuler la synthèse de NO dans la circulation pulmonaire.

Les effets directs de l'hypoxie sur la synthèse de NO par l'endothélium pulmonaire ont été mesurés. Dans des cultures de cellules endothéliales pulmonaires, l'activité vasorelaxante dépendante de l'endothélium est réduite par une hypoxie sévère ($PO_2 = 15$ mmHg), mais non modifiée par une hypoxie modérée ($PO_2 = 42$ mmHg). La durée de l'hypoxie sévère doit être d'au moins 25 minutes pour supprimer cette activité vasorelaxante, suggérant un épuisement de mécanismes homéostatiques cellulaires plutôt qu'une réponse physiologique à la vasoconstriction hypoxique qui survient en quelques secondes *in vivo* (Warren *et al.*, 1989). La production de NO est plus élevée dans les cellules endothéliales artérielles pulmonaires exposées à 10 minutes d'hypoxie ($PO_2 = 37$ mmHg) que dans les cellules normoxiques (Hampl *et al.*, 1995). Une hypoxie aiguë ($PO_2 = 23$ mmHg) ne modifie pas l'accumulation de nitrites et de nitrates, dérivés métaboliques du NO, dans le perfusât de poumon isolé de lapin (Grimminger *et al.*, 1995). Il apparaît donc qu'une hypoxie modérée ne réduit pas et peut même augmenter la production de NO endothélial dans la circulation pulmonaire.

Le NO active la guanylate cyclase soluble qui synthétise le GMPc, second messager à l'origine de la vasorelaxation. Le taux intracellulaire de GMPc dépend également d'autres facteurs que la guanylate cyclase soluble et l'activité de la guanylate cyclase n'est pas régulée uniquement par le NO. Les effets du NO sur le taux de GMPc s'intègrent dans un réseau complexe d'interactions et ne peuvent pas être interprétés comme une simple relation de cause à effet. Les mesures de GMPc retrouvent généralement (Burke-Wolin & Wolin, 1989 ; Johns *et al.*, 1989 ; Rodman *et al.*, 1990; Zelenkov *et al.*, 1993) mais pas toujours (Shaul *et al.*, 1992), une réduction des concentrations de GMPc intracellulaire dans les cellules vasculaires pulmonaires en hypoxie modérée. Le taux de GMPc diminue en hypoxie dans des anneaux vasculaires pulmonaires désendothélialisés, démontrant que la diminution des taux de GMPc est indépendante de l'endothélium (Burke-Wolin & Wolin, 1989). L'inhibition de la guanylate cyclase donne des résultats très variables avec une augmentation (Mazmanian *et al.*, 1989 ;

Rodman *et al.*, 1990 ; Ogata *et al.*, 1992) ou une réduction (Burke-Wolin & Wolin, 1989 ; Hyman *et al.*, 1989 ; Omar *et al.*, 1992) de la vasoconstriction hypoxique. Les changements de taux de GMPc participent au mécanisme de la vasoconstriction hypoxique mais le NO n'est pas le principal stimulus de ces modifications du GMPc. Les variations de GMPc induites par l'hypoxie sont modulées par les effets du NO sur la guanylate cyclase. L'interprétation de ces résultats est sujette à discussion mais il apparaît que dans la circulation pulmonaire intacte, le NO peut ne pas être un médiateur important du faible tonus basal et son inhibition ne pas expliquer la vasoconstriction hypoxique.

L'hypoxie a un rôle important dans la modulation du tonus du muscle lisse vasculaire. Le siège de la vasoconstriction hypoxique se situe au niveau des petites artères musculaires. Chez le chat, seules les artères pulmonaires d'un diamètre inférieur à 500 μm répondent à l'hypoxie par une vasoconstriction (Madden *et al.*, 1985). Chez le chien, l'hypoxie provoque également une vasoconstriction des artères pulmonaires périphériques (diamètre de 30 à 70 μm) provenant de lobes pulmonaires isolés quoique les cellules musculaires lisses soient peu nombreuses et dispersées dans la paroi vasculaire de ces microvaisseaux (Hillier *et al.*, 1997). Il s'y associe une dépolarisation membranaire et la génération d'un potentiel d'action dépendant du calcium. Le rôle de l'endothélium dans la genèse de ces effets est peu probable car l'hypoxie induit une vasoconstriction d'artères pulmonaires désendothélialisées suggérant que la cellule musculaire lisse peut être l'effecteur principal (Rodman *et al.*, 1990). Rappelons que les cellules musculaires lisses en cultures obtenues à partir d'artères pulmonaires se contractent en hypoxie (Murray *et al.*, 1990).

Les différents travaux rapportés dans la littérature mettent donc en évidence une augmentation de la vasoconstriction hypoxique lors de la réduction des taux de NO par différents agents pharmacologiques comme les inhibiteurs de la NOS ou l'hémoglobine. L'hypoxie et/ou la vasoconstriction stimulent la synthèse de NO dans la circulation pulmonaire.

Pour préciser le rôle du NO sur la circulation pulmonaire périphérique, siège de la vasoconstriction hypoxique, nous avons étudié l'effet du L-NAME et du nitroprussiate de

sodium sur la relation pression/débit dans la circulation pulmonaire périphérique chez le chien, *in vivo* (cf p. 118).

c - Rôle des canaux ioniques

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer un effet vasoconstricteur pulmonaire direct de l'hypoxie, faisant intervenir notamment les canaux calciques et potassiques (Weir & Archer, 1995). La contraction du muscle lisse nécessite l'entrée de calcium dans la cellule par ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Les antagonistes des canaux calciques voltages-dépendants inhibent la vasoconstriction hypoxique (McMurtry *et al.*, 1976). Le retrait du calcium du bain d'organe réduit la contraction d'anneaux artériels pulmonaires induite par l'hypoxie (Harder *et al.*, 1985). La vasoconstriction hypoxique est potentialisée par le BAY K 8644, un agoniste des canaux calciques qui facilite l'entrée de calcium dans la cellule par les canaux (McMurtry, 1985).

Plusieurs études suggèrent que l'hypoxie peut directement causer une dépolarisation membranaire de la cellule musculaire lisse et augmenter la concentration intracellulaire de calcium. L'hypoxie provoque une dépolarisation membranaire au niveau des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires proximales qui est associée à une inhibition des canaux potassiques dépendants du voltage (Post *et al.*, 1992). La chélation du calcium intracellulaire abolit cette activité, ce qui suggère que des canaux potassiques dépendants du calcium sont impliqués. L'hypoxie provoque également la libération de calcium des stocks intracellulaires (Salvaterra & Goldman, 1993 ; Jabr *et al.*, 1997). Cette libération rapide de calcium inhibe les canaux potassiques K_{DR} avec secondairement une dépolarisation membranaire et une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de la membrane plasmique (Post *et al.*, 1995 ; Jabr *et al.*, 1997). Cet effet de l'hypoxie sur la conductance potassique est spécifique de la cellule musculaire lisse d'artère pulmonaire, l'hypoxie n'ayant pas d'effet sur les courants potassiques de l'artère mésentérique (Yuan *et al.*, 1993) ou un effet inverse sur la plupart des vaisseaux systémiques (Weir & Archer, 1995).

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer la contraction du muscle lisse vasculaire pulmonaire en réponse à l'hypoxie. Le mécanisme de transduction entre l'hypoxie et

les canaux ioniques n'est pas élucidé au niveau des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire. Le rôle d'une diminution de la phosphorylation oxydative n'est pas démontré. La vasoconstriction hypoxique fait intervenir des changements de l'état d'oxydoréduction des cellules musculaires lisses (Burke-Wolin & Wolin, 1989 ; Archer *et al.*, 1993), une diminution des taux de GMPc (Burke-Wolin & Wolin, 1989 ; Omar & Wolin, 1992) et une inhibition des canaux potassiques de la membrane plasmique des cellules musculaires lisses (Post *et al.*, 1992; Archer *et al.*, 1993). Il s'ensuit une dépolarisation membranaire (Madden *et al.*, 1985), une activation des canaux calciques dépendants du voltage (McMurtry *et al.*, 1976 ; Cornfield *et al.*, 1994), et une augmentation du taux de calcium libre intracellulaire dans la cellule musculaire lisse (Salvatera & Goldman, 1993 ; Cornfield *et al.*, 1994). L'augmentation du taux de calcium cytosolique provoque une contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (McCall, 1987).

En résumé, le principal effecteur de la vasoconstriction hypoxique est la cellule musculaire lisse de l'artère pulmonaire. Cependant les liens exacts entre hypoxie, canaux ioniques et concentration intracellulaire de calcium ne sont pas bien connus. L'importance relative des différents éléments et leurs séquences sont actuellement l'objet d'investigations (Weir & Archer, 1995).

3 - Variabilité régionale de la réactivité vasculaire

La majorité des études ont été réalisées à partir de cellules provenant d'artères pulmonaires proximales. Il existe cependant des différences régionales dans la réactivité vasculaire pulmonaire. La structure et la composition des cellules musculaires lisses est hétérogène et quatre phénotypes ont été identifiés au niveau de l'artère pulmonaire, à différents stades du développement (Frid *et al.*, 1994). Trois types de cellules vasculaires musculaires lisses dans l'artère pulmonaire peuvent être distingués d'un point de vue pharmacologique, morphologique et électrophysiologique (Albarwani *et al.*, 1995). Ces cellules sont caractérisées par des critères électrophysiologiques et leur type de canal potassique dominant. Les cellules K_{Ca} ont une prédominance de canaux K_{Ca} , les cellules K_{DR} de canaux K_{DR} et les cellules mixtes sont caractérisées par la présence des deux types de canaux potassiques K_{Ca} et K_{DR} . La répartition de ces cellules est différente selon leur localisation proximale ou distale dans l'artère

pulmonaire (Archer *et al.*, 1996). Les artères proximales contiennent de nombreuses cellules musculaires lisses K_{Ca} ; les artères de résistance ont une majorité de cellules K_{DR} et peu de cellules K_{Ca} .

L'hypoxie dépolarise les cellules K_{DR} par une inhibition réversible et rapide des canaux K_{DR} qui contrôlent le potentiel de membrane au repos. Le NO hyperpolarise les cellules K_{Ca} par une ouverture des canaux K_{Ca} (Archer *et al.*, 1996 ; Nossaman *et al.*, 1997). Le corollaire fonctionnel de cette diversité électrophysiologique est la contraction en hypoxie des vaisseaux résistifs riches en cellules K_{DR} et la réponse biphasique avec une relaxation prédominante en hypoxie des vaisseaux proximaux.

Le NO a un effet dilatateur plus important sur les vaisseaux proximaux que résistifs (Archer *et al.*, 1996). L'importance des différences régionales de réactivité vasculaire pulmonaire a également été mise en évidence notamment par l'étude de la répartition des sous-types de récepteurs du système adrénergique (Kemp *et al.*, 1997) et des récepteurs des endothélines (Higashi *et al.*, 1997).

La réactivité vasculaire pulmonaire à l'hypoxie est variable, en outre, selon les espèces et dans une même espèce selon les individus. Cette variabilité interindividuelle résulte de l'influence plus ou moins prononcée de certains systèmes de régulation dépendant des conditions physiologiques propres à chaque individu.

La complexité des mécanismes de la vasoconstriction hypoxique et la variabilité régionale de la réactivité vasculaire pulmonaire rendent particulièrement difficile l'interprétation des résultats des études portant sur les effets pharmacologiques de différentes substances.

Il nous a donc paru utile d'étudier, en hypoxie, l'effet de drogues agissant sur les voies du NO, d'inhibiteurs des canaux calciques, d'activateurs des canaux potassiques, d'un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques et de l'almitrine, un stimulant des chémorécepteurs périphériques, sur la circulation pulmonaire périphérique, chez le chien anesthésié *in vivo* (cf p. 118-124).

4- Conséquences de la chronicité de la vasoconstriction hypoxique

Nous ne détaillerons pas ce paragraphe car nous nous sommes intéressé essentiellement aux conséquences de l'hypoxie aiguë. La permanence de la vasoconstriction hypoxique conduit au développement d'altérations structurales des vaisseaux pulmonaires avec une prolifération des cellules musculaires lisses, un épaississement de la média et l'apparition de cellules musculaires lisses dans les zones distales normalement non ou très peu muscularisées, une turgescence des cellules endothéliales, une infiltration du tissu conjonctif dans la média, l'intima et l'adventice (Rabinovitch *et al.*, 1979). L'importance de ce remaniement varie aussi selon les espèces et l'âge. Au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire chronique, l'endothélium perd sa capacité de synthèse du NO (Adnot *et al.*, 1991b). La nature primitive ou secondaire de la dysfonction endothéliale n'est pas connue mais ce déficit endogène en NO aggrave l'augmentation du tonus vasculaire, la croissance du muscle lisse et la susceptibilité thrombogénique favorisant le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire par ces différents processus. L'hypoxie chronique inhibe également l'expression de gènes codant pour certaines sous unités des canaux K dépendants du voltage des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (Wang *et al.*, 1997).

Jusqu'ici, nous avons considéré les effets de l'hypoxie sur la circulation pulmonaire. L'hypoxie est observée habituellement au cours des maladies respiratoires. Plus rarement, une hypoxémie est observée dans d'autres cadres nosologiques, comme au cours du syndrome hépatopulmonaire, une complication de la cirrhose.

F - Tonus vasculaire pulmonaire, NO et cirrhose

Syndrome hépatopulmonaire : rôle du NO dans l'hyporéactivité pulmonaire et le développement d'une hypoxémie

Au cours de la cirrhose, il existe souvent des perturbations hémodynamiques avec un état hyperkinétique caractérisé par un débit cardiaque élevé et des résistances vasculaires systémiques diminuées résultant d'une vasodilatation généralisée (Bomzon & Blendis, 1994). La vasoréactivité pulmonaire peut être également altérée avec le développement d'un syndrome hépatopulmonaire.

1 - Syndrome hépatopulmonaire

Le syndrome hépatopulmonaire associe à une dysfonction hépatique, des dilatations vasculaires intrapulmonaires et une hypoxémie avec atténuation de la vasoconstriction hypoxique ; le syndrome hépatopulmonaire se caractérise sur le plan hémodynamique par un état hyperkinétique avec résistances vasculaires pulmonaires basses (Castro & Krowka, 1996 ; Schraufnagel & Kay, 1996).

L'hypoxémie a été attribuée initialement à un déplacement vers la droite de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. La diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, causée par une augmentation du 2-3 diphosphoglycérate intracellulaire, ne rend pas compte à elle seule du degré d'hypoxémie observé et d'autres causes ont été mises en évidence, incluant un shunt intrapulmonaire droit-gauche, une limitation de la diffusion alvéolocapillaire et une inhomogénéité des rapports ventilation-perfusion (Rodriguez-Roisin *et al.*, 1987, 1992). Le mécanisme de l'hypoxémie a été précisé par la technique d'élimination des gaz inertes. Cette technique fournit une estimation quantitative de la distribution des rapports ventilation/perfusion (\dot{V}/\dot{Q}), de la diffusion alvéolo-capillaire de l'oxygène, de la présence ou de l'absence de shunt artérioveineux. Les patients cirrhotiques normoxémiques ont une distribution normale des rapports ventilation/perfusion. Les patients modérément hypoxémiques ont une inhomogénéité des rapports ventilation/perfusion, liée à des dilatations vasculaires intrapulmonaires mais sans shunt vrai. Ils ont aussi une limitation de la diffusion de l'oxygène. Pour préciser le rôle du

tonus vasculaire pulmonaire sur les échanges gazeux au cours de la cirrhose, la technique d'élimination des gaz inertes a été utilisée en air ambiant et lors de l'inhalation d'un mélange gazeux hypoxique (Rodriguez-Roisin *et al.*, 1987). L'évolution de l'hépatopathie s'accompagne du développement de perturbations de la vasoconstriction hypoxique qui peut être abolie dans les cas les plus graves. L'administration d'oxygène pur ne corrige pas toujours complètement l'hypoxémie dans le syndrome hépatopulmonaire. Dans ce cas, il existe un «shunt vrai» dû à des fistules artérioveineuses ou à des dilatations vasculaires pulmonaires importantes. L'augmentation de calibre de ces capillaires pulmonaires diminue la possibilité de diffusion de l'oxygène jusqu'au centre du capillaire contenant le sang veineux mêlé et donc l'oxygénation. De plus, l'état hyperdynamique diminue le temps de transit intrapulmonaire et donc le temps de contact oxygène-érythrocytes, aggravant l'hypoxémie (Rodriguez-Roisin *et al.*, 1992).

Le mécanisme de la perte du tonus vasculaire chez les patients porteurs de dilatations vasculaires pulmonaires est inconnu. Parmi les hypothèses proposées, certaines mettent en avant un déséquilibre entre facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs, avec un excès de vasodilatateurs chez les patients présentant un syndrome hépatopulmonaire. D'autres ont proposé un défaut d'épuration hépatique d'une substance vasodilatatrice pulmonaire (glucagon, CGRP, VIP, ANF, substance P, PGE₂ ou PGI₂) ou une inhibition ou une métabolisation hépatique de vasoconstricteurs circulants comme la tyrosine, la sérotonine ou l'endothéline mais peu d'arguments confirment ces hypothèses (Panos & Baker, 1996).

2 - Rôle du NO dans le contrôle du tonus vasculaire au cours de la cirrhose

En 1991, Vallance et Moncada ont avancé l'hypothèse d'une augmentation de la synthèse et de la libération de NO, induite directement par une endotoxémie fréquente au cours de la cirrhose ou indirectement par des cytokines, à l'origine de la vasodilatation généralisée de la cirrhose (Vallance & Moncada, 1991). En effet, les études chez l'animal démontrent que l'endotoxine bactérienne et les cytokines induisent l'expression de la NOS inductible dans la paroi vasculaire à l'origine d'une vasorelaxation et d'une baisse de la réactivité aux agents vasoconstricteurs (Rees *et al.*, 1990 ; Busse & Mulisch, 1990 ; Griffiths *et al.*, 1995). Ces effets sont abolis par l'administration de L-NMMA, un inhibiteur de la NO synthétase (Rees *et al.*,

1990 ; Griffiths *et al.*, 1995). Des résultats expérimentaux obtenus chez des rats ayant une hypertension portale mettent en évidence une augmentation de production de NO qui pourrait être à l'origine de la vasodilatation généralisée (Pizcueta *et al.*, 1992). L'hyporéactivité vasculaire systémique à la méthoxamine, un agent vasoconstricteur α_1 -adrénergique, est supprimée par l'administration d'un inhibiteur de la synthèse du NO *in vitro* (Sieber *et al.*, 1992) et *in vivo* (Lee *et al.*, 1992). Ces études soulignent l'importance du NO dans le contrôle du tonus vasculaire systémique au cours de la cirrhose.

Cependant, d'autres travaux apportent des éléments contradictoires. Dans le même modèle de cirrhose induite par une hypertension portale chez le rat, Sogni *et al.*, ne mettent pas en évidence de différence dans la réduction du débit cardiaque et du débit sanguin portal *in vivo* après l'inhibition de la NOS par le L-NMMA par rapport aux rats contrôles (Sogni *et al.*, 1992). La même équipe constate l'absence de différence de concentrations artérielles de GMPC avant et après administration de L-NMMA entre rats témoins et cirrhotiques. Des résultats hémodynamiques comparables sont observés chez des lapins ayant une cirrhose secondaire à une hypertension portale (Wu *et al.*, 1993). L'effet vasoconstricteur dose-dépendant de l'inhibition de la cyclooxygénase dans ce dernier modèle indique la participation des prostaglandines au contrôle du tonus vasculaire systémique au cours de la cirrhose (Wu *et al.*, 1993). L'hypertension portale augmente la tension pariétale vasculaire au niveau de la circulation splanchnique ce qui favorise probablement la libération endothéliale de prostacycline (Frangos *et al.*, 1985) et de NO (Rubanyi *et al.*, 1986). Ces différents éléments suggèrent que l'hypothèse de Vallance-Moncada, selon laquelle l'augmentation de NO au cours de la cirrhose est à l'origine d'une vasodilatation généralisée, doit être modulée car le NO est seulement un des médiateurs qui participe avec d'autres éléments au contrôle du tonus vasculaire au cours de la cirrhose (Wu *et al.*, 1993 ; Bomzon *et al.*, 1994).

Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle du NO dans la vasodilatation pulmonaire du syndrome hépatopulmonaire. Chez trois patients porteurs d'un syndrome hépatopulmonaire, la concentration de NO exhalé était augmentée et est retournée à une valeur normale chez le patient qui a eu une transplantation hépatique (Cremona *et al.*, 1995). Dans un

autre cas, l'administration de bleu de méthylène - qui bloque la guanylate cyclase et donc l'action du NO - a réduit partiellement le shunt et amélioré l'hypoxémie d'un patient ayant un syndrome hépatopulmonaire (Rolla *et al.*, 1994). Ces observations exceptionnelles ont été confirmées par d'autres études. Il existe une corrélation négative entre la concentration de NO exhalée et les résistances vasculaires pulmonaires (Sogni *et al.*, 1995). La concentration de NO exhalée, élevée chez les patients cirrhotiques augmente davantage au cours du syndrome hépatopulmonaire (Rolla *et al.*, 1997). Le NO n'est certainement pas le seul facteur impliqué et ne rend pas compte de toutes les anomalies observées au cours du syndrome hépatopulmonaire, notamment des dilatations vasculaires pulmonaires importantes.

La compréhension de la physiopathologie du syndrome hépatopulmonaire a été longtemps limitée par l'absence de modèle animal. Récemment, Chang et Ohara ont proposé un modèle animal pour l'étude du syndrome hépatopulmonaire chez le rat après une ligature du canal cholédoque permettant d'induire une cirrhose biliaire en quelques semaines (Chang & Ohara, 1992). Ces rats cirrhotiques ont un débit cardiaque augmenté, des résistances vasculaires systémiques et pulmonaires diminuées, une atténuation de la réponse vasculaire pulmonaire à l'hypoxie avec une augmentation du gradient alvéolo-artériel en oxygène ; les études en microscopie électronique ont confirmé l'augmentation du diamètre des capillaires pulmonaires (Schraufnagel *et al.*, 1997). Cependant, le rôle du NO au niveau de la circulation pulmonaire n'a pas été étudié dans ce modèle et une augmentation de la production de NO au niveau de la circulation pulmonaire dans le syndrome hépatopulmonaire n'est donc pas démontrée expérimentalement. Nous avons utilisé le modèle de Chang et Ohara pour étudier, *in vitro*, la vasoréactivité pulmonaire de rats cirrhotiques et préciser le rôle du NO dans l'hyporéactivité pulmonaire à la phényléphrine, un agent vasoconstricteur agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, au cours du syndrome hépatopulmonaire (Chabot *et al.*, 1996 ; cf p. 92-93).

Différents travaux suggèrent un rôle du NO dans les perturbations de la vasoréactivité pulmonaire au cours du syndrome hépatopulmonaire, probablement dû à un excès de production du NO. Au cours d'infections graves, un excès de production de NO peut également être mis en évidence et être à l'origine d'altérations du tonus vasculaire.

G- Tonus vasculaire pulmonaire, NO, peroxy-nitrite et sepsis

Rappelons que dans des conditions physiologiques, le NO libéré par les cellules endothéliales régule le débit sanguin et la pression de perfusion systémique et pulmonaire (Moncada *et al.*, 1991). La formation de NO est catalysée par la cNOS. Cette enzyme assure la formation de quantités limitées de NO. Dans les cas d'inflammation, tel un choc septique, iNOS est exprimée, conduisant à la production de quantités importantes de NO. Cette quantité très élevée de NO pourrait rendre compte de la chute de la pression artérielle systémique observée au cours du choc septique (Petros *et al.*, 1991). Le NO à concentration élevée a des propriétés cytotoxiques et a été associé à une suppression de la respiration mitochondriale de cellules musculaires lisses d'aorte de rat en culture. L'inhibition de la respiration mitochondriale réduit la contractilité artérielle et pourrait être un mécanisme vasodilatateur dépendant du NO (Geng *et al.*, 1992).

1- Synthèse de peroxy-nitrite

Au cours du sepsis, les polynucléaires neutrophiles sont activés et sont à l'origine de taux élevés d'anions superoxydes formés par le système de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase. Un excès de production de NO et d'anion superoxyde conduit à la formation de peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Beckman *et al.*, 1990). Dans les conditions physiologiques, la formation de peroxy-nitrite est maintenue à un taux très faible sous l'action d'une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD) qui catabolise l'anion superoxyde et par la capacité limitée de production de NO par la cNOS. Quand l'iNOS est exprimée dans des conditions où la formation d'anion superoxyde est augmentée ou l'activité de la SOD est diminuée, le peroxy-nitrite est formé en excès.

2- Cytotoxicité du peroxy-nitrite

L'activité biologique et la cytotoxicité du peroxy-nitrite dépendent de l'environnement cellulaire ou biochimique, notamment de la présence de protéines, de radicaux thiols, de glucose

et du rapport NO/anion superoxide ; ces facteurs influencent sa toxicité potentielle (Beckman *et al.*, 1990 ; Villa *et al.*, 1994). Dans certaines conditions expérimentales, le peroxy-nitrite peut former des donneurs de NO et transférer le NO sur des radicaux thiols. Dans d'autres conditions, le peroxy-nitrite se comporte comme un agent plus toxique que le NO ou l'anion superoxyde seul. Dans différentes conditions physiopathologiques associées à une inflammation ou à un stress oxydatif, le peroxy-nitrite apparaît comme un médiateur important des lésions cellulaires (Szabo *et al.*, 1996). Le peroxy-nitrite participe au moins à 3 voies d'oxydation par l'intermédiaire de produits métaboliques incluant le radical hydroxyl, une réaction directe avec des groupes sulfhydryles et des réactions de nitration des noyaux phénoliques.

Les mécanismes de la cytotoxicité du peroxy-nitrite sont multiples. Le peroxy-nitrite est un oxydant toxique qui inhibe la respiration cellulaire (Radi *et al.*, 1994 ; Salgo *et al.*, 1995 ; Szabo *et al.*, 1996) et peut participer à la dysfonction endothéliale observée au cours du choc septique (Liu *et al.*, 1994 ; Villa *et al.*, 1994 ; Kooy *et al.*, 1995). Le peroxy-nitrite inhibe la respiration cellulaire directement par l'inhibition du transport mitochondrial des électrons (Radi *et al.*, 1994) et indirectement en activant une enzyme nucléaire, la poly (adénosine 5'-diphosphoribose) synthase (PARS) (Salgo *et al.*, 1995). Le peroxy-nitrite brise l'ADN (Salgo *et al.*, 1995). Les fragments d'ADN activent la voie de la PARS. La PARS est une enzyme nucléaire capable de modifier la structure des protéines et de polymériser des nucléotides. L'activation de la PARS scinde le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) en ADP-ribose et nicotinamide. La PARS fixe le fragment ADP-ribose à différentes protéines, y compris la PARS elle-même, avec une extension du fragment initial ADP-ribose en un polymère, le poly (ADP) ribose au sein de l'ADN. L'activation de PARS diminue rapidement la concentration intracellulaire de son substrat, le NAD⁺, ralentissant la glycolyse, le transport des électrons et donc la synthèse d'ATP, provoquant une dysfonction cellulaire par déplétion énergétique puis la mort cellulaire. Ce mécanisme, nommé «voie suicide» ou cycle «futile» de la PARS, a déjà été mis en évidence dans le stress oxydatif (Schraufstatter *et al.*, 1986) ; il est également un médiateur de la cytotoxicité du NO (Zhang *et al.*, 1994).

3- Effets vasculaires du peroxy-nitrite

Le peroxy-nitrite a une action vasodilatatrice dans des préparations vasculaires *in vitro*, incluant des artères pulmonaires bovines (Wu *et al.*, 1994) et des artères coronaires de rat (Liu *et al.*, 1994). De plus, dans l'aorte de rat, l'activation de la PARS par le peroxy-nitrite endogène rend compte de l'hyporéactivité vasculaire observée au niveau de l'aorte après un sepsis expérimental (Szabo *et al.*, 1996). Cependant, le rôle de l'activation de la PARS dans la vasodilatation pulmonaire induite par le peroxy-nitrite et le rôle potentiel de l'activation de la PARS dans la relaxation du muscle lisse vasculaire induite par le NO endothélial ne sont pas connus. Nous avons précisé le rôle du peroxy-nitrite et de l'activation de la PARS, *in vitro*, sur le tonus vasculaire d'artères pulmonaires de rat par la technique des anneaux vasculaires isolés (Chabot *et al.*, 1997a ; cf p. 94-96).

II - Etudes in vitro

La vasoréactivité pulmonaire a été étudiée *in vitro* par la technique des anneaux vasculaires avec deux travaux réalisés dans des laboratoires différents. Pour éviter les répétitions, nous décrivons la méthodologie générale de ce type d'étude puis les points spécifiques à chacune des études. Les détails méthodologiques et les résultats sont présentés et discutés dans les publications originales (Chabot *et al.*, 1996 ; 1997b).

A - Technique des anneaux vasculaires

1 - Préparation des anneaux vasculaires pulmonaires

L'étude est réalisée sur des anneaux vasculaires pulmonaires provenant de rats mâles. Les rats sont anesthésiés (éther) ou subissent une rupture cervicale après une prémédication anesthésique intrapéritonéale par l'association d'un morphinique d'action rapide et d'un neuroleptique de la classe des butyrophénones. Après une excision rapide, le bloc cœur-poumons est placé immédiatement dans une solution de Krebs froide (4°C). Le tissu périvasculaire est retiré, les artères pulmonaires proximales sont disséquées soigneusement, puis coupées en anneaux vasculaires (longueur : 3 à 5 mm ; diamètre externe : 1 à 2 mm). L'endothélium est préservé. L'intégrité endothéliale a été vérifiée dans tous les cas par un test pharmacologique de vasodilatation à l'acétylcholine.

La petite taille des vaisseaux pulmonaires du rat ne permet d'obtenir que 2 à 4 segments vasculaires par animal.

2 - Etudes pharmacologiques

Les anneaux vasculaires sont montés sur deux tiges métalliques rigides et suspendus dans un bain d'organe contenant une solution de Krebs (Fig 10). La solution est oxygénée avec un mélange gazeux (95% O₂ et 5% CO₂) et maintenue à une température constante de 37°C par un bain chauffant. Une des tiges métalliques est fixe et l'autre reliée à un capteur de force dont le signal amplifié s'inscrit sur enregistreur polygraphique. Chaque anneau est soumis à une tension de base et les changements de tension isométrique sont enregistrés (Fig 10).

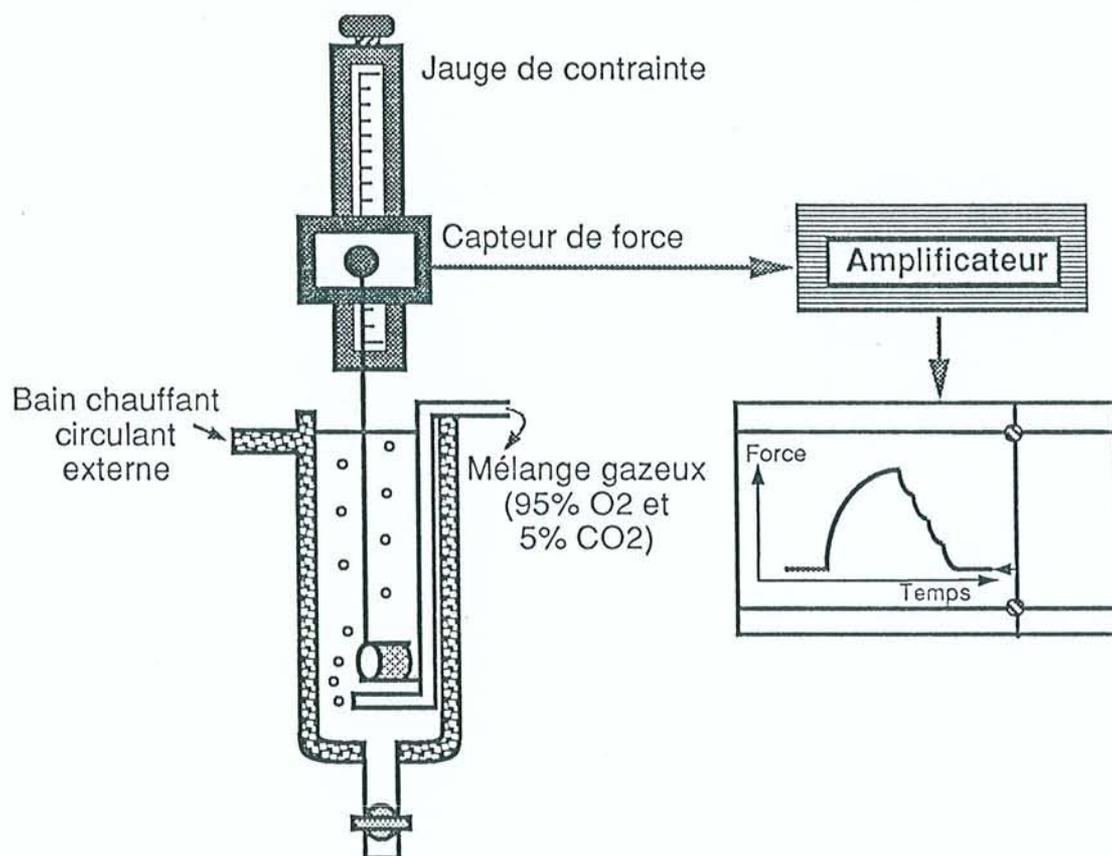


Fig 10 : Technique des anneaux vasculaires isolés : préparation

a - Etudes dose-contraction

Après une période d'équilibre de 20 minutes, une précontraction est obtenue par l'adjonction de chlorure de potassium (KCl) dans le bain d'organe. Le potassium induit une augmentation de tension par dépolarisation directe de la cellule vasculaire musculaire lisse. L'augmentation de tension obtenue avec un plateau stable supérieur à 0,5 g permet de confirmer la sensibilité de l'anneau vasculaire isolé aux agents vasoconstricteurs, indépendamment de l'état fonctionnel de l'endothélium vasculaire pulmonaire. Quand la contraction maximale due au potassium est obtenue, les anneaux sont soigneusement lavés. La relaxation de l'anneau vasculaire est confirmée par la baisse de la tension isométrique qui retourne à la valeur de base. Un temps d'équilibre des anneaux d'au moins 45 minutes, sans nouveau stimulus vasoconstricteur, est nécessaire avec changement de la solution du bain d'organe toutes les 15 à 20 minutes. La réponse contractile à des concentrations cumulatives d'un produit supposé vasoconstricteur est ensuite étudiée. Pour évaluer l'influence du NO sur la réponse vasoconstrictrice, certains anneaux sont prétraités 15 minutes auparavant avec un inhibiteur de la synthèse du NO, le N^ω nitro-L-arginine (L-NA, 10⁻⁴ M) ou le N^ω nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ M).

b - Etudes dose-relaxation

Une relaxation ne peut être observée qu'après une augmentation du tonus de base. Une précontraction est obtenue après l'adjonction dans le bain d'organe de phényléphrine (10⁻⁵ M) ou d'U46619 (10⁻⁶ M), un analogue du thromboxane. Quand une tension élevée stable est obtenue, l'effet de concentrations cumulatives de vasodilatateurs est étudié, notamment par des concentrations cumulatives d'acétylcholine (10⁻⁸ à 10⁻⁵ ou 10⁻⁴ M) ou de nitroprussiate de sodium (10⁻⁸ à 10⁻⁴ M) ajoutées dans le bain d'organe pour étudier la vasodilatation, respectivement dépendante et indépendante de l'endothélium.

3 - Préparation des drogues

Toutes les drogues proviennent de Sigma Chemical, sauf le peroxy-nitrite qui est préparé dans le laboratoire, et sont diluées dans de l'eau distillée, à l'exception de

l'indométacine diluée dans l'alcool, du L-NAME et du 3-aminobenzamide dilués dans la solution de Krebs. Toutes les solutions sont préparées le jour de l'expérience, juste avant leur usage.

B- Rôle du monoxyde d'azote dans la vasoréactivité pulmonaire au cours de la cirrhose expérimentale (Chabot *et al.*, Eur Respir J 1996; 9: 560-564)

Nous avons utilisé le modèle de syndrome hépatopulmonaire décrit par Chang & Ohara (1992) pour étudier, *in vitro*, la vasoréactivité pulmonaire de rats cirrhotiques et préciser le rôle du NO au cours du syndrome hépatopulmonaire dans l'hyporéactivité pulmonaire à la phényléphrine, un agent vasoconstricteur agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques.

1- Techniques chirurgicales

L'étude a été réalisée sur des anneaux vasculaires pulmonaires provenant de rats mâles Sprague-Dawley d'un poids de 150 à 175 g. Ces rats ont été répartis en 2 groupes, cirrhotique et contrôle. Toutes les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie à l'éther. Une ligature du canal cholédoque est réalisée chez les rats du premier groupe. Cette ligature de la voie biliaire induit le développement d'une cirrhose biliaire en 4 semaines, avec un état hyperkinétique et un syndrome hépatopulmonaire. L'existence d'une cirrhose hépatique a été confirmée sur les premiers rats étudiés dans ce travail par la présence de nodules de régénération avec histologiquement une fibrose annulaire associée à des altérations cellulaires des hépatocytes. Le groupe contrôle subit une laparotomie sans ligature du canal cholédoque. Les blocs coeur-poumons sont retirés 4 semaines après la première intervention chirurgicale. Vingt blocs coeur-poumons ont pu être disséqués, provenant de 10 rats cirrhotiques et 10 rats contrôles.

2- Etudes pharmacologiques

a - Etudes dose-contraction

Après une précontraction des anneaux vasculaires pulmonaires avec du potassium (KCl : 60 mM), les anneaux sont soigneusement lavés. Après une période d'équilibre de 60 minutes, tous les anneaux sont préincubés pendant 30 minutes avec de l'indométacine (10^{-5} M). L'incubation avec l'indométacine inhibe la voie de la cyclooxygénase et permet donc de s'affranchir de l'action de prostaglandines néoformées. L'indométacine est dilué dans de l'éthanol à 50%. La concentration finale d'éthanol dans le bain d'organe ne dépasse pas 0,001%, concentration dénuée d'effet sur l'anneau vasculaire. La réponse contractile à des concentrations cumulatives de L-phényléphrine (10^{-8} à 10^{-5} M) est ensuite étudiée. Pour évaluer l'influence du NO sur la réponse vasoconstrictrice de la phényléphrine, certains anneaux sont prétraités avec le N^o nitro-L-arginine (10^{-4} M).

b - Etudes dose-relaxation

Après une précontraction submaximale avec de la phényléphrine pour obtenir une tension élevée stable, des concentrations cumulatives d'acétylcholine (10^{-8} à 10^{-5} M) ou de nitroprussiate de sodium (10^{-8} à 10^{-4} M) sont ajoutées dans le bain d'organe pour étudier la dilatation des anneaux vasculaires des 2 groupes.

3 - Principaux résultats

La réponse contractile à la phényléphrine des anneaux vasculaires provenant de rats cirrhotiques est significativement réduite comparativement à celle d'anneaux vasculaires des rats contrôles. Un pré-traitement avec du L-NA (10^{-4} M) augmente significativement la réponse contractile à la phényléphrine pour les anneaux vasculaires des rats du groupe cirrhose mais ne modifie pas la réponse dans le groupe contrôle. Le L-NA restaure une réponse à la phényléphrine dans le groupe cirrhose comparable à celle obtenue chez les rats contrôles. Il n'y a pas de différence de relaxation des anneaux vasculaires pulmonaires entre les 2 groupes en réponse à l'acétylcholine et au nitroprussiate de sodium. Les résultats sont détaillés et discutés dans la publication insérée dans les pages suivantes.

Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis

F. Chabot*, H. Mestiri, S. Sabry, J. Dall'Ava-Santucci, A. Lockhart, A.T. Dinh-Xuan

Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis. F. Chabot, H. Mestiri, S. Sabry, J. Dall'Ava-Santucci, A. Lockhart, A.T. Dinh-Xuan. ©ERS Journals Ltd 1996.

ABSTRACT: The aim of this study was to see whether increased activity of nitric oxide (NO) might account for decreased pulmonary vascular tone seen in the hyperdynamic circulation of cirrhosis. We compared the pulmonary vascular reactivity of isolated pulmonary arteries (PA) from control rats (n=10), and rats with biliary cirrhosis (n=10) induced by chronic bile duct ligation (4 weeks).

The responses of PA rings to cumulative concentrations of phenylephrine, acetylcholine and sodium nitroprusside were studied, and also the effects of inhibition of synthesis of NO by the L-arginine analogue, N^ω-nitro-L-arginine (L-NOARG) in PA rings challenged with cumulative concentrations of phenylephrine and acetylcholine.

The contractile response to phenylephrine was significantly reduced in cirrhotic PA rings as compared with controls. Pretreatment with L-NOARG (10⁻⁴ M) significantly increased the contractile response to phenylephrine in PA rings from cirrhotic rats but not in control PA rings. Furthermore, L-NOARG restored the response to phenylephrine in cirrhotic PA rings back to normal. There was no difference in the relaxation of PA rings from both groups in response to acetylcholine and sodium nitroprusside.

We conclude that *in vitro* pulmonary artery ring hyporeactivity to phenylephrine results from increased nitric oxide production in the pulmonary circulation of cirrhotic rats and might account for the hepatopulmonary syndrome.

Eur Respir J., 1996, 9, 560-564

Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, C.H.U. Cochin Port-Royal, Université René Descartes, Paris, France.

*Present address: Service des Maladies Respiratoires et Réanimation Respiratoire, C.H.U. Nancy-Brabois, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France.

Correspondence: A.T. Dinh-Xuan
Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles
Hôpital Cochin 27
rue du fg Saint-Jacques
75679 Paris cedex 14
France

Keywords: Cirrhosis
endothelium
nitric oxide
pulmonary vascular reactivity

Received: June 2 1995
Accepted after revision December 12 1995

Pulmonary vascular reactivity is often altered in cirrhosis resulting in the hepatopulmonary syndrome or, less frequently, pulmonary hypertension. The mechanisms underlying pulmonary hypertension in cirrhosis are still unknown [1]. However, it seems likely that they are different from those of the hepatopulmonary syndrome [2]. The latter is characterized by pulmonary gas exchange abnormalities with impaired hypoxic pulmonary vasoconstriction, intrapulmonary microvascular dilatation, high cardiac output and low pulmonary vascular resistance [2].

A recent hypothesis by VALLANCE and MONCADA [3] related the hyperdynamic circulation in cirrhosis to increased synthesis and/or release of nitric oxide (NO). NO modulates pulmonary vascular tone in man both in health and disease [4, 5]. However, some uncertainties still exist as to the role of NO in the modulation of pulmonary vascular tone in rats [6-12].

Until the present time, only a few studies have looked at the putative role of NO in the hepatopulmonary syndrome. MAYORAL *et al.* [13] found increased NO in the exhaled breath of patients with the hepatopulmonary syndrome, probably as a result of overproduction of NO in the lungs. However, there is so far no direct evidence supporting the hypothesis that NO production might be

increased in the pulmonary circulation of patients with cirrhosis. Such evidence is difficult to obtain in humans. Therefore, we used an animal model of hepatopulmonary syndrome [14] to assess the reactivity of isolated pulmonary arteries from rats with biliary cirrhosis.

Methods

Surgical techniques

Male Sprague-Dawley rats weighing 150-175 g were purchased (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) and given food and water *ad libitum*. They were divided into two groups. One group (cirrhosis group) had the common bile duct ligated, as described previously [14, 15]. Briefly, under light ether anaesthesia, the abdomen was opened through a midline incision and the common bile duct was dissected and resected between 4.0 silk ligatures. The abdomen was closed with sutures and the rats were allowed to recover. The total mortality rate was approximately 20%, with the majority of deaths in the first 2 weeks. This procedure is known to lead to biliary cirrhosis within 4 weeks with

haemodynamic features of portal hypertension and hyperkinetic circulation with high cardiac output and decreased systemic vascular resistance [14, 15].

Histological features of liver cirrhosis were sought and documented in the first rats that underwent common bile duct ligation. In the control group, rats were anaesthetized and their abdomen was opened without bile duct ligation. Four weeks after the first operation, the heart-lung block was removed under ether anaesthesia for pharmacological study.

Tissue preparation

Segments of pulmonary artery were obtained from 20 rats (10 control and 10 with cirrhosis). Immediately after excision of the heart-lung block, tissues were placed in cold (4°C), pre-gassed Krebs-Ringer bicarbonate (KR) solution and transported to the laboratory for dissection. The composition of the KR solution was as follows (in mmol·L⁻¹): NaCl 118; NaHCO₃ 25.5; KCl 5.9; NaHPO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; CaCl₂ 2.5; glucose 5.6. Vascular segments were obtained from proximal pulmonary arteries which had been carefully dissected, cleaned of excessive connective tissue and cut into rings (3–5 mm in length and 1–2 mm outer diameter). The endothelium was carefully preserved in all specimens.

Due to the relatively small size of the pulmonary circulation of the rat, the tissue obtained from each animal could only be divided into 2–4 different vascular segments, each segment being tested only once. Because this study involved the testing of various pharmacological compounds (see next paragraph), the number of rats used for a given subset of pharmacological study was always less than 10, which represented the total number of rats in the control and the disease groups, respectively.

Pharmacological studies

Dose-contraction studies. Rings were mounted over fine rigid wires, in organ chambers filled with 13 mL of KR buffer, which was freshly prepared. The solution was bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂, maintained at 37°C by an outer bath warmed by a recirculating heater (Polystat 22, Bioblock, Illkirch, France). Each ring was preset at its optimal length for tension development, and changes in isometric tension were recorded by a force transducer (Amplifier 6112, Palmer Bioscience, Sheerness, UK) connected to a chart drive recorder (L 6514, Linseis, Bioblock, Illkirch, France). After precontraction with potassium chloride (KCl, 60 mM), the rings were carefully washed, and were allowed to equilibrate in the bath with the tension returning to baseline, at least 60 min during which the fluid in the bath, was changed every 15 min. After equilibration, all rings were preincubated for 30 min with indomethacin (10⁻⁵ M), which remained in the bath throughout the studies. Thereafter, contraction to cumulative doses of L-phenylephrine dichloride (10⁻⁸ to 10⁻⁵ M) was assessed. To assess the influence of NO on the vasocontractile response to phenylephrine, some of the

rings were pretreated with a competitive inhibitor of NO synthesis, the L-arginine analogue, N^ω-nitro-L-arginine (L-NOARG, 10⁻⁴ M).

Dose-relaxation studies. After submaximal precontraction with phenylephrine to obtain a stable plateau of increased tension, cumulative concentrations of acetylcholine chloride (10⁻⁸ to 10⁻⁵ M) and sodium nitroprusside (10⁻⁸ to 10⁻⁴ M) were added to the baths to assess endothelium-dependent and -independent vasodilatation, respectively, in PA rings from both groups.

Drugs

All the drugs were purchased from Sigma Chemical (Saint-Quentin Fallavier, France) and diluted in distilled water, except for indomethacin, which was dissolved in 50% ethanol. The final concentration of ethanol in the organ bath did not exceed 0.001%, which, in itself, did not have any effect on the tissue. All solutions were freshly prepared before use.

Statistical analysis

All data were expressed as mean±SEM. Contraction in response to phenylephrine was expressed as the percentage of contraction in response to KCl (60 mM). Relaxation in response to acetylcholine and sodium nitroprusside was expressed as the percentage of precontraction. Non-parametric Wilcoxon test for unpaired values [16] was used to compare reactivity (*i.e.* maximal contraction and maximal relaxation) of PA rings from cirrhotic rats and controls in response to phenylephrine, acetylcholine and sodium nitroprusside. Response of PA rings pretreated with L-NOARG was compared with those of untreated PA rings from both the control and the cirrhotic groups by the nonparametric Wilcoxon test for paired values [16]. A p-value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

All rats were studied 28 days after bile duct ligation or sham-operation. Histologically, livers of rats with chronic bile duct ligation showed evidence of micro-nodular cirrhosis with severe fibrosis.

PA rings from rats with cirrhosis developed a lesser vasocontractile response to phenylephrine as compared with controls (maximal contraction=123±9% in control rats *versus* 93±11% in rats with cirrhosis; *p*<0.01) (fig. 1). Pretreatment with L-NOARG restored the vasocontractile response to phenylephrine in PA rings of cirrhotic rats (increasing maximal contraction from 93±11 to 127±15%; *p*<0.005) (fig. 2). L-NOARG did not significantly change the vasocontractile response to phenylephrine in PA rings of control rats (maximal contraction=128±25 *versus* 123±9% in PA rings pretreated and untreated with L-NOARG, respectively) (fig. 2). There was no significant

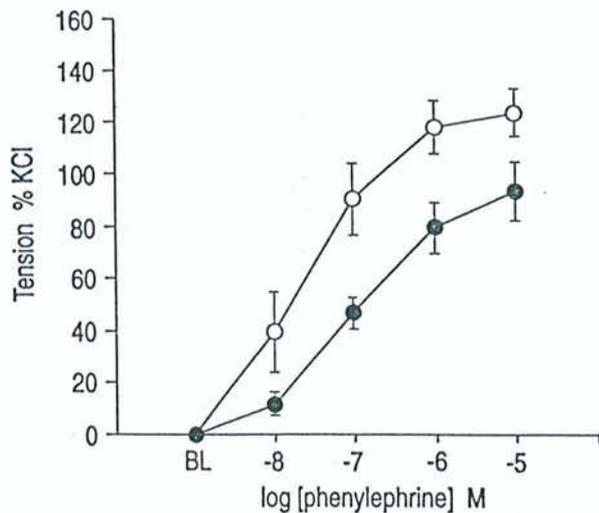


Fig. 1. — Tension developed in response to phenylephrine in pulmonary arterial rings from control rats ($n=7$) (—○—) and cirrhotic rats ($n=5$) (—●—) expressed as % of tension developed to KCl. Results are expressed as mean \pm SEM. Each ring was obtained from a different animal. BL: baseline.

difference between the rings of cirrhotic rats after addition of L-NOARG compared to those of control rats after addition of L-NOARG (fig. 2).

Acetylcholine induced a similar relaxation in both groups (fig. 3). Pretreatment with L-NOARG significantly inhibited endothelium-dependent relaxation to acetylcholine ($p<0.0001$) in pulmonary artery rings from rats of both groups (fig. 3). There was no significant difference between the groups in the concentration-dependent relaxation to sodium nitroprusside (fig. 4).

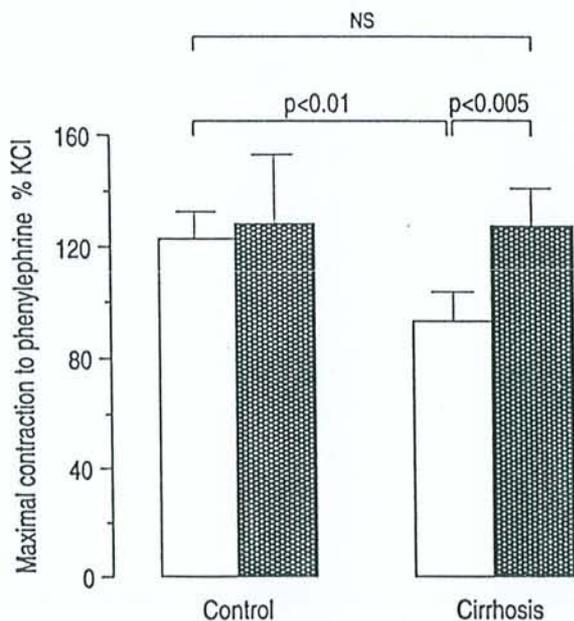


Fig. 2. — Maximal contraction developed in response to phenylephrine in rings from control ($n=7$) and cirrhotic rats ($n=5$). The rings are divided into two groups as follows: untreated (□), treated with N^G -nitro-L-arginine (▨). Results are expressed as mean \pm SEM. NS: nonsignificant.

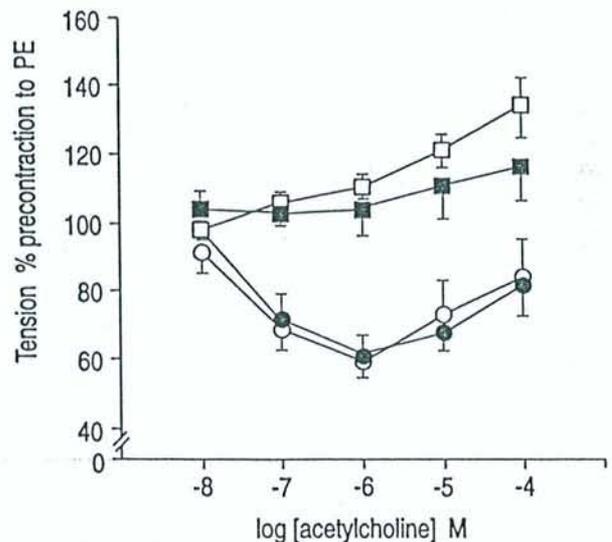


Fig. 3. — Endothelium-dependent relaxation to cumulative doses of acetylcholine in pulmonary arterial rings from control (open symbols) and cirrhotic (closed symbols) rats. The rings are divided into two groups as follows: untreated (circles), treated with N^G -nitro-L-arginine (squares). The reduced tension is expressed as % of submaximal precontraction to phenylephrine (PE). Results are expressed as mean \pm SEM. For all groups $n=8$.

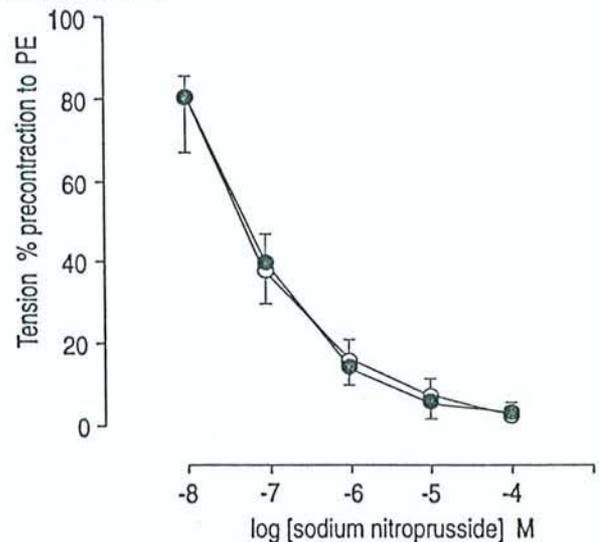


Fig. 4. — Endothelium-independent relaxation to cumulative doses of sodium nitroprusside in pulmonary arterial rings from control (open symbols) and cirrhotic (closed symbols) rats. The reduced tension is expressed as % of submaximal precontraction to phenylephrine. Results are expressed as mean \pm SEM. Each ring was obtained from a different animal. For both groups $n=7$.

Discussion

The main results of this study indicate that pulmonary artery rings from cirrhotic rats developed less vasoconstrictive response to phenylephrine than controls. Such pulmonary vascular hyporeactivity probably results from NO overproduction, as it was abolished by inhibition of NO synthesis by the L-arginine analogue, L-NOARG.

Ligation and excision of the common bile duct in rats induce an extrahepatic cholestasis with histologic features of biliary cirrhosis 4 weeks later [14], as was confirmed in our study. We did not perform cardiorespiratory measurements to characterize the pulmonary and systemic

haemodynamic state of these animals because it has been established that awake rats with chronic bile duct ligation develop many features of human cirrhosis, including hyperdynamic circulation, low pulmonary vascular resistance, impaired pulmonary gas exchange and depressed hypoxic pulmonary vasoconstriction [14, 15]. Rats with chronic bile duct ligation, therefore, present with the hallmarks of the hepatopulmonary syndrome [14, 15]. They can be reasonably considered as a fair model for the study of pulmonary circulatory changes in human cirrhosis.

Results of other studies investigating the effects of acute alveolar hypoxia are conflicting. In humans with cirrhosis, loss of hypoxic pulmonary vasoconstriction was observed by some investigators [17]. However, others have found that the hypoxic pulmonary vasoconstriction was at least partially preserved [18, 19]. In rats with cirrhosis, CHANG and OHARA [14] observed a marked reduction of the vasopressor response to hypoxia, whereas pulmonary vasoconstrictor response to angiotensin II was preserved.

The underlying mechanisms of the hepatopulmonary syndrome are not well understood. One of the current hypotheses favours an abnormal sensitivity of the pulmonary vascular bed to a substance which is normally present in the pulmonary circulation. Alternatively, failure of inactivation, or production, of circulating vasoactive substances by the liver, leading to altered pulmonary vasoreactivity are also likely to account for the hepatopulmonary syndrome [2].

Among vasodilator substances, NO is likely to play an important role [3]. L-arginine analogues, such as N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and L-NOARG, are useful pharmacological tools in the study of the L-arginine-NO pathway [20]. Recent studies suggest that other NO synthase inhibitors could be more specific for either the constitutive [21, 22] or inducible [23, 24] isoforms. However, at the time of the present study, L-NOARG was chosen because it was known to be more potent than L-NMMA in inhibiting NO synthesis [25]. L-NOARG restored the vasocontractile response to phenylephrine in pulmonary artery rings from cirrhotic rats. These results suggest that overproduction of NO is, at least in part, responsible for decreased response to vasoconstrictor stimuli of the pulmonary vascular bed in cirrhosis. This, in turn, could favour excessive pulmonary vasodilatation or impaired hypoxic pulmonary vasoconstriction as seen in the hepatopulmonary syndrome.

Consistent with our *in vitro* results, are the recent findings by MAYORAL *et al.* [13], who measured NO in the exhaled gas of patients with hepatopulmonary syndrome. Compared with normoxaemic cirrhotics and healthy volunteers, exhaled NO was increased in these patients. Furthermore, methylene blue, which blocks NO activity, has been reported to decrease pulmonary shunting in one patient [26]. Our observations in isolated pulmonary artery, together with these recent reports [13, 26] are consistent with the hypothesis that increased NO production may account for the pulmonary haemodynamic changes in the hepatopulmonary syndrome. Experimental results obtained in the systemic and splanchnic

circulation are also consistent with the hypothesis of increased NO production as the cause of arterial hypotension and splanchnic vasodilatation of rats with cirrhosis or portal hypertension [27–31].

There was no difference in the vasodilator response to acetylcholine and sodium nitroprusside in pulmonary artery rings of cirrhotic rats as compared with controls. The endothelium-dependent vasodilator, acetylcholine, induces the release of NO, by stimulating the constitutive form of the NO synthase through activation of endothelial muscarinic receptors [20]. However, acetylcholine also causes the release of the so-called endothelium-derived hyperpolarizing factor, which might differ from NO [32]. Due to the coexistence of these different pathways through which acetylcholine causes vasorelaxation, it seems difficult to draw any firm conclusion from the present data. Nevertheless, the lack of difference in acetylcholine-induced vasodilatation does not favour the hypothesis of increased activity of the constitutive NO synthase in cirrhosis. Therefore, NO overproduction in the lung of cirrhotic rats is probably the result of increased activity of the inducible NO synthase, as suggested by VALLANCE and MONCADA [3].

The endothelium-independent vasodilator sodium nitroprusside relaxes smooth muscle by activating the soluble form of the enzyme guanylate cyclase which, in turn, gives rise to the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP) [33]. In contrast to acetylcholine, sodium nitroprusside induces vasorelaxation after its conversion to NO without requiring the presence of endothelium. The lack of difference in response to sodium nitroprusside between cirrhotic and control rats suggest that the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway is not altered in pulmonary vascular smooth muscle in cirrhosis.

The importance of NO as a modulator of vascular tone in the pulmonary vascular bed of normal rats is still debated. Various inhibitors of NO synthesis or activity have been shown to increase normoxic and hypoxic pulmonary vasomotor tone in some but not all experiments [6–12]. In this study, pretreatment by L-NOARG did not significantly increase the vasocontractile response to phenylephrine in pulmonary artery rings from control rats. Our results suggest that background production of NO is not important in the modulation of increased tone to phenylephrine in the conduit pulmonary artery of normal rats. This is supported by the recent study of ISAACSON *et al.* [12], who found a low concentration of NO oxidation products in the effluent of isolated rat lung.

In summary, this study demonstrates that pulmonary artery rings of cirrhotic rats developed hyporeactivity in response to phenylephrine *in vitro* as a result of an increased production of NO in the pulmonary circulation.

References

1. Harris P, Heath D. Portal and pulmonary hypertension. In: Harris P, Heath D, eds. *The Human Pulmonary Circulation: Its Form and Function in Health and Disease*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1986; 444–455.

2. Rodriguez-Roisin R, Agustí AGN, Roca J. The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities. *Thorax* 1992; 47: 897-902.
3. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-778.
4. Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, et al. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1539-1547.
5. Dinh-Xuan AT. Disorders of endothelium-dependent relaxation in pulmonary disease. *Circulation* 1993; 87 (Suppl. 5): V81-V87.
6. Brashers VL, Peach MJ, Rose CE Jr. Augmentation of hypoxic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused rat lung by *in vitro* antagonists of endothelium-dependent relaxation. *J Clin Invest* 1988; 82: 1495-1502.
7. Hasunuma K, Yamaguchi T, Rodman DM, O'Brien RF, McMurtry IF. Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1991; 260: L97-L104.
8. Liu SF, Crawley DE, Barnes PJ, Evans TW. Endothelium-derived relaxing factor inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 32-37.
9. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991; 87: 155-162.
10. Barnard JW, Wilson PS, Moore TM, Thompson WJ, Taylor AE. Effect of nitric oxide and cyclo-oxygenase products on vascular resistance in dog and rat lungs. *J Appl Physiol* 1993; 74: 2940-2948.
11. Hampl V, Archer SL, Nelson DP, Weir EK. Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 1993; 75: 1748-1757.
12. Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP, Archer SL. Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 1994; 76: 933-940.
13. Mayoral V, Higenbottam TW, Cremona G, Alexander G, Borland CDR, Jones G. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with hepatopulmonary syndrome (Abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: A26.
14. Chang SW, Ohara N. Pulmonary circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis: an animal model of the hepatopulmonary syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 795-805.
15. Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol* 1986; 251: G176-G180.
16. Zar JH. Biostatistical analysis, 2nd edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1984.
17. Daoud FS, Reeves JT, Schaefer JW. Failure of hypoxic pulmonary vasoconstriction in patients with liver cirrhosis. *J Clin Invest* 1972; 51: 1076-1080.
18. Naeije R, Halleman R, Mols P, Mélot C. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in liver cirrhosis. *Chest* 1981; 80: 570-574.
19. Rodriguez-Roisin R, Roca J, Agustí AGN, Mastai R, Wagner PD, Bosch J. Gas exchange and pulmonary vascular reactivity in patients with liver cirrhosis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1085-1092.
20. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
21. Schini VB, Vanhoutte PM. Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 553-559.
22. Zembowicz A, Hatchett RJ, Radziszewski W, Gryglewski RJ. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase by ebelen: prevention by thiols suggests the inactivation by ebelen of a critical thiol essential for the catalytic activity of nitric oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 1112-1118.
23. Yu SM. Thaliporphine selectively inhibits expression of the inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase. *Biochem J* 1994; 303: 289-294.
24. Wolff DJ, Lubeskie A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthesis. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316: 290-301.
25. Moore PK, al Swayeh OA, Chong NWS, Evans RA, Gibson A. L-N^G-nitro-arginine, a novel, L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 408-412.
26. Rolla G, Bucca C, Brussino L. Methylene blue in the hepatopulmonary syndrome (Letter). *N Engl J Med* 1994; 331: 1098.
27. Pizcueta MP, Pique JM, Bosch J, Whittle BJR, Moncada S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 184-190.
28. Lee FY, Albillos A, Colombato LA, Groszmann RJ. The role of nitric oxide in the vascular hyporesponsiveness to methoxamine in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1992; 16: 1043-1048.
29. Sieber CC, Groszmann RJ. *In vitro* hyporeactivity to methoxamine in portal hypertensive rats: reversal by nitric oxide blockade. *Am J Physiol* 1992; 262: G996-G1001.
30. Claria J, Jimenez W, Ros J, et al. Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: role of endogenous nitric oxide. *Hepatology* 1992; 15: 343-349.
31. Castro A, Jimenez W, Claria J, et al. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 1993; 18: 367-372.
32. Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 272-274.
33. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. *J Clin Invest* 1986; 78: 1-5.

PULMONARY VASCULAR HYPOREACTIVITY OF ISOLATED PULMONARY ARTERIES FROM RATS WITH BILIARY CIRRHOSIS. ROLE OF NITRIC OXIDE. F. CHABOT, H. MESTIRI, S. SABRY, O. SOUBRANE, D. HOUSSIN, A. LOCKHART, A.T. DINH-XUAN, Faculté de médecine Cochin-Port Royal, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, FRANCE.

Increased activity of the endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide (NO), may account for the decreased pulmonary vascular tone described in the hyperdynamic circulation of the cirrhosis. This study compared the pulmonary vascular reactivity of isolated pulmonary arteries (PA), between control rats (n = 9) and rats with biliary cirrhosis (n = 5) induced by chronic bile duct ligation (4 wks). The response of PA rings to phenylephrine, acetylcholine and sodium nitroprusside were studied in both groups. PA rings from rats with cirrhosis developed a lesser vasocontractile response to phenylephrine as compared with controls ($p < 0.05$). There was no difference in the relaxation of PA rings from both groups in response to acetylcholine and sodium nitroprusside. Pretreatment with the NO synthase inhibitor, N^ω-nitro-L-arginine, restored the vasocontractile response to phenylephrine in cirrhotic rats ($p < 0.05$). These findings indicate that PA rings of cirrhotic rats developed hyporeactivity in response to phenylephrine in vitro, as a result of increased NO production in the pulmonary circulation, which might account for hepatopulmonary syndrome.

Congrès de l'A.T.S., Seattle, 20-21 mars 1995
Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: A 622

C - Effets du peroxy-nitrite sur le tonus vasculaire pulmonaire du rat

(Chabot *et al.*, Br J Pharmacol 1997b; 121: 485-490)

La technique des anneaux vasculaires isolés a également été utilisée pour étudier les effets du peroxy-nitrite sur le tonus vasculaire pulmonaire. Un prétraitement par un inhibiteur de la PARS, le 3-aminobenzamide, a été utilisé pour préciser le rôle de l'activation de la PARS dans la modulation du tonus vasculaire pulmonaire induite par le peroxy-nitrite.

1 - Préparation du peroxy-nitrite

Le peroxy-nitrite préparé selon la méthode de Beckman *et al.*, (1990), est congelé et conservé 15 jours au maximum. Après décongélation partielle, la concentration de peroxy-nitrite de l'aliquote est mesurée par son coefficient d'extinction molaire puis le peroxy-nitrite est dilué pour obtenir les concentrations souhaitées immédiatement avant son administration dans le bain d'organe. Une solution contrôle, dépourvue de peroxy-nitrite, est également préparée selon les mêmes modalités.

Le volume du bain d'organe utilisé dans cette expérimentation est de 2 ml. En utilisant des anneaux vasculaires pulmonaires de rat, nous avons mis en évidence que le volume d'une drogue ajouté dans le bain d'organe doit être de 20 µl au maximum pour chaque concentration. Ce volume correspond à une dilution par un facteur 100 dans le bain d'organe. Ce volume maximal évite des variations de tension isométrique induites par des variations de volume dans le bain d'organe. En raison des concentrations de peroxy-nitrite obtenues dans les aliquotes et des contraintes de dilution liées au volume du bain d'organe, la plus haute concentration de peroxy-nitrite dans le bain d'organe a été de 10^{-4} M. Cette concentration de peroxy-nitrite peu élevée, liée à une solution mère elle-même peu concentrée, rend compte de l'impossibilité de faire des courbes dose-réponse complètes pour le peroxy-nitrite.

2 - Etudes pharmacologiques

Les anneaux vasculaires pulmonaires proviennent de rats Wistar d'un poids de 275 à 300 g. Après une précontraction des anneaux vasculaires pulmonaires avec du potassium (KCl : 40 mM), les anneaux sont soigneusement lavés. Après une période d'équilibre de 45 minutes, les effets du peroxyde d'azote sont étudiés par des courbes dose-contraction sur des anneaux dont la tension est à la valeur de base et par des courbes doses-relaxation sur des anneaux précontractés par un analogue du thromboxane, l'U46619 (10^{-6} M). L'action pharmacologique du peroxyde d'azote est précisée par l'étude des effets sur le tonus vasculaire pulmonaire d'un prétraitement par du 3-aminobenzamide (10^{-3} et 10^{-2} M), du L-NAME (10^{-4} M) et de la superoxyde dismutase (SOD; 30 unités ml^{-1}) avant d'induire une précontraction par l'U46619 et de réaliser une courbe dose-relaxation avec des concentrations cumulatives de peroxyde d'azote. Les effets d'un prétraitement par la SOD sur l'action vasodilatatrice du peroxyde d'azote sont étudiés pour mettre en évidence une action du superoxyde ; l'absence d'effet de ce prétraitement suggérerait l'absence d'anion superoxyde dans la solution de peroxyde d'azote et l'absence de libération d'anion superoxyde par le vaisseau sous l'influence du peroxyde d'azote. L'étude inclut aussi un prétraitement par L-NAME pour inhiber la synthèse de NO dans le vaisseau étudié ; l'absence d'effet de ce prétraitement suggérerait que le peroxyde d'azote n'agit pas en stimulant une libération de NO endothélial. Le rôle de l'activation de la PARS est précisé par un prétraitement par le 3-aminobenzamide.

Les effets du peroxyde d'azote sur la vasodilatation dépendante de l'endothélium sont étudiés par un prétraitement des anneaux vasculaires par du peroxyde d'azote ou la solution contrôle avant administration de l'U46619 puis d'acétylcholine.

La voie de la PARS est ensuite étudiée par un prétraitement par le 3-aminobenzamide avant précontraction par l'U46619 et courbes dose-relaxation avec l'acétylcholine et le nitroprussiate de sodium pour déterminer les effets de la PARS sur la vasodilatation dépendante et indépendante de l'endothélium.

3 - Principaux résultats

Le peroxy-nitrite n'a aucun effet sur le tonus vasculaire pulmonaire basal mais induit une vasorelaxation dose-dépendante des vaisseaux précontractés. Un prétraitement par le peroxy-nitrite ne diminue pas la vasoréactivité à l'acétylcholine et à forte concentration (100 μ M) augmente la vasorelaxation induite par l'acétylcholine. L'action vasodilatatrice du peroxy-nitrite n'est pas modifiée par le L-NAME, la SOD mais est inhibée par le 3-animobenzamide. Le 3-animobenzamide n'a pas d'effet sur la vasorelaxation causée par l'acétylcholine ou le nitrite de sodium mais augmente la vasorelaxation induite par le nitroprussiate de sodium.

Les résultats sont détaillés et discutés dans la publication insérée dans les pages suivantes.



Characterization of the vasodilator properties of peroxynitrite on rat pulmonary artery: role of poly (adenosine 5'-diphosphoribose) synthase

¹Francois Chabot, Jane A. Mitchell, Gregory J. Quinlan & ²Timothy W. Evans

Unit of Critical Care, Department of Thoracic Medicine, National Heart and Lung Institute, Imperial College and Royal Brompton Hospital, Sydney Street, London SW3 6NP

1 The pulmonary vasculature is constantly exposed to oxygen and reactive oxygen species such as nitric oxide (NO) and superoxide anions which can combine at a near diffusion limited rate, to form the powerful oxidant, peroxynitrite (ONOO⁻). When formed in large amounts, ONOO⁻ is thought to contribute to tissue injury and vascular dysfunction seen in diseases such as the acute respiratory distress syndrome (ARDS) and septic shock. Recent studies have shown that ONOO⁻ can cause vasodilatation and at higher concentrations can activate poly (adenosine 5'-diphosphoribose) synthase (PARS) leading to consumption of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and adenosine 5'-triphosphate (ATP). As the lung represents a prime site for ONOO⁻ formation, we characterized its effects on pulmonary vascular tone and on endothelial function. In addition, we have assessed the role of PARS in producing the vasoactive properties of ONOO⁻ on pulmonary artery rings.

2 Isolated pulmonary artery rings from rats were mounted in organ baths containing warmed and gassed (95% O₂; 5% CO₂) Krebs buffer. Force was measured with isometric force transducers. After equilibration, ONOO⁻ (10 nM–100 μM) was added in a cumulative manner. In separate experiments designed to assess any vasodilator properties of ONOO⁻, tissues were pre-contracted with the thromboxane mimetic U46619 (1 μM). Once a stable base-line was achieved, ONOO⁻ was added in a cumulative fashion. ONOO⁻ had no significant effect on resting pulmonary artery tone but caused concentration-dependent relaxations of pre-contracted vessels in the range 1 μM to 100 μM. In some experiments the effects of freshly prepared ONOO⁻ solutions were compared with those allowed to decay at 4°C for 2 days.

3 In some experiments either vehicle or ONOO⁻ (1, 10 or 100 μM) was added for 15 min before U46619 (1 μM). Concentration-response curves to the endothelium-dependent vasodilator, acetylcholine (10 nM–100 μM) were then constructed. In these experiments, ONOO⁻ (1 μM or 10 μM) had no effect on the actions of acetylcholine. However, at the highest concentration tested (100 μM), ONOO⁻ increased acetylcholine-induced relaxations.

4 The vasodilator actions of ONOO⁻ were unaffected by the NO synthase inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 μM) or by removal of superoxide anions with superoxide dismutase (SOD) (30 units ml⁻¹). However, the relaxations induced by ONOO⁻ were significantly inhibited by the PARS inhibitor, 3-aminobenzamide (10 μM). In contrast to its effects on ONOO⁻, 3-aminobenzamide had no effect on the relaxation caused by acetylcholine or sodium nitrite, but actually increased that induced by sodium nitroprusside.

5 These data show that ONOO⁻ causes vasodilatation of rat pulmonary arteries, probably via activation of PARS. Moreover, at concentrations where relaxation was achieved, ONOO⁻ did not affect the ability of pulmonary artery rings to relax to acetylcholine. We propose that ONOO⁻, but not endothelially derived NO, activates PARS resulting in the rapid depletion of ATP and a consequent reduction in contraction as well as other active processes of vascular smooth muscle. The finding that 3-aminobenzamide inhibited the actions of ONOO⁻ but not acetylcholine, suggests that NO and ONOO⁻ cause relaxation by independent mechanisms. It has been suggested that ONOO⁻ is responsible for the vascular hyporesponsiveness to constrictor agents seen in experimental sepsis. This observation together with our current finding, that 3-aminobenzamide inhibits the relaxation induced by ONOO⁻ but not by acetylcholine, suggests that inhibitors of PARS may reduce the persistent hypotension seen in sepsis without affecting the actions of endothelium-derived NO. Thus, the use of PARS inhibitors may represent a novel therapeutic approach to the treatment of septic shock.

Keywords: Rat pulmonary arteries; peroxynitrite; poly-ADP ribosyltransferase; 3-aminobenzamide; superoxide dismutase (SOD); NO; N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

Introduction

Under physiological conditions, a powerful vasodilator, nitric oxide (NO) is continuously released by endothelial cells to regulate organ blood flow and perfusion pressure (Moncada *et*

al., 1991). Endothelial-derived NO formation is catalysed by endothelial NO synthase (eNOS; Pollock *et al.*, 1991), which by virtue of its calcium dependency, forms discreet quanta of NO. Under inflammatory conditions, such as occur in septic shock (Salter *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 1993) a calcium-independent isoform of NOS is induced (iNOS; Busse & Mulsch, 1990) that produced copious amounts of NO, a process which is thought to contribute to the fall in blood pressure seen in clinical sepsis (Petros *et al.*, 1991). Production of large

¹Present address: Service des Maladies Respiratoires et Reanimation Respiratoire, CHU Nancy-Brabois, rue du Morvan, 54510 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

²Author for correspondence.

amounts of NO by iNOS in the vascular smooth muscle has been associated with suppression of mitochondrial respiration (Gent *et al.*, 1992) and a reduction of arterial contractility.

During inflammatory events, such as sepsis, the presence of large amounts of activated leukocytes results in elevated levels of superoxide anions, formed by the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase system. The coupled production of excess NO and superoxide leads to the formation of an unstable intermediate termed peroxynitrite (ONOO⁻) (Beckman *et al.*, 1990). ONOO⁻ formation is kept to a minimum under normal conditions by endogenous superoxide dismutase (SOD), which removes superoxide, and by the limited capacity of eNOS to form NO. However, when iNOS is expressed in conditions where superoxide formation is increased, or SOD activity is decreased, ONOO⁻ is formed in excess. ONOO⁻ is commonly described as a toxic oxidant that inhibits cellular respiration (Radi *et al.*, 1994; Salgo *et al.*, 1995; Szabó *et al.*, 1996) and may contribute to endothelial dysfunction in diseases such as septic shock (Liu *et al.*, 1994; Villa *et al.*, 1994; Kooy *et al.*, 1995). ONOO⁻ inhibits cellular respiration directly by inhibiting mitochondrial electron transport (Radi *et al.*, 1994) and indirectly by activating the nuclear enzyme, poly (adenosine 5'-diphosphoribose) synthase (PARS; Salgo *et al.*, 1995). ONOO⁻ causes DNA breaks which consequently triggers a futile cycle by the PARS pathway, resulting in depletion of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Zhang *et al.*, 1994).

ONOO⁻ is a vasodilator of some vascular preparations *in vitro* including rat isolated perfused hearts (Moro *et al.*, 1994), bovine pulmonary artery (Wu *et al.*, 1994) and canine coronary artery (Liu *et al.*, 1994). Moreover, in the rat aorta, activation of PARS by endogenous ONOO⁻ accounts for the vascular hyporeactivity seen in this tissue after experimental sepsis (Szabó *et al.*, 1996). However, the role of PARS activation in ONOO⁻-induced vasodilatation of pulmonary vessels has not been addressed and the potential role of PARS activation in smooth muscle relaxation induced by endothelium-derived NO has not been studied.

Since the pulmonary circulation represents a prime site for oxidant formation, we have characterized the effects of ONOO⁻ on vascular tone in rat isolated pulmonary arteries. Secondly, we have assessed the role of PARS, by use of the specific inhibitor, 3-aminobenzamide (Banasik *et al.*, 1992), in modulating vascular responses induced by ONOO⁻, the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine, and the direct smooth muscle relaxant, sodium nitroprusside. Finally, we have assessed the effects of ONOO⁻ on the ability of vessels to relax to endothelium-dependent and -independent dilator drugs.

Methods

Preparation of ONOO⁻

ONOO⁻ was prepared as described by Beckman *et al.* (1990). Briefly, equal volumes (6 ml) of freshly prepared sodium nitrate (2 M; in distilled water) and hydrogen peroxide (2.5 M in 2.9 M nitric acid) were combined in a reaction vessel, and the resultant intense yellow coloured solution stabilized by the immediate addition of 6.6 ml of 4.2 M sodium hydroxide. All solutions used in the process were kept chilled over ice. Excess hydrogen peroxide was removed from the ONOO⁻ by passing it through a manganese dioxide column. The solution was then divided into aliquots and stored at -20°C for no longer than two weeks before use. Once frozen, ONOO⁻ accumulates at the top of the frozen solution and can, on partial defrosting, be easily removed in a more concentrated form. The concentration of ONOO⁻ was determined by use of its molar extinction coefficient (1670 M⁻¹ cm⁻¹ at A_{302 nm}). The concentration of ONOO⁻ was measured daily. The mean concentration of all solutions used in this study was 25.5 mM (range: 16.2 to 55.1 mM). The pH of the stock solution of ONOO⁻ was 11.8.

ONOO⁻ was diluted in distilled water to obtain adequate concentrations, just before application to the vascular rings. Using rat isolated pulmonary artery, we have found that drugs have to be added at 100 fold dilution (maximum of 20 µl into 2 ml for each concentration) to avoid disruptions in tension due to volume changes in the bath. Thus, the highest concentration of ONOO⁻ that could be consistently added was 100 µM. For this reason, we were unable to complete the concentration-response curve for ONOO⁻. Control solutions (vehicle) were prepared by combining the three solutions described above in the absence of sodium nitrite or hydrogen peroxide prepared to similar pH (11.9). Distilled water was used to dilute carrier solutions in the same manner as that used to dilute the ONOO⁻ solution.

Tissue preparation and organ bath experiments

The investigation was performed in accordance with the Home Office Animals (Scientific Procedure) Act 1986, published by Her Majesty's Stationery Office, London. Male Wistar rats (weight 275–300 g) were killed by cervical dislocation. Pulmonary arteries were dissected and cut into rings 2-mm wide. From each rat, 4 rings were usually obtained. The rings were mounted over a pair of rigid wires, and suspended in 2 ml organ baths containing oxygenated (95% O₂–5% CO₂) Krebs-Henseleit solution at 37°C with the following composition (mM): NaCl 118, KCl 5.9, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.5 and glucose 5.6. One of the wires was fixed, and one attached to a force transducer (FT. 03 Grass Instruments, Quincy, MA). Changes in isometric force were recorded on a polygraph multichannel recorder (Grass Model 7). A uniform baseline tension of 500 mg was applied. After 20 min of equilibration, the rings were constricted with KCl (40 mM) and relaxed to baseline by repeated washing with Krebs-Henseleit solution. Rings were left to equilibrate in the bath for a total of 45 min and washed every 20 min. ONOO⁻ or carrier solution was then added in a cumulative fashion (10 nM–100 µM) to pulmonary artery rings that were either pre-contracted by approximately 500 mg with the thromboxane mimetic, U46619 (1 µM) or left under basal tension. In separate experiments, the effects of freshly prepared solutions of ONOO⁻ were compared with those allowed to decay for 48 h, which had lost 65% of their original ONOO⁻. In some experiments the PARS inhibitor, 3-aminobenzamide (1 or 10 mM; Banasik *et al.*, 1992), the NO synthase inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 µM) or SOD (30 units ml⁻¹) were added 15 min before U46619.

In experiments designed to assess the effects of ONOO⁻ on endothelium-dependent responses, ONOO⁻, carrier solution or Krebs-Henseleit buffer was added at different concentrations, before the addition of U46619 (1 µM). Dilator responses were then recorded in each ring to increasing concentrations of acetylcholine (10 nM–100 µM).

Drugs

Acetylcholine chloride, sodium nitroprusside, L-NAME, SOD, 3-aminobenzamide and U46619 (9,11-dideoxy-11 α ,9 α epoxy-methanoprostaglandin F_{2 α}) were obtained from Sigma (Poole, Dorset, U.K.). Drugs were dissolved in distilled water except for L-NAME and 3-aminobenzamide, which were dissolved in Krebs-Henseleit solution. All solutions were prepared on the day of the experiment.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm s.e. mean for *n* (separate animals) experiments. Relaxations in response to ONOO⁻, carrier solution, acetylcholine, sodium nitroprusside or sodium nitrite are expressed as the percentage of induced tone. Data were analysed by either one- or two-way analysis of variance as suggested by GraphPAD INSTAT, GraphPAD Software, San Diego, CA and GraphPAD PRISM,

version 2. A P value less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Effects of ONOO^- on spontaneously or U46619 contracted vessels

In quiescent rings, ONOO^- (10 nM to 100 μM) had no significant relaxant effect and at the highest concentration used, caused a slight but not significant (one-way ANOVA) contraction in rat pulmonary arteries ($n=8$; data not shown). In order to demonstrate a vasorelaxant effect of ONOO^- , the study was continued in pre-constricted vessels. The thromboxane mimetic U46619 (1 μM) caused a consistent (534 ± 17 mg) and long-lasting (at least 1 h) increase in tone. In rings pre-contracted with U46619, ONOO^- induced concentration-dependent relaxations, with an apparent E_{max} of

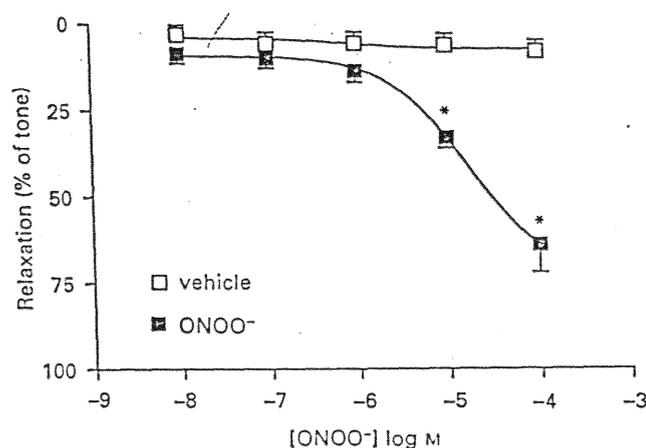


Figure 1 Vasodilator effects of ONOO^- on rat pulmonary artery. Tissues were pre-contracted with U46619 as described in the Methods section. Concentration-response curves for peroxynitrite (■) were compared with volume matched additions of carrier solution (□). Results are the mean of 6 (carrier solution) or 18 (ONOO^-) separate experiments; vertical lines show s.e.mean. A statistically significant difference (denoted by $*P < 0.05$) was found by unpaired t test at the concentrations illustrated between the responses to ONOO^- and the responses to the carrier solution.

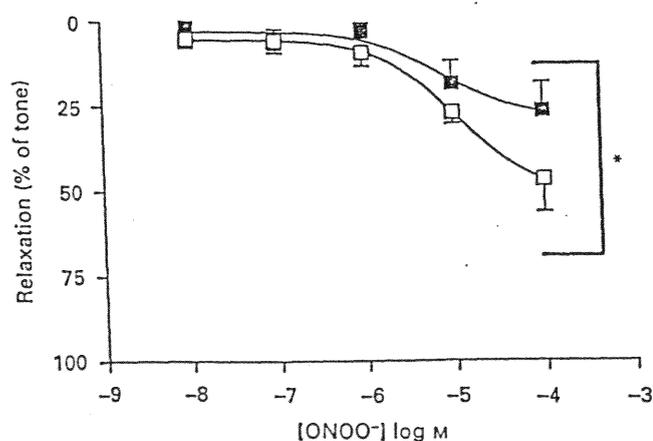


Figure 2 Comparison of the potency of freshly prepared ONOO^- (□) with solutions allowed to decay for 2 days at 4°C (■). Tissues were pre-contracted with U46619 according to the Methods section. Results are the mean of 5–8 separate experiments; vertical lines show s.e.mean. A statistically significant difference (denoted by $*P < 0.05$) was found by 2-way ANOVA between the responses to freshly prepared ONOO^- solutions and those allowed to decay for 2 days.

65 \pm 7.3% at 100 μM . The carrier solution for ONOO^- caused a slight relaxation of pre-contracted rings, although its effects were significantly less than those observed with ONOO^- (Figure 1). ONOO^- which had been allowed to decay for 48 h was significantly less potent as a vasodilator than the freshly prepared solution (Figure 2). Sodium nitrite also caused concentration-dependent relaxations of pre-contracted rat pulmonary artery.

Characterization of the effects of pre-exposure to ONOO^- on endothelium-dependent vasodilatation

After pre-contraction with U46619 (1 μM), acetylcholine (10 nM–100 μM ; Figure 3) caused concentration-dependent

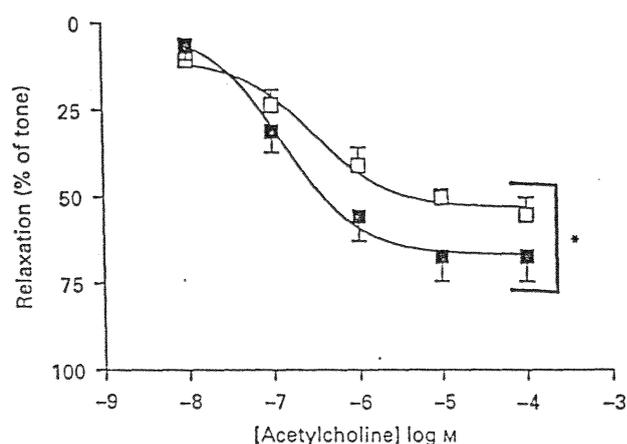


Figure 3 Effect of pre-exposure of pulmonary artery to ONOO^- (100 μM) on the vasodilator properties of acetylcholine. Tissues were pre-contracted with U46619 according to the Methods section. The response of pulmonary arteries to acetylcholine in vessels pretreated with carrier solution (□) and the responses after exposure to ONOO^- (■) are shown. Results are the mean of 5 separate experiments; vertical lines show s.e.mean. A statistically significant difference (denoted by $*P < 0.05$) was found by 2-way ANOVA between the responses of vessels to acetylcholine with or without pre-exposure to ONOO^- . In the same experiments ONOO^- at 1 μM or 10 μM did not significantly affect the vasodilator properties of acetylcholine ($n=5$).

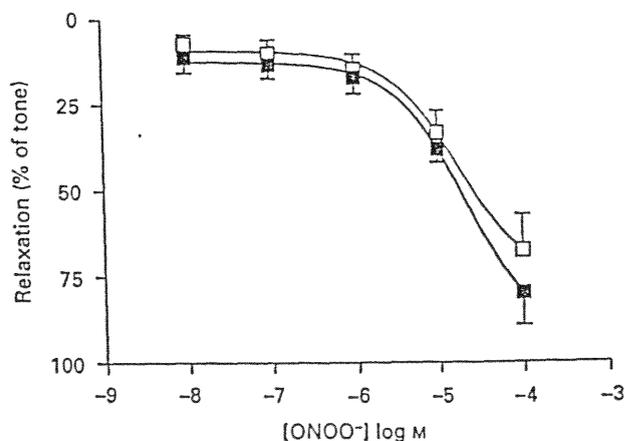


Figure 4 Effect of L-NAME (100 μM) on the vasodilator actions of ONOO^- . Tissues were pre-contracted with U46619 according to the Methods section. Control response to ONOO^- (■) and in the presence of L-NAME (□) are shown. Results are the mean of 5 separate experiments; vertical lines show s.e.mean. No difference was seen in the ability of ONOO^- to relax tissues in the presence or absence of L-NAME. In similar experiments, L-NAME (100 μM) inhibited the vasodilatation caused by acetylcholine by more than 60%.

vasodilatation. The vasodilator response to acetylcholine was increased after pretreatment with ONOO^- at $100 \mu\text{M}$ (Figure 3), but was unaffected (not significant by two-way NOVA) by ONOO^- at $1 \mu\text{M}$ or $10 \mu\text{M}$ (data not shown; $n=6$).

Effects of pretreatment with L-NAME, SOD and 3-aminobenzamide on ONOO^- concentration-response curves

The vasodilator properties of ONOO^- were unaffected by retreatment with L-NAME ($100 \mu\text{M}$; Figure 4) or SOD (30 nits ml^{-1}), (data not shown; $n=7$). However, 3-aminobenzamide at 10 mM but not at 1 mM (Figure 5) significantly inhibited the relaxations induced by ONOO^- . By contrast, 3-aminobenzamide (10 mM) had no effect on the vasodilator properties of either acetylcholine (Figure 6) or sodium nitrite (Figure 7). However, 3-aminobenzamide

(10 mM) increased the relaxations induced by sodium nitroprusside (Figure 8).

Discussion

Here we show that ONOO^- relaxes pre-contracted rat pulmonary arteries at concentrations that do not cause endothelial dysfunction. Moreover, the relaxations induced by ONOO^- were inhibited by the PARS inhibitor 3-aminobenzamide. By contrast, 3-aminobenzamide had no effect on the relaxations caused by endothelium-derived NO.

In the present study, the vasodilator effect of ONOO^- on rat pulmonary arteries occurred over a concentration range of $1 \mu\text{M}$ to $100 \mu\text{M}$, which is in agreement with observations with canine coronary artery (Liu *et al.*, 1994), rat coronary artery (Villa *et al.*, 1994) and bovine pulmonary artery (Wu *et al.*, 1994). ONOO^- is unstable at neutral pH and as such its bio-

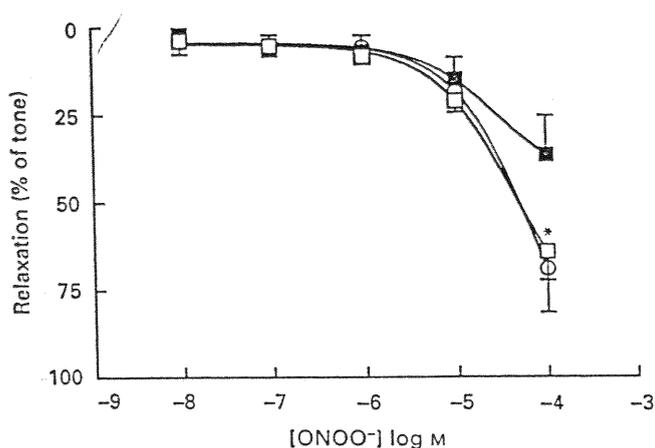


Figure 5 Effect of 3-aminobenzamide on the vasodilator actions of ONOO^- . Tissues were pre-contracted with U46619 according to the Methods section. Control response to ONOO^- (□), in the presence of 1 mM 3-aminobenzamide (○) and in the presence of 10 mM 3-aminobenzamide (■) are shown. Results are the mean of 8–9 separate experiments; vertical lines show s.e.mean. A statistically significant difference (denoted by $*P < 0.05$) was found, by unpaired *t* test at the concentration shown between the responses of vessels to ONOO^- in the absence with those in the presence of 3-aminobenzamide at 10 mM but not at 1 mM .

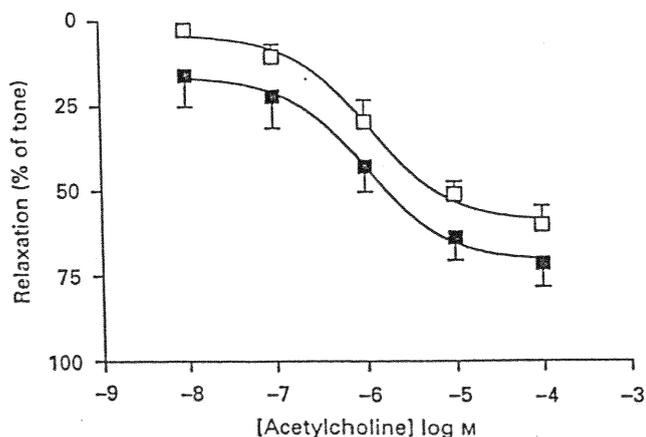


Figure 6 Effect of 3-aminobenzamide on the vasodilator actions of acetylcholine: (□) control responses; (■) responses in the presence of 3-aminobenzamide. Tissues were pre-contracted with U46619 according to the Methods section. Results are the mean of 5–6 separate experiments; vertical lines show s.e.mean.

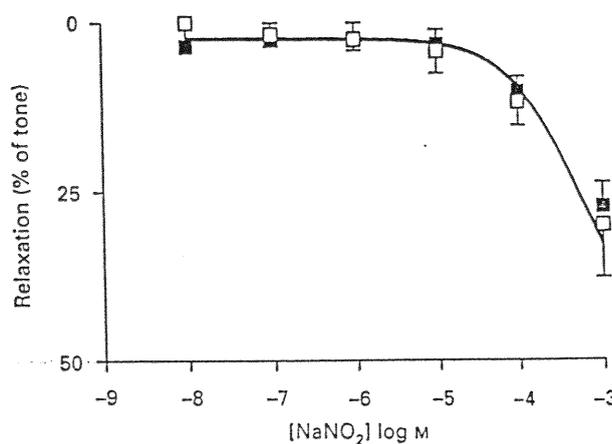


Figure 7 Effect of 3-aminobenzamide on the vasodilator actions of sodium nitrite: (□) control responses; (■) responses in presence of 3-aminobenzamide 10 mM . Tissues were pre-contracted with U46619 according to the Methods section. Results are the mean of 4 separate experiments; vertical lines show s.e.mean.

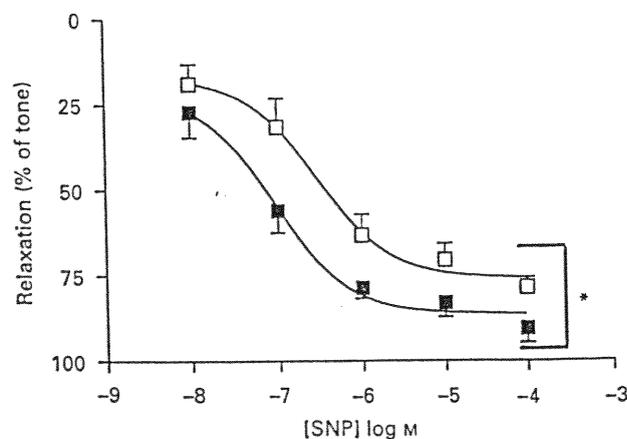


Figure 8 Effect of 3-aminobenzamide on the vasodilator actions of sodium nitroprusside (SNP): (□) control responses; (■) responses in presence of 3-aminobenzamide (10 mM). Tissues were pre-contracted with U46619 according to the Methods section. Results are the mean of 6 separate experiments; vertical lines show s.e.mean. A statistically significant difference (denoted by $*P < 0.05$) was found, by 2-way ANOVA, between control responses and those after pre-exposure to 3-aminobenzamide.

ological activity should decay with time. We found a significant loss in potency and efficacy of ONOO⁻ stored for 2 days at 4°C when compared to freshly prepared solutions, consistent with ONOO⁻ being the active component. Our solutions were produced according to the method of Beckman and co-workers (1990) by use of a starting solution of sodium nitrite. In addition, ONOO⁻ can break down to form nitrite. Thus, we felt that it was important to ensure that the effects of ONOO⁻ on pulmonary artery tone were not caused by nitrite contamination. Sodium nitrite did relax rat pulmonary artery, but, was less potent and less efficacious than ONOO⁻. Moreover, the vasodilator properties of ONOO⁻ but not sodium nitrite were inhibited by 3-aminobenzamide. Taken together, these observations establish that ONOO⁻ and not a contaminant or breakdown product was responsible for the relaxations observed in our experiments.

In the canine coronary artery, the vasodilator properties of ONOO⁻ were potentiated by SOD (Liu *et al.*, 1994), suggesting that superoxide anions were present either in the carrier solution or were released by the vessel. By contrast, we found no effect of SOD on the actions of ONOO⁻ on rat pulmonary artery. In addition, we found no effect of L-NAME on ONOO⁻, suggesting that it does not act by stimulating the endothelium to release NO.

The relaxant effects of ONOO⁻ described in this study were greatly reduced by the PARS inhibitor, 3-aminobenzamide. PARS is a nuclear enzyme that is activated after DNA damage resulting in the utilization of NAD⁺ and consequent depletion of cellular ATP (Schraufstatter *et al.*, 1986). ONOO⁻ at relatively high concentrations (1 mM) has been shown to activate the PARS pathway in vascular smooth muscle and to contribute to the hyporesponsiveness seen in rat aorta in experimental sepsis (Szabó *et al.*, 1996). Our data support this concept and show, for the first time, that the vasodilator effects of relatively low concentrations of ONOO⁻ are mediated by PARS activation. In addition, we show that 3-aminobenzamide has no effect on acetylcholine-induced relaxation, suggesting that NO *per se* does not relax pulmonary arteries via PARS. By contrast, 3-aminobenzamide actually increased the vasodilator properties of sodium nitroprusside. This suggests that sodium nitroprusside activates PARS in such a way as to reduce its biological activity.

ONOO⁻ has been described as a toxic oxidant that can cause endothelium dysfunction resulting in the inhibition of acetylcholine-induced relaxation of rat coronary vessels (Villa *et al.*, 1994). However, this effect of ONOO⁻ was not concentration-dependent since it inhibited acetylcholine responses at 3 µM and at 1000 µM, but not at 30 µM or 100 µM (Villa *et al.*, 1994). By contrast, in bovine pulmonary arteries, ONOO⁻ had

no effect on acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxations (Wu *et al.*, 1994). We found that pretreatment with ONOO⁻ actually increased the responses of pulmonary arteries to acetylcholine. Thus, in our studies ONOO⁻ did not compromise the ability of the endothelium to release and/or respond to NO. The reason why ONOO⁻ increased the response to acetylcholine is not clear. However, our study suggests that NO and ONOO⁻ relax pulmonary arteries by different mechanisms, which may be additive. Studies in other vascular preparations show that the vasodilator properties of ONOO⁻ are inhibited by oxyhaemoglobin and/or inhibitors of soluble guanylate cyclase (Liu *et al.*, 1994; Villa *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994), leading the authors to suggest that ONOO⁻ relaxes vessels by spontaneous or metabolic release of NO. However, oxyhaemoglobin may be able to bind ONOO⁻ directly, in the same way that it binds NO and thereby inhibit its actions. In addition, ONOO⁻ may, like other oxidants (see Waldman & Murad, 1987), activate soluble guanylate cyclase directly, without the involvement of NO. Thus, these observations do not necessarily contradict our hypothesis that ONOO⁻ and NO relax vascular tissue by independent mechanisms.

In conclusion, peroxynitrite relaxes rat pulmonary artery directly, at concentrations that do not cause endothelial dysfunction and without stimulating the release of NO or superoxide. Moreover, unlike endogenously-released NO (by acetylcholine), or the nitrovasodilator sodium nitroprusside; ONOO⁻ appears to cause relaxation by activation of PARS. We propose that ONOO⁻ activates PARS resulting in the depletion of cellular ATP and reducing all active processes of vascular smooth muscle, including vasoconstriction. It has been suggested that ONOO⁻ is responsible for the vascular hyporeactivity seen in experimental sepsis (Szabó *et al.*, 1996). This observation together with our finding that 3-aminobenzamide inhibits relaxations induced by ONOO⁻ but not by acetylcholine, suggests that inhibitors of PARS may reduce the persistent hypotension seen in sepsis without affecting the actions of endothelium-derived NO. This would be of particular importance to the pulmonary circulation, where septic shock is often accompanied by pulmonary hypertension. Thus, inhibitors of PARS may represent a novel therapeutic strategy in the treatment of diseases such as septic shock.

This work was supported by grants from the British Lung Foundation, the British Heart Foundation and the Medical Research Council. F.C. is supported by grants from the European Respiratory Society (ERS Scientific Research Fellowship) and the Foundation pour la Recherche Medicale. J.A.M. is supported by a Wellcome Career Development Grant.

References

- BANASIK, M., KOMURA, H., SHIMOYAMA, M. & UEDA, K. (1992). Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono (ADP-ribose) transferase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1569–1575.
- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A. & FREEMAN, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1620–1624.
- BUSSE, R. & MULSCH, A. (1990). Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **275**, 87–90.
- GENG, Y.J., HANSSON, G.K. & HOLME, E. (1992). Interferon-γ and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **71**, 1268–1276.
- KOON, N.W., ROYALL, J.A., YE, Y.Z., KELLY, D.R. & BECKMAN, J.S. (1995). Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**, 1250–1254.
- LIU, S., BECKMAN, J.S. & KU, D.D. (1994). Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 1114–1121.
- MITCHELL, J.A., KOHLASS, K.L., SORRENTINO, R., MURAD, F., WARNER, T.D. & VANE, J.R. (1993). Induction of calcium-independent nitric oxide synthase in rat mesentery during sepsis does not impair the vascular responses to vasoconstrictor agents. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 265–270.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109–141.
- MORO, M.A., DARLEY-USMAR, V.M., GOODWIN, D.A., READ, N., ZAMORA-PINO, R., FEELISCH, M., RADOWSKI, M.W. & MONCADA, S. (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6702–6706.
- PETROS, A., BENNETT, D. & VALLANCE, P. (1991). Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*, **338**, 1557–1558.
- POLLOCK, J.S., FORSTERMANN, U., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., SCHMIDT, H.H.H.W., NAKANE, M. & MURAD, F. (1991). Purification and characterisation of eDRF synthase from endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10480–10484.

- RADI, R., RODRIGUEZ, M., CASTRO, L. & TELLERI, R. (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 89–95.
- SALGO, M.G., STONE, K., SQUADRITO, G.L., ATTISYA, J.R. & PRYOR, W.A. (1995). Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 1025–1030.
- SALTER, M., KNOWLES, R.G. & MONCADA, S. (1991). Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.*, **291**, 145–149.
- SCHRAUFSTATTER, I.U., HINSHAW, D.B., HYSLOP, P.A., SPRAGG, R.G. & COCHRANE, C.G. (1986). Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.*, **77**, 1312–1320.
- SZABÓ, C., ZINGARELLI, B. & SALZMAN, A.L. (1996). Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ. Res.*, **78**, 1051–1063.
- VILLA, L.M., SALAS, E., DARLEY-USMAR, V.M., RADOMSKI, M.W. & MONCADA, S. (1994). Peroxynitrite induces both vasodilation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12383–12387.
- WALDMAN, S.A. & MURAD, F. (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* **39**, 163–196.
- WU, M., PRITCHARD, K.A.J., KAMINSKI, P.M., FAYNGERSH, R.P., HINTZE, T.H. & WOLIN, M.S. (1994). Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am. J. Physiol.*, **266**, H2108–2113.
- ZHANG, J., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. & SNYDER, S.H. (1994). Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, **263**, 687–689.

(Received November 18, 1996

Revised February 10, 1997

Accepted February 28, 1997)

PEROXYNITRITE DILATES RAT PULMONARY ARTERIES AT CONCENTRATIONS THAT DO NOT CAUSE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION. F. Chabot, J.A. Mitchell, G. Quinlan, T.W. Evans. Unit of Critical Care, National Heart and Lung Institute, Imperial College and Royal Brompton Hospital, Sydney street, London SW3 6NP, UK.

Background. Under inflammatory conditions, such as occur in septic shock, copious amounts of nitric oxide (NO) are produced by inducible NO synthase. During sepsis, the presence of large amounts of activated leukocytes results in elevated levels of superoxide anions (O_2^-) which are known to react rapidly with NO to form the potent oxidant peroxynitrite (ONOO⁻), that could contribute to endothelium dysfunction in sepsis. Since the pulmonary vasculature represents a prime site for ONOO⁻ formation, we have characterised its effects on pulmonary artery tone and on endothelial function. **Methods.** Isolated rat pulmonary arteries were cut into rings and mounted in 2 ml organ baths containing warmed (37°C) and gassed (95% O_2 :5% CO_2) Krebs buffer. Force was measured using isometric force transducers. After equilibration, ONOO⁻ was added in a cumulative manner (10^{-8} - 10^{-4} M). **Results.** ONOO⁻ had no effect on resting tone. In vessels pre-contracted with thromboxane mimetic U46619 (10^{-6} M), ONOO⁻ caused concentration-dependent relaxation with a EC_{50} of approximately 10 μ M. In separate experiments, ONOO⁻ was added 15 min before U46619. Concentration response curves to acetylcholine were then constructed. At 1 or 10 μ M, ONOO⁻ had no effect on subsequent responses to acetylcholine, but at 100 μ M, ONOO⁻ increased acetylcholine induced relaxation. **Conclusions.** ONOO⁻ is a vasodilator of rat pulmonary arteries at concentrations that do not cause vascular dysfunction. These observations detract from ONOO⁻ being a toxic species in the pulmonary vasculature. ONOO⁻ causes relaxation in the μ M range whereas NO is active in the nM range. Thus it is tempting to speculate that in conditions where NO is released in excess, ONOO⁻ formation may quench NO and limit its vasodilator actions.

This abstract is funded by: the British Lung Foundation and the British Heart Foundation.

Congrès de l'A.T.S., San Francisco, 16-21 mai 1997
Am J Respir Crit Care Med 1997, 155: A 195

CHARACTERISATION OF THE VASODILATOR PROPERTIES OF PEROXYNITRITE ON RAT PULMONARY ARTERY: ROLE OF POLY-ADP RIBOSYLTRANSFERASE. F. Chabot, J.A. Mitchell, G. Quinlan, T.W. Evans. Unit of Critical Care, National Heart and Lung Institute, Imperial College and Royal Brompton Hospital, Sydney street, London SW3 6NP, UK.

The pulmonary vasculature is exposed to oxygen species such as nitric oxide (NO) and superoxide anions (O_2^-) which can combine to form the powerful oxidant, peroxynitrite (ONOO $^-$). ONOO $^-$ activates poly-ADP ribosyltransferase (PARS). During inflammatory conditions, ONOO $^-$ may be formed in excess leading to cellular damage. We have investigated the contribution of PARS activation in the vasodilator properties of ONOO $^-$ in pulmonary artery. **Methods.** Isolated rat pulmonary arteries were cut into rings and mounted in 2 ml organ baths containing warmed (37°C) and gassed (95% O_2 :5% CO_2) Krebs buffer. Tone was induced by the addition of U46619 (10^{-5} M). After equilibration, ONOO $^-$, acetylcholine or sodium nitrite were added in a cumulative manner (10^{-8} - 10^{-4} M). In some experiments, NO synthase inhibitor N G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10^{-5} M), superoxide dismutase (SOD; 30 units ml $^{-1}$) or the PARS inhibitor 3-aminobenzamide (10^{-2} M) were added 15 min prior to U46619. **Results.** ONOO $^-$ caused concentration-dependent relaxation of pulmonary arteries. L-NAME and SOD had no effect on ONOO $^-$ response. 3-aminobenzamide significantly inhibited the relaxation caused by ONOO $^-$ but did not effect that caused by acetylcholine or sodium nitrite. **Conclusions.** ONOO $^-$ relaxes rat pulmonary artery directly, without causing release of NO or O_2^- . As 3-aminobenzamide inhibited the actions of ONOO $^-$ but not acetylcholine, this suggest that NO and ONOO $^-$ cause relaxation by independent mechanisms. We propose that ONOO $^-$ activates PARS resulting in the depletion of cellular ATP reducing all active process of vascular smooth muscle including vasoconstriction.

This abstract is funded by: the British Lung Foundation and the British Heart Foundation.

Congrès de l'A.T.S., San Francisco, 16-21 mai 1997
Am J Resp Crit Care Med 1997; 155: A 195

III - Etudes in vivo : les résistances vasculaires pulmonaires périphériques

La vasoréactivité pulmonaire périphérique a été étudiée *in vivo* par une technique originale mise au point par le Dr. Schrijen à l'Unité14 de l'INSERM. Nous décrivons la méthodologie proposée, les points spécifiques à chacune des études et les principaux résultats. Les détails méthodologiques et les résultats complets sont présentés et discutés dans les publications originales insérées au delà de la page 105.

Le premier objectif de ce travail est la mise au point d'une technique de détermination de la relation pression/débit dans le lit vasculaire pulmonaire périphérique *in vivo* (cf p. 42). Rappelons que cette nouvelle technique doit permettre de débiter l'étude de la relation pression/débit à débit nul sans interférer avec le reste de la circulation pulmonaire ou systémique et de calculer les résistances vasculaires pulmonaires périphériques (RVPP) correspondant au territoire vasculaire étudié.

Le deuxième point de ce travail est l'étude des effets de la fraction inspirée d'O₂ sur la circulation pulmonaire périphérique. Rappelons que la concentration alvéolaire en oxygène est le facteur physiologique le plus important dans le contrôle des RVP. La détermination des relations pression/débit en normoxie puis en hypoxie et inversement apporte des éléments de validation de notre méthode si le calcul des RVPP met en évidence en hypoxie une augmentation des RVPP, proportionnellement supérieure à celle des RVP, et une diminution des RVPP par le retour en normoxie.

Cette technique de détermination de la relation pression/débit dans la circulation pulmonaire périphérique inclut une angiographie du territoire vasculaire étudié. Le troisième objectif de ce travail est d'étudier avec cette technique les effets sur le lit vasculaire pulmonaire périphérique d'un produit de contraste iodé. L'injection d'un produit de contraste iodé dans la circulation pulmonaire a plusieurs conséquences. Initialement les pressions artérielles pulmonaires et auriculaire gauche augmentent (Lange *et al.*, 1984) puis dans un deuxième temps les résistances vasculaires pulmonaires et systémiques baissent (Rees *et al.*, 1988). La viscosité et l'osmolalité du produit influencent les effets vasculaires du produit de contraste (Haggmark *et al.*, 1985 ; Gomi, 1992). En raison des conséquences systémiques, l'action vasculaire

pulmonaire n'est pas bien déterminée. L'objectif de ce travail est de la préciser au niveau des petits vaisseaux pulmonaires, indépendamment de toute action systémique.

Ces trois premiers objectifs permettent de décrire la méthodologie, d'en préciser les limites et de la valider par l'observation des effets de l'hypoxie qui représente une application physiopathologique particulièrement intéressante dans le cadre de la circulation pulmonaire périphérique.

L'analyse des données de la littérature nous a permis de souligner les multiples mécanismes impliqués dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire basal et en hypoxie (cf p. 42-79). Ceci nous amène au quatrième et principal objectif de ce travail qui est l'étude par cette technique des effets de différentes drogues sur la vasoréactivité pulmonaire périphérique, indépendamment de tout effet systémique. La vasoréactivité pulmonaire est modulée par de nombreuses substances. Nous avons choisi d'étudier les effets de produits agissant sur la voie métabolique du NO comme le L-NAME, inhibiteur de la NO synthétase, le nitroprussiate de sodium qui est un donneur de NO exogène et les effets du L-NAME puis du nitroprussiate de sodium dans le même territoire. Nous avons étudié les effets d'inhibiteurs des canaux calciques et d'activateurs des canaux potassiques. Parmi les inhibiteurs des canaux calciques, nous avons étudié une phénylalkylamine, le vérapamil, deux dihydropyridines, la nifédipine et la nicardipine, et parmi les activateurs des canaux potassiques, le levcromakalim et le nicorandil. Le nicorandil a un intérêt particulier car il a au moins un double mécanisme d'action. Il augmente le taux de GMPc par un effet «nitrate-like» et augmente la conductance membranaire potassique en ouvrant les canaux potassiques dépendants de l'ATP. Nous nous sommes intéressés aussi aux effets d'un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, l'urapidil et à l'action de l'almitrine qui est une substance douée de propriétés vasoactives sur la circulation pulmonaire mais dont le mécanisme d'action est encore hypothétique.

L'effet de la plupart des drogues a été étudié en normoxie et en hypoxie. Pour mieux juger d'un éventuel effet vasodilatateur et en préciser le mécanisme, le tonus vasomoteur pulmonaire a été augmenté, dans certains cas, en sus ou à la place du stimulus hypoxique, par un agent vasoconstricteur (L-NAME, almitrine) dont nous avons démontré auparavant l'action vasoconstrictrice sur la circulation pulmonaire périphérique.

1 - Méthodes

L'étude est réalisée chez 14 chiens, type beagle, d'un poids moyen de $23,7 \pm 0,7$ kg. L'anesthésie est induite par injection intraveineuse d'une dose initiale de thiopental et maintenue par l'administration intraveineuse continue de thiopental par un pousse-seringue automatique. Les chiens sont intubés avec une sonde trachéale à ballonnet et ventilent spontanément. La ventilation est monitorée avec un pneumotachographe de Fleisch n°1, l'oxygène expiré avec un analyseur Servomex et le dioxyde de carbone (CO₂) expiré avec un CO₂ test (Jaeger). Dans des conditions stériles, un cathéter artériel fémoral est mis en place par voie percutanée pour l'étude de la pression artérielle systémique et des gaz du sang ; une veine jugulaire externe est dénudée, puis canulée avec deux cathéters : un cathéter de thermodilution conventionnel de Swan-Ganz avec une lumière proximale à 20 cm de l'extrémité distale et un cathéter spécial avec une double lumière au niveau de l'extrémité (American Edwards Laboratories). Les deux cathéters sont avancés dans l'artère pulmonaire sous contrôle radiologique, des pressions vasculaires et de l'électrocardiogramme. L'extrémité du cathéter de thermodilution conventionnel est avancée jusqu'au moment où une pression capillaire peut être obtenue par le gonflement du ballonnet (la lumière proximale est alors située dans l'oreillette droite). Le cathéter à double lumière distale est avancé jusqu'au moment où il se bloque dans une artère pulmonaire périphérique.

Les cathéters sont périodiquement rincés avec du sérum hépariné. Les pressions vasculaires, mesurées avec des manomètres à inductance, et l'électrocardiogramme sont suivis sur un oscilloscope et enregistrés. Les capteurs de pression sont placés 5 cm au-dessus du plan de la table. Seules les pressions moyennes sont prises en compte ; elles sont obtenues par une intégration électronique sur 3 cycles respiratoires. Un étalonnage statique est fait après chaque expérience avec un manomètre à mercure.

Les pressions artérielle pulmonaire, capillaire pulmonaire, auriculaire droite et le débit cardiaque sont mesurés avec le cathéter de Swan-Ganz. Après avoir bloqué le cathéter à double lumière dans une artère pulmonaire distale, une de ses lumières est connectée à un capteur de pression et l'autre à une pompe à galets (ISMATEC), pour déterminer la relation pression/débit.

Le sang veineux mêlé est prélevé dans l'artère pulmonaire par l'intermédiaire de la sonde de Swan-Ganz, ballonnet dégonflé, reliée à la pompe, et injecté dans le territoire bloqué (Fig 11). Les cathéters sont remplis de sang et la pression capillaire de référence est mesurée, puis la pompe est démarrée. Le débit est augmenté par étapes de 0 à 9 ml/min au maximum, puis diminué de façon symétrique ; chaque débit est maintenu pendant au moins 3 cycles respiratoires et la pression est mesurée à la fin de chaque période. Quand la courbe pression/débit est terminée, du produit de contraste est injecté doucement dans le cathéter bloqué jusqu'à ce que les veines de drainage soient visualisées (Fig 12). Le volume du produit de contraste injecté est considéré comme une mesure du volume vasculaire du territoire bloqué. Selon l'orientation de l'artère périphérique par rapport à celle du cathéter, l'artère est dénommée «coaxiale» si l'orientation est la même ou latérale dans les autres cas.

La courbe pression/débit est déterminée dans 2 à 4 sites chez chaque chien, selon les possibilités de blocage du cathéter. Dans 14 cas, la courbe pression/débit est refaite dans le même territoire après avoir rincé le cathéter avec du sérum salé physiologique. Dans ces cas, l'angiographie est faite après la deuxième courbe en raison des effets potentiels du produit de contraste sur les vaisseaux étudiés.

A la fin de chaque expérience, le cathéter à double lumière distale est retiré. Du sang est prélevé de l'artère pulmonaire par l'intermédiaire du cathéter de Swan-Ganz pour étalonner la pompe avec un chronomètre et un tube gradué. Ceci est réalisé en mesurant le volume de sang recueilli en 30 secondes ou 1 minute avec les différentes vitesses programmées de la pompe à galets.

Plusieurs variables dérivées sont déterminées ensuite. La pression de perfusion (PP) durant la courbe de débit est la différence entre la pression capillaire bloquée mesurée (avec le cathéter à double lumière) à un débit déterminé et la pression capillaire pulmonaire de référence mesurée à débit nul.

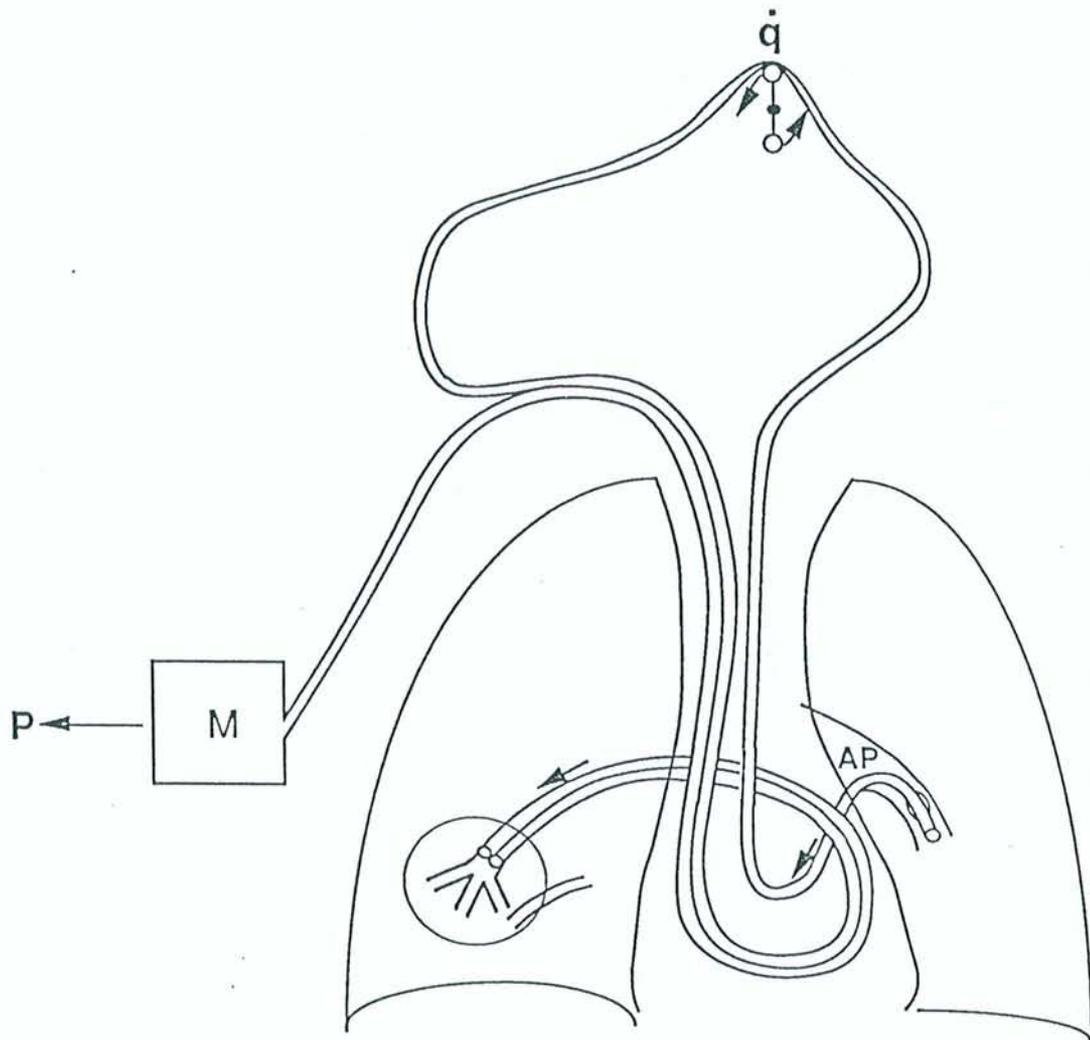


Fig 11 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : préparation

AP : artère pulmonaire, \dot{q} : débit à la pompe, M : manomètre, P : pression. Le cathéter à ballonnet de Swan-Ganz flotte librement dans l'artère pulmonaire ; le cathéter à double lumière est bloqué dans une artère pulmonaire périphérique. Du sang veineux mêlé est prélevé dans l'artère pulmonaire et perfusé à un débit déterminé dans l'artère pulmonaire périphérique étudiée.

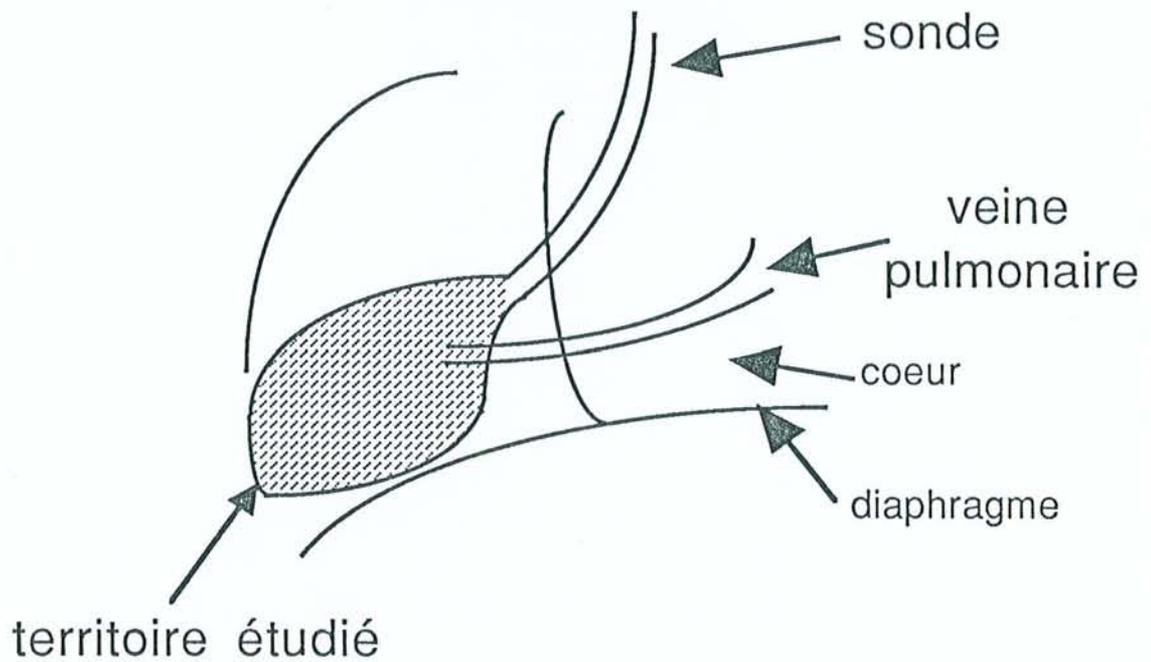
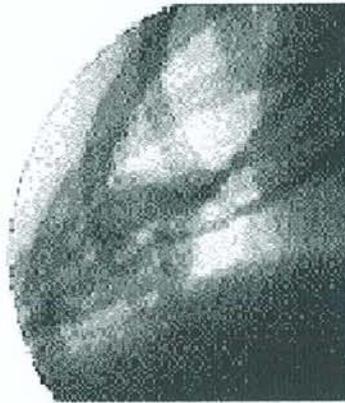


Fig 12 : Angiogramme d'un territoire pulmonaire périphérique

Après la réalisation de la courbe pression/débit, le produit de contraste (ioxaglate de sodium et de méglumine) est injecté doucement dans le cathéter bloqué jusqu'à ce que les veines de drainage soient visualisées. Le volume du produit de contraste injecté est considéré comme une mesure du volume vasculaire du territoire bloqué. L'artère est coaxiale.

Les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) sont déterminées par la formule suivante : $RVP = 80 \times (\bar{P}_{ap} - \bar{P}_{cp}) / \dot{Q}$

où les pressions sont exprimées en mmHg, le débit en l/min et les RVP en dyn s cm^{-5} .

Les résistances vasculaires pulmonaires périphériques (RVPP) sont calculées en appliquant la même formule pour la courbe locale pression/débit avec une pression de perfusion déterminée arbitrairement pour un débit de 5 ml/min.

L'hystérésis (ou différence de pression mesurée à un même débit lors de l'augmentation puis de la diminution du débit) a été estimée par la différence de pression de perfusion entre les courbes ascendante et descendante de la courbe pression/débit, arbitrairement mesurée à un débit de 7 ml/min ou plus bas si ce débit n'est pas atteint.

L'ordonnée à l'origine est la pression de perfusion à débit nul, calculée en extrapolant la partie initiale de la courbe jusqu'à 0. L'ordonnée à l'origine correspond à la pression critique d'ouverture.

2 - Principaux résultats de l'étude des RVPP

La relation pression/débit a été déterminée dans 59 territoires. L'angiographie permet de mesurer le volume du territoire bloqué ($0,75 \pm 0,05$ ml) et de visualiser la position du cathéter par rapport à l'artère principale du territoire. Dans les territoires où l'artère distale et le cathéter ont la même orientation ("artère coaxiale"), la courbe pression/débit moyenne a une ordonnée à l'origine pratiquement nulle et l'hystérésis est négligeable. L'angiographie révèle une position latérale de l'artère principale par rapport au cathéter dans 11 cas. Les courbes pression/débit et les variables dérivées correspondantes sont significativement plus élevées que celles obtenues avec une artère "coaxiale".

Seules sont étudiées les relations pression/débit obtenues dans des territoires avec des artères coaxiales. La pente de la partie initiale de la courbe ascendante définit la RVPP. Il n'y a pas de corrélation entre les RVPP et les RVP globales et les RVPP varient d'un site à l'autre chez un même chien. En moyenne, elles sont mille fois plus élevées que les RVP globales. Les

RVPP sont inversement corrélées au volume du territoire bloqué et directement avec l'ordonnée à l'origine et l'hystérésis. Les résultats de 2 courbes pression/débit consécutives réalisées dans le même territoire sont similaires, la différence étant de l'ordre de l'erreur de la mesure (environ 1 mmHg).

B - Effets de l'hypoxie (Schrijen *et al.*, J Appl Physiol 1993; 74: 613-616)

1- Méthodes

Une hypoxie est provoquée chez 4 chiens par l'inhalation d'un mélange hypoxique avec une fraction inspirée d'O₂ à 0,10 et de CO₂ à 0,03. Le mélange gazeux est administré par l'intermédiaire d'une valve qui empêche la réinhalation des gaz expirés. Après une 1ère courbe en normoxie, la courbe pression/débit est répétée dans le même territoire après 10 min de ventilation hypoxique. Durant ce temps, un débit sanguin est maintenu dans le territoire bloqué par l'intermédiaire de la pompe à galets. La normoxie est la première période dans 2 cas et l'hypoxie la première période dans 3 cas. L'angiographie du territoire est toujours réalisée à la fin de la deuxième période.

2- Résultats

L'hypoxie (PaO₂ = 36 ± 0,9 mm Hg; PaCO₂ = 39 ± 1 mmHg) induit une augmentation des RVP à 260 dyn s cm⁻⁵, soit une variation de 48%. Au cours de l'hypoxie, il existe une augmentation significative des RVPP (+71%). Aucune différence n'est observée entre les territoires où les mesures sont effectuées d'abord en normoxie ou en hypoxie.

Les résultats sont détaillés et discutés dans la publication insérée après cette page.

Peripheral pulmonary vascular resistance

F. SCHRIJEN, C. SAUNIER, AND F. CHABOT

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 14, 54511 Vandoeuvre Cédex, France

SCHRIJEN, F., C. SAUNIER, AND F. CHABOT. *Peripheral pulmonary vascular resistance*. *J. Appl. Physiol.* 74(2): 613-616, 1993. —The pressure-flow relationship has been studied in a peripheral portion of the lung vasculature in anesthetized dogs with use of a double-lumen catheter wedged in a distal pulmonary artery. One lumen was used to infuse mixed venous blood in the wedged area and the other to measure the corresponding perfusion pressure. Flow ranged from 0 to 9.2 ml/min, and the mean volume of the wedged area ($n = 59$) was 0.75 ± 0.05 (SE) ml. In the areas where the distal pulmonary artery was in the same direction as the catheter ("coaxial"), the mean pressure-flow curve showed a negligible y -intercept and no significant difference between ascending and descending flow. The slope of the initial part of the ascending limb (peripheral pulmonary vascular resistance) varied from site to site and did not show a significant correlation with the overall pulmonary vascular resistance; it was inversely correlated with the volume of the wedged area ($r = -0.35$, $P < 0.05$) and directly, as expected, correlated with the y -intercept ($r = 0.78$, $P < 0.0001$) and hysteresis ($r = 0.48$, $P < 0.001$). The results of two consecutive pressure-flow runs in the same site showed similar results, with no difference exceeding the error of measurement. In contrast, the slope increased by 71% during hypoxia (fraction of inspired O_2 was 0.10, $n = 5$). This procedure seems suitable to determine the effects of physiological or pharmacological interventions on the pulmonary vessels, without interference of the systemic circulation.

pulmonary circulation; anesthetized dogs; closed chest; hypoxia; pressure-flow relationship; wedge pressure

SEVERAL AUTHORS studied the relationship between pressure and flow in the pulmonary circulation for the entire vascular bed in situ (e.g., 3), for isolated lungs (10), for isolated lobes (2), and for lobes in situ (5). It is usually taken as linear for the most part, but for low flows a "critical closing pressure" may be observed. When flow is decreased in an intact preparation, it is difficult to maintain the other variables constant. If oxygen consumption stays unchanged, for instance, oxygen content in the pulmonary arteries will decrease with the decrease in flow. We designed a technique to determine the pressure-flow relationship in the peripheral pulmonary vascular bed, where flow could be modified without interfering with the rest of the pulmonary or systemic circulation, and starting from zero flow. This technique could be useful to study the effects of physiological or pharmacological interventions on the pulmonary vascular bed.

MATERIALS AND METHODS

The results were obtained from 14 dogs weighing 23.7 ± 0.7 (SE) kg. Anesthesia was induced with an initial

dose of thiopental (20 mg/kg iv) and maintained by slow-rate infusion ($14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) with an electric syringe (Vial SE 400). The dogs were intubated with a cuffed tracheal cannula; they breathed spontaneously. Ventilation was monitored with a Fleisch pneumotachograph no. 1. Expired O_2 was monitored with Servomex analyzer, and expired CO_2 with a CO_2 test (Jaeger, Würzburg, Germany). Under sterile conditions, an external jugular vein was cannulated with two catheters: a conventional Swan-Ganz thermodilution catheter with the proximal lumen opening at 20 cm from the tip and a 7F custom-made balloon catheter with both lumens extending to the tip (part no. 600518 model, American Edwards Laboratories). Both catheters were advanced, under X-ray, pressure, and electrocardiogram (ECG) control, into the pulmonary artery. The thermodilution catheter tip was advanced until a wedge pressure could be obtained by balloon inflation (the proximal lumen was then in the right atrium). The double-lumen catheter was advanced until it wedged itself in a peripheral pulmonary artery, i.e., when the internal diameter was equal to the external diameter of the catheter (2.3 mm).

The catheters were periodically flushed with heparinized saline (1 ml heparin, i.e., 5,000 IU, in 500 ml saline). The vascular pressures were measured with inductance manometers, monitored together with ECG on an oscilloscope (Telco), and a Gould 3600 recorder. The transducers were placed 5 cm above the table plane. Only mean pressures were taken into account, and they were obtained by electronic filtering over three respiratory cycles. Static calibration was checked after each experiment with a mercury manometer.

Pulmonary arterial, pulmonary wedge, and right atrial pressures, as well as cardiac output, were measured with the Swan-Ganz catheter. After wedging the double-lumen catheter in a distal pulmonary artery, an attempt at blood sampling was performed with a syringe. The ease of blood sampling was ranked from zero (no blood) to two (easy sampling). To determine the pressure-flow curve, one lumen of the double-lumen catheter was connected with a pressure transducer and the other one with a peristaltic pump (Ismatec, Zurich, Switzerland). Blood was withdrawn through the pump from the distal lumen of the thermodilution catheter, which was lying free in the pulmonary artery. The catheters were primed with blood, and the reference wedge pressure was measured. The pump was then started and mixed venous blood was infused into the wedged catheter. The flow was increased by steps from 0 to 9.2 ml/min and then decreased symmetrically; each flow was maintained for three respiratory cycles or more, and the pressure was measured at the end of that period.

TABLE 1. Characteristics of the pressure-flow curve according to the wedge angiogram

	Pulmonary Artery Axis		P
	Coaxial	Lateral	
PPVR/10 ³ , dyn · s · cm ⁻⁵	138±16	405±73	<0.0001
DP flow, ml/min	9.2±1.0	2.4±0.7	<0.01
y-Intercept, mmHg	1.6±0.6	7.7±1.9	<0.001
Zero-flow P _{diff} , mmHg	-0.4±0.2	-1.5±0.8	<0.05
Hys, mmHg	-0.1±0.5	1.9±2.4	

Values are means ± SE of 48 coaxial and 11 lateral axes. PPVR, peripheral pulmonary vascular resistance; DP, driving pressure; zero-flow P_{diff}, difference between the wedge pressure measured at the end and start of the pressure-flow run; Hys, hysteresis, pressure difference between the ascending and descending limb of the pressure-flow curve (see MATERIALS AND METHODS). y-Intercept was computed from the ascending part of the pressure-flow relationship.

After the pressure-flow run had been completed, contrast medium was slowly infused into the wedged catheter until the draining vein was visualized. The volume infused was taken as a measurement of the volume of the wedged area; the wedge angiogram was recorded.

The pressure-flow curve was determined in two to four different sites in an individual dog, according to the possibility of wedging the catheter in different places. In 14 instances, after flushing the pressure lumen with saline, the pressure-flow curve was repeated in the same site. In these cases, the angiogram was performed after the second run because of the possible drug effect on the vessels studied.

In four more dogs (5 sites), the results were compared with those observed during hypoxia: the dogs inhaled a hypoxic mixture with fraction of inspired O₂ of 0.10 and fraction of inspired CO₂ of 0.03, administered from a bag through a nonbreathing valve. The pressure-flow curve was repeated after 10 min hypoxic ventilation. During this time, blood flow was maintained in the wedged area. Normoxia was the first period in two cases, and hypoxia was the first period in the remaining three cases. The angiogram was always performed at the end of the procedure.

At the end of the experiment, the special catheter was withdrawn and blood was sampled from the pulmonary artery via the thermodilution catheter to calibrate the pump with a stop-watch and a graduated tube.

Derived variables. The perfusion pressure (PP) during the flow runs was taken as the difference between the actual wedge pressure and the wedge pressure measured at zero flow. Overall pulmonary vascular resistance (PVR) was computed as 80 (pulmonary arterial - wedge pressure, mmHg)/cardiac output (l/min). Peripheral PVR (PPVR) was determined applying the same formula to the local pressure-flow curve, with the PP taken at 5 ml/min flow. Flow at driving pressure (DP) was determined from the local pressure-flow curve, the flow observed when the PP was equal to the overall DP, i.e., pulmonary arterial - wedge pressure. The pressure-flow relationship was extrapolated when needed.

Hysteresis is the PP difference between the ascending and descending limbs of the pressure-flow curve, and was arbitrarily measured at 7.0 ml/min flow or lower in the few cases this flow was not reached.

Statistics. Differences between groups were tested by variance analysis, differences between periods were assessed by paired *t* tests, and relationships between variables were assessed by least-squares regression analysis (11). All values are expressed as means ± SE.

RESULTS

The pressure-flow relationship could be determined in 59 sites. Flow was increased up to 9.0 ml/min in 45 cases; in the other sites the pressure increase exceeded 50 mmHg, and flow was stopped before. Maximum flow was 8.2 ml/min in seven sites, and 6.6 ml/min in six sites. The perfusion pressure became very high at the start in the last case, and no measurements could be performed.

Blood gases and hemodynamic values during normoxia were within normal limits: arterial PCO₂ (Pa_{CO2}) was 39.3 ± 0.5 Torr, arterial PO₂ (Pa_{O2}) was 84.0 ± 1.3 Torr, pulmonary arterial pressure was 19.2 ± 0.5 mmHg, wedge pressure was 7.5 ± 0.3 mmHg, right atrial pressure was 3.9 ± 0.3 mmHg, and PVR was 228 ± 12 dyn · s · cm⁻⁵. Ventilation was 5.2 ± 0.3 l/min, and breathing frequency was 19.7 ± 1.2 breaths/min. During hypoxia (*n* = 5), Pa_{CO2} stayed unchanged, Pa_{O2} was 36 ± 0.9 Torr, and PVR increased by 260 dyn · s · cm⁻⁵.

The volume of the wedged area was 0.75 ± 0.05 ml. The wedge angiogram showed a lateral position of the main artery with respect to the catheter in 11 (of 59) cases. The corresponding pressure-flow curves were significantly different from the coaxial ones, with respect to the PPVR, flow at DP, and y-intercept of the ascending part (Table 1). Also, the zero-flow pressure tended to be higher after the flow run than before in the lateral sites. The mean curve for the 42 normal sites with a maximum flow of 9.2 ml/min is shown in Fig 1. The mean regression was of the form PP = 0.002 + 1.52 flow, with a correlation coefficient of 0.997 for the ascending part, and PP = 0.079 + 1.48 flow for the descending part. Both parts could thus be considered as linear with a zero origin and a similar slope. The flow corresponding to the mean DP (11.7 mmHg) would be 8 ml/min.

A significant y-intercept (>2 mmHg) was present in 30% of the curves in the coaxial sites, and in 70% of the lateral sites. No blood could be sampled from the wedged catheter in 19 cases, it was difficult to sample in nine cases, and was easy in 10. Variance analysis showed a

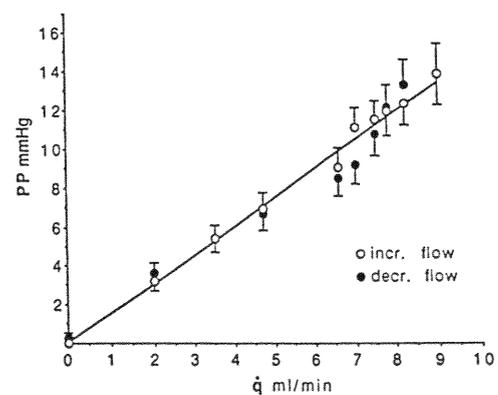


FIG. 1. Mean pressure-flow curve from 42 coaxial sites with a maximal flow of 9.2 ml/min. Regression line is shown. PP, perfusion pressure; Q, pump flow.

significant relationship with the volume of the wedged area ($F = 5.72$, $P < 0.01$) with PPVR ($F = 6.36$, $P < 0.01$) and highly significant with DP flow ($F = 21.75$, $P < 0.0001$).

The results of two consecutive runs in the same site are shown in Table 2. The mean difference in PPVR as well as in DP flow was 14% of the first value. The variance analysis did not show a significant difference between periods. The pressure difference for the highest flows was < 1.5 mmHg, which can be considered as the error of measurement of the pressure difference.

There was no correlation between PPVR and the overall PVR, and PPVR varied from site to site in an individual dog. Both PPVR and DP flow showed significant correlations with the volume of the wedged area: $r = -0.35$ ($P < 0.05$) and 0.51 ($P < 0.001$), respectively, for the coaxial sites. The y -intercept and the hysteresis showed a positive correlation with PPVR: $r = 0.78$ ($P < 0.0001$) and 0.48 ($P < 0.001$), respectively. The y -intercept was observed in the regions with high resistance and low volume, where no blood could be sampled from the wedged catheter.

Table 3 shows the results during hypoxia: there was a statistically significant increase in PPVR and in the initial slope. No difference was observed between the sites where the measurements were performed first during normoxia or hypoxia.

DISCUSSION

To determine the pressure-flow relationship in the peripheral pulmonary vascular bed, we used the infusion of mixed venous blood into a catheter wedged in a distal pulmonary artery. During this procedure, the rest of the pulmonary vascular bed was under normal conditions, and the overall pressures were unchanged. In preliminary experiments (9), using saline, we observed no alteration in the vascular pressures reflecting the whole pulmonary circulation during the infusion. In particular, the downstream pressure, which was considered as constant, was monitored by wedging the thermodilution catheter with balloon inflation in a proximal pulmonary artery. This pressure, similar to left atrial pressure, did not vary during saline infusion, although the maximal flow (60 ml/min) was much higher than in the present study. As expected from the difference in viscosity (6), the slope of the pressure-flow relationship was much higher with blood than with saline. In the present study, the physical relationships between the wedged area and the adjacent structures were probably unchanged: the wedge angiograms, although requiring high infusion pressures be-

TABLE 2. Results of two consecutive pressure-flow runs in 14 lung regions

	First Run	Second Run
PPVR/ 10^3 , dyn \cdot s \cdot cm $^{-5}$	122 \pm 20	139 \pm 19
DP flow, ml/min	7.3 \pm 1.3	6.2 \pm 1.0
Zero-flow P_{diff} , mmHg	-1 \pm 0.5	-0.9 \pm 0.2
Hys, mmHg	0.9 \pm 0.6	0.8 \pm 0.6
Asc slope	1.43 \pm 0.06	1.54 \pm 0.08

Values are means \pm SE. Asc slope, slope of the pressure-flow curve with increasing flow. None of these differences was significant.

TABLE 3. Comparison of the pressure-flow curves characteristics in five sites during normoxia and hypoxia

	Normoxia	Hypoxia
PPVR/ 10^3 , dyn \cdot s \cdot cm $^{-5}$	137 \pm 25	233 \pm 17*
y -Intercept, mmHg	1.0 \pm 0.2	1.8 \pm 0.7
Zero-flow P_{diff} , mmHg	0 \pm 0.5	-0.6 \pm 0.4
Hys, mmHg	2.2 \pm 1.8	4.6 \pm 1.4
Asc slope	1.7 \pm 0.3	2.9 \pm 0.6†

Values are means \pm SE. * $P < 0.01$; † $P < 0.02$.

cause of the high viscosity of the contrast agent, did not show any leak toward the adjacent parenchyma. To keep the conditions in the wedged area close to normal during the interval between flow runs, a normal driving pressure was maintained by mixed venous blood infusion.

Provided the wedged artery was in the same axis as the catheter, the pressure-flow was mostly linear with a zero origin, and without hysteresis, it could then be expressed by its slope. This would no longer be the case with a y -intercept: the slope then can only be computed from two different pressure-flow points at least, as pointed out by Lodato et al. (7). The DP flow corresponds to the blood flow going normally to the wedged area. It was closely linked to PPVR, but it showed better correlations with the other variables, perhaps because it is a more physiological value.

The estimation of the wedged volume was certainly approximate. The contrast medium was of high viscosity, and it needed high pressure to be infused; this could have distended the vessels in the wedged area. The infusion was stopped as soon as the pulmonary veins could be seen, which could depend on geometric factors. Nevertheless, the values obtained by this method were in good correlation with other variables.

We did not find in the literature absolute values of the PPVR in intact lungs in situ, but the values we obtained do not seem unreasonable. The mean volume of the vessels downstream the wedged catheter, according to our measurements, was 0.75 ml, i.e., $\sim 3 \times 10^{-3}$ of the pulmonary blood volume of these dogs (8), and the corresponding DP flow was 8.0 ml/min, which is of the same order of magnitude with respect to cardiac output. The vascular resistance computed from the pressure-flow curves was $\sim 1,000$ times the overall PVR, but because the large pulmonary vessels, with low resistance, were excluded, this ratio is of little value. Unlike the technique used by Bain (1) and by Swan (12), our procedure did not include the catheter resistance because the pressure was measured at the site of infusion.

The technique was reproducible, with a mean variation in PPVR between consecutive runs of 14%. The changes from normoxia to hypoxia, however, were much larger (71%). It thus seems that this technique could quantitatively analyze the effect of physiological or pharmacological interventions. The relative increase in PPVR was higher than that of the overall PVR (48%), probably because the proportion of constricting vessels is higher when the large pulmonary arteries are excluded.

The procedure described here could be simplified for comparisons between different situations, after physiological or pharmacological interventions, by using one

flow only, as in the Hyman technique (4). But care should be taken to determine first whether the pressure-flow relationship would be linear and going through the origin. An increase in PPVR could be accompanied by a change in the shape of the curve, because even in the present study, under natural conditions, the sites with high resistance tended to show a y-intercept and hysteresis. These variables increased during hypoxia, although not significantly.

Our results show that the pressure-flow relationship can be determined in intact anesthetized dogs, starting from zero flow, without interference on the overall pulmonary or systemic circulation. The procedure seems suitable to study physiological or pharmacological interventions, but the pressure-flow curve needs to be compared in the same site because the PPVR varied widely from one place to another because of local variations such as differences in the volume of the wedged vascular bed.

The authors thank F. Poincelot for skillful assistance, B. Clément for typing the manuscript, and M. C. Rohrer for drawing the figure.

Address for reprint requests: F. Schrijen, INSERM Unité 14, Plateau de Brabois, C.O. n°10, 54511 Vandoeuvre Cédex, France.

Received 9 March 1992; accepted in final form 8 September 1992.

REFERENCES

1. BAIN, W. H., J. R. LANCASTER, R. H. EVANS, F. G. SCHOENFELD, P. V. MOULDER, AND W. E. ADAMS. Perfusion of the wedged pulmonary artery catheter as a method of assessing pulmonary vasomotion. *Dis. Chest* 43: 50-56, 1963.
2. FOWLER, K. T., J. B. WEST, AND M. C. F. PAIN. Pressure-flow characteristics of horizontal lung preparations of minimal height. *Respir. Physiol.* 1: 83-93, 1966.
3. FRITTS, H. W., AND A. COURNAND. Physiological factors relating pressure, flow and distribution of blood in the pulmonary circulation. In: *Pulmonary Circulation*, edited by W. R. Adams and I. Veith. New York: Grune & Stratton, 1959, p. 62-68.
4. HYMAN, A. L., W. C. WOOLVERTON, P. S. GUTH, AND H. ICHINOSE. The pulmonary vasopressor response to decreases in blood pH in intact dogs. *J. Clin. Invest.* 50: 1028-1043, 1971.
5. KADOWITZ, P. J., H. L. LIPPTON, J. A. BELLIAN, AND A. L. HYMAN. Nisoldipine inhibits vasoconstrictor responses in the cat pulmonary vascular bed. *J. Appl. Physiol.* 66: 2885-2890, 1989.
6. LOCKHART, A., AND A. BENIS. Influence of rheology of perfusate on pressure-flow curves in isolated lung lobe of the dog. *Prog. Respir. Res.* 5: 61-75, 1969.
7. LODATO, R. F., J. R. MICHAEL, AND P. A. MURRAY. Multipoint pulmonary vascular pressure-cardiac output plots in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 249 (*Heart Circ. Physiol.* 18): H351-H357, 1985.
8. MILNOR, W. R. *Hemodynamics* (2nd ed.). Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1989.
9. SCHRJEN, F., C. SAUNIER, AND A. HENRIQUEZ. Pressure-flow relationship in the peripheral pulmonary circulation in dogs during normoxia and hypoxia (Abstract). *IUPS Proc.* 17: 508, 1989.
10. SHOUKAS, A. A. Pressure-flow and pressure-volume relations in the entire pulmonary vascular bed of the dog determined by two-port analysis. *Circ. Res.* 37: 809-818, 1975.
11. SNEDECOR, G. W., AND W. G. COCHRAN. *Statistical Methods*. Ames: Iowa State Univ. Press, 1967.
12. SWAN, H. J. C., G. R. DUMONT, AND A. H. KITCHIN. Relationship of pressure and flow in perfused pulmonary wedge segments in man (Abstract). *Circulation* 24: 1053, 1961.

C- Effets de la perfusion d'un produit de contraste iodé : ioxaglate de sodium et de méglumine (ioxaglate). (Chabot *et al.*, Can J Physiol and Pharmacol 1997a; 75: 15-18)

1- Méthodes

L'étude a été réalisée chez 9 chiens. Après réalisation d'une courbe pression/débit dans des conditions identiques à celles décrites pour la détermination des RVPP, une angiographie du territoire bloqué est réalisée avec de l'ioxaglate de sodium et de méglumine pour mesurer le volume du territoire bloqué. Le territoire est rincé par l'injection de 10 ml de sérum salé isotonique et une deuxième courbe pression/débit est réalisée 5 min plus tard.

La courbe pression/débit est réalisée dans 2 à 4 territoires chez chaque chien, 23 territoires au total (courbe I₁). Dans 11 cas après l'angiographie, le débit de la pompe n'a pas atteint la valeur maximum en raison d'une élévation importante de la pression de perfusion. Dans 7 cas, une deuxième courbe pression/débit après ioxaglate (courbe I₂) est répétée 2 minutes plus tard.

2- Résultats

Les caractéristiques de la courbe pression/débit sont modifiées par l'injection d'ioxaglate. Les RVPP doublent. L'hystérésis et l'ordonnée à l'origine augmentent significativement. Quand la courbe pression/débit est terminée, la pression bloquée retourne à la valeur de contrôle mais la pression bloquée mesurée avant le début de la courbe est plus élevée que les valeurs de contrôle. Les différences entre contrôle et ioxaglate sont comparées aux différences entre 2 courbes contrôles consécutives. Pour les courbes contrôles, les différences sont de faible amplitude et non significatives. Il n'y a pas de différence dans les caractéristiques des 2 courbes I₁ et I₂, hormis la pression bloquée de référence qui retourne à la valeur contrôle pour la courbe I₂.

Les résultats sont détaillés et discutés dans la publication insérée au delà de cette page.

Changes in peripheral pulmonary vascular resistance after ioxaglate infusion in anesthetized dogs

F. Chabot, C. Saunier, and F. Schrijen

Abstract: The pulmonary vascular resistance in a peripheral portion of the pulmonary vascular bed can be determined with a catheter wedged in a peripheral branch of the pulmonary artery, from the pressure increase induced by infusion of mixed venous blood at known flow rates. The volume of the wedged vascular bed can be estimated during fluoroscopy, from the volume of a contrast agent infused until the corresponding pulmonary vein can be seen. The present work was undertaken to determine the possible influence of this maneuver on the peripheral pulmonary vascular resistance (PPVR). In anesthetized dogs, after a control flow run, Hexabrix (meglumine ioxaglate and sodium ioxaglate) was infused, then the catheter was flushed with saline, and another flow run was performed. There was no significant difference between two consecutive control runs in the same site ($n = 14$). Before Hexabrix ($n = 23$), PPVR was $162 (\pm 24) \times 10^3 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$ (1 dyn = 10 μN) during the control run; it increased to $339 (\pm 33) \times 10^3 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$ after Hexabrix ($p < 0.001$). These results show that care should be taken to avoid interference between Hexabrix and the results of physiological or pharmacological interventions with this technique.

Key words: anesthetized dogs, contrast medium, peripheral pulmonary vascular resistance, pressure–flow relationship, pulmonary circulation.

Résumé : On peut déterminer la résistance dans une partie du lit vasculaire pulmonaire en bloquant un cathéter dans une branche périphérique de l'artère pulmonaire, puis en mesurant l'augmentation de pression induite par une perfusion de sang veineux mêlé à débits connus. Le volume du lit vasculaire bloqué peut être estimé par radioscopie, à partir du volume d'un agent de contraste perfusé jusqu'à ce que la veine pulmonaire correspondante soit visualisée. Le présent travail a été effectué pour déterminer l'influence possible de cette intervention sur la résistance vasculaire pulmonaire périphérique (RVPP). Chez des chiens anesthésiés, une perfusion témoin a été suivie d'une perfusion d'Hexabrix (ioxaglate de sodium et de méglumine), puis le cathéter a été purgé avec une solution physiologique salée, et une autre perfusion a été effectuée. Il n'y a pas eu de différence significative entre deux perfusions témoins consécutives au même site ($n = 14$). Durant la perfusion témoin précédant celle d'Hexabrix, la RVPP était de $162 (\pm 24) \times 10^3 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$; après la perfusion d'Hexabrix ($n = 23$), la RVPP a augmenté à $339 (\pm 33) \times 10^3 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$ ($p < 0,001$). Ces résultats indiquent que des mesures doivent être prises pour éviter que l'Hexabrix n'interfère avec les résultats d'interventions pharmacologiques ou physiologiques utilisant cette technique.

Mots clés : chiens anesthésiés, résistance vasculaire pulmonaire périphérique, relation pression–débit, circulation pulmonaire. [Traduit par la Rédaction]

Introduction

A technique has been developed to determine the pressure–flow relationship, and thus pulmonary vascular resistance, in a small area of the pulmonary circulation (Schrijen et al. 1993). Since resistance is related to volume, we measured the volume of the lung portion examined by fluoroscopy, from the volume of a contrast agent infused until the corresponding pulmonary vein could be seen. The present study was undertaken to determine whether the contrast agent could influence the pressure–flow relationship in the pulmonary vessels; bolus injection of

contrast media has been shown to yield various effects on the pulmonary circulation. A transient increase in pulmonary arterial and left atrial pressures has been described (Lange et al. 1984; Tajima et al. 1991), as well as a decrease in pulmonary (Peck et al. 1983) and systemic vascular resistance (Egashira et al. 1989). In vitro, both vasoconstriction and vasodilatation have been observed (Karstoft and Baath 1995).

Materials and methods

Nine dogs, weighing $14.9 \pm 0.3 \text{ kg}$ (mean \pm SEM), were used in the study. All experiments were performed according to the Canadian Council on Animal Care guidelines. Anesthesia was induced with an initial dose of $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ thiopental i.v., and maintained by slow-rate infusion ($14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), with an electric syringe (Vial SE 400, Vial, France). The dogs were intubated with a cuffed tracheal cannula; they breathed spontaneously, and ventilation was monitored by a Fleisch pneumotachograph (Metabo, Switzerland), expired O_2 with a Servomex analyzer (U.K.), and expired CO_2 with a CO_2 test (Jaeger, Germany). Under sterile conditions, an external jugular vein was cannulated with two catheters: a conventional 7F Swan-Ganz

Received May 8, 1996.

F. Chabot, C. Saunier, and F. Schrijen.¹ Institut national de la santé et de la recherche médicale Unité 14, 54511 Vandoeuvre Cédex, France, and Université H. Poincaré, 54000 Nancy Cédex, France.

¹ Author for correspondence at INSERM Unité 14, C.O. n° 10, 54511 Vandoeuvre Cédex, France.

thermodilution catheter, with the proximal lumen opening at 20 cm from the tip, and a custom-made 7 F balloon catheter with both lumens extending to the tip (American Edwards Laboratories, Santa Ana, Calif.). Both catheters were advanced into the pulmonary artery, under x-ray fluoroscopy. ECG and vascular pressure were continuously monitored. The thermodilution catheter tip was advanced in a proximal branch of the pulmonary artery, with the proximal lumen in the right atrium. The double distal lumen catheter was advanced until it wedged itself in a peripheral pulmonary artery.

The catheters were periodically flushed with heparinized saline (1 mL heparin, i.e., 5000 IU, in 500 mL saline). The vascular pressures were measured with inductance manometers, and monitored on an oscilloscope (Telco, France) together with the ECG, and on a Gould 3600 recorder (Gould, Cleveland, Ohio). The transducers were placed 5 cm above the table plane. Only mean pressures were taken into account; they were obtained by electronic filtering over three respiratory cycles. Static calibration was checked after each experiment with a mercury manometer.

Pulmonary arterial, pulmonary wedge, and right atrial pressures, as well as cardiac output, were measured with the thermodilution catheter. To determine the pressure-flow curve, one lumen of the double distal lumen catheter was connected with a pressure transducer, the other one with a peristaltic pump (Ismatec, Switzerland). Blood was withdrawn through the pump from the distal lumen of the thermodilution catheter, which was lying free in the pulmonary artery. The catheters were primed with blood, and the reference wedge pressure was measured; the pump was then started and mixed venous blood was infused into the distally wedged catheter. The flow was increased by steps from 0 to 9.2 mL·min⁻¹, then decreased symmetrically. Each flow was maintained for three respiratory cycles or more, and the mean pressure was measured at the end of that period.

After the control pressure-flow run had been completed, contrast medium (Hexabrix) was slowly infused into the wedged catheter, under fluoroscopy, until the draining vein was visualized. Hexabrix consists of sodium and meglumine ioxaglate, an ionic low-osmolar agent containing 320 mg iodine per millilitre. The volume of Hexabrix infused (0.6 ± 0.06 mL) was taken as a measurement of the volume of the wedged area. The catheter was then flushed with 10 mL saline, and another pressure-flow curve (Hexabrix) was established. The interval between the end of the control pressure-flow run and the start of the run after Hexabrix was about 3 min.

The pressure-flow curve was determined in two to four different sites in an individual dog, according to the ability to wedge the catheter in different places. A total of 23 sites were examined. After Hexabrix, the flow was not raised to the maximum because of the large pressure rise in 11 cases. In seven instances the pressure-flow run after Hexabrix (H₁) was repeated 2 min after the first one (H₂).

At the end of the experiment, the double distal lumen catheter was withdrawn, and blood was sampled from the pulmonary artery via the thermodilution catheter, to calibrate the pump with a stopwatch and a graduated tube.

Derived variables

The perfusion pressure during the flow runs was taken as the difference between the actual wedge pressure and the wedge pressure measured at zero flow. Peripheral pulmonary vascular resistance was determined from the local pressure-flow curve, as perfusion pressure (mmHg × 80; 1 mmHg = 133.3 Pa) divided by flow (L·min⁻¹), with the perfusion pressure taken at 5 mL·min⁻¹ flow, on the ascending limb. Hysteresis is the perfusion pressure difference between the ascending and descending limbs of the pressure-flow curve, arbitrarily measured at 7.0 mL·min⁻¹ flow, or lower in the few cases this flow was not reached. The y-intercept is the perfusion pressure at zero flow, computed by extrapolating the initial part of the curve (from 2 to 6 mL·min⁻¹) towards zero.

Table 1. Pressure-flow characteristics.

	Control	Hexabrix	<i>p</i>
<i>P</i> _{ref} (mmHg)	6.5±0.4	9.0±0.7	**
<i>P</i> _o (mmHg)	6.7±0.5	7.4±0.5	
Hys (mmHg)	1.5±0.6	3.3±0.7	*
y-intercept (mmHg)	1.8±0.6	8.5±1.2	***
PPVR (×10 ³ dyn·s·cm ⁻⁵)	162±24	339±33	***

Note: Values are means ± standard error from pressure-flow curves obtained from 23 sites. *P*_{ref}, initial wedge pressure; *P*_o, final wedge pressure, no pump flow; Hys, hysteresis, perfusion pressure difference between ascending and descending limbs of the pressure-flow curve; y-intercept, extrapolated perfusion pressure at zero flow; PPVR, peripheral pulmonary vascular resistance, computed from the perfusion pressure at 5 mL·min⁻¹ flow. Statistical significance of the differences: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

Statistics

The differences between control and Hexabrix were analyzed by paired *t* tests, and relations between variables by least squares regression analysis (Snedecor and Cochran 1967). All values were expressed as means ± standard error.

Results

No change was observed in the overall pulmonary or systemic circulation during the pressure-flow runs.

The characteristics of the pressure-flow curves are given in Table 1. After injection of the contrast medium, the peripheral pulmonary vascular resistance was doubled. In addition, the hysteresis and the y-intercept increased significantly. After Hexabrix, the reference wedge pressure was significantly higher than during the control measurement, but when the pressure-flow run had been completed, it returned to its control value. Figure 1 shows the average pressure-flow values computed from the 12 curves where the flow run was complete, in control and Hexabrix. After Hexabrix, the perfusion pressure at each flow was higher, and the difference between increasing and decreasing flow (hysteresis) was more pronounced.

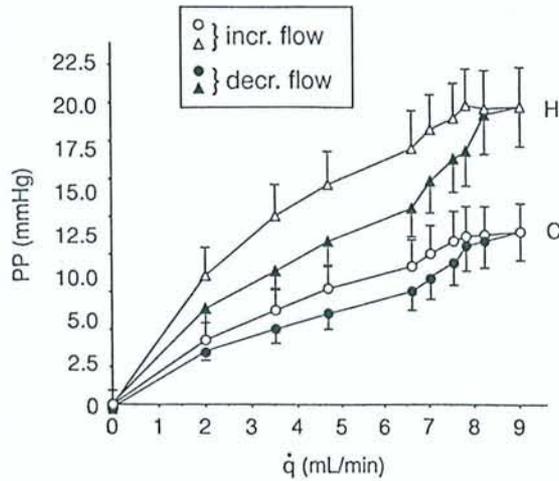
The differences between control and Hexabrix are compared with the differences between two consecutive control flow runs (Table 2). In the latter, the differences were of small magnitude and not significant.

Because the time necessary to complete a pressure-flow run was in the order of a few minutes, the lower perfusion pressure when the flow was decreasing could reflect the return to the control peripheral pulmonary vascular resistance; therefore a second pressure-flow curve after Hexabrix was recorded (H₂, Table 3). Except for the reference wedge pressure, which returned to its control value, there was no significant difference in the pressure-flow characteristics between H₁ and H₂.

Discussion

With this preparation, it is possible to study the effect of a drug on a small portion of the lung vasculature, while avoiding systemic effects. Our results suggest that an ionic low-osmolar contrast agent injected in a peripheral pulmonary artery increased the local vascular resistance. This effect was not due to the repetition of the pressure-flow run, since no difference was observed between two successive control runs.

Fig. 1. Pressure–flow curve during the control period (C, ○ and ●) and after Hexabrix (H, △ and ▲); average values from 12 sites. The bars represent the standard error. PP, perfusion pressure; \dot{q} , pump flow; incr. flow, increasing flow; decr. flow, decreasing flow.



In the present experiments, the contrast medium was injected under the same conditions as it is used for wedge angiograms. Looking at short-term effects (10 s), Shirai et al. (1991) did not observe significant changes in the diameter of small pulmonary arteries during wedge angiograms in cat lungs. In our study, although Hexabrix had been displaced with saline, its effect on vascular resistance could still be shown during the pressure–flow run. It was not attenuated by the blood infusion, since the peripheral pulmonary vascular resistance was unchanged during the second flow run after Hexabrix, i.e., several minutes after the Hexabrix infusion. This long-lasting effect might be due to the diffusion of the drug into the interstitial extracellular space. Uptake of contrast media by the endothelial cells has been shown in the aorta (Parvez et al. 1985), with long-lasting changes, and endothelial damage was also observed in veins (Thiesen and Mützel 1990).

At the time of the injection, the blood flow was interrupted in the downstream vascular bed, and no dilution took place in the area under study. This may explain the striking changes observed. When the drug is injected centrally, an acute increase in the pulmonary arterial pressure has been shown (Peck et al. 1983), but most authors describe a decrease in pulmonary vascular resistance (Peck et al. 1983; Lange et al. 1984).

Viscosity is an important factor in the peripheral pulmonary vascular resistance, as shown by the difference observed between saline and blood infusion: with saline the perfusion pressure at 5 mL·min⁻¹ flow was on average 4 mmHg (Schrijen et al. 1992) and 8 mmHg with blood. The importance of viscosity in the effects of contrast agents was also stressed by Haggmark et al. (1985). In our setting, however, it is unlikely to play a role, since resistance was measured during blood infusion.

The initial increase in the reference pressure after Hexabrix probably reflects a rise in the local pulmonary venous resistance, creating a pressure difference between the pulmonary vein and the left atrial pressure. This effect did not last, since the pressure at zero flow at the end of the pressure–flow run

Table 2. Differences between two control runs and between control and Hexabrix.

	C ₂ – C ₁		H – C	
	Value	<i>p</i>	Value	<i>p</i>
<i>n</i>	14		23	
<i>P</i> _{ref} (mmHg)	0.2±0.3	ns	2.6±0.8	**
<i>P</i> _o (mmHg)	0.3±0.5	ns	0.7±0.6	
Hys (mmHg)	0.1±0.3	ns	2.5±1.2	
PPVR (×10 ³ dyn·s·cm ⁻⁵)	-17±10	ns	179±27	***

Note: Values are means ± standard error of the differences between two consecutive control runs (C₁ and C₂) in 14 sites, and between control (C) and Hexabrix (H) runs in 23 sites. Abbreviations as in Table 1.

Table 3. Pressure–flow characteristics during two consecutive runs after Hexabrix.

	H ₁	H ₂	<i>p</i>
<i>P</i> _{ref} (mmHg)	10.3±1.5	6.3±0.6	*
<i>P</i> _o (mmHg)	7.9±0.8	8.1±0.7	
Hys (mmHg)	3.9±1.3	1.7±2.2	
PPVR (×10 ³ dyn·s·cm ⁻⁵)	342±40	363±100	

Note: H₁, first run after Hexabrix; H₂, second run. Abbreviations as in Table 1.

was not elevated, nor was the reference pressure before the second pressure–flow run. The drug may be washed out from the pulmonary veins first, allowing the wedge pressure to return to the left atrial pressure value. However, this shows the importance of checking the value of the reference pressure with respect to the wedge pressure measured by balloon inflation in a proximal pulmonary artery, which should remain close to the left atrial pressure (Zidulka and Hakim 1985).

When the technique described in the present study is used to study the effect of physiological or pharmacological interventions, if one needs to visualize the wedged area, Hexabrix should be used after the pressure–flow runs have been completed, to avoid interference with the results.

Acknowledgments

The authors thank F. Poincelot for skilful assistance, M.C. Rohrer for drawing the figures, and B. Clément for typing the manuscript.

References

- Egashira, S., Tomoike, H., Nishijima, H., Adachi, H., and Nakamura, M. 1989. Effects of ionic and nonionic contrast media on coronary diameter and blood flow in chronically instrumented dogs. *Am. Heart J.* 118: 39–46.
- Haggmark, S., Hietala, S.O., Reiz, S., Sjodin, J.G., Sunnegardh, O., and Wirell, S. 1985. Central and renal hemodynamic effects of intravenous infusion of non-ionic and ionic contrast media. An experimental investigation in the pig. *Acta Radiol. Diagn.* 26: 491–495.
- Karstoft, J., and Baath, L. 1995. Vasodilative and vasoconstrictive effects of angiography contrast media. *Acta Radiol.* 36(Suppl. 399): 164–169.
- Lange, P.E., Neubert, D., Onnasch, D.G.W., Sievers, H.H., and Heintzen, Ph. 1984. Effects of angio-cardiographic contrast media on the pulmonary circulation in pigs. *Am. J. Cardiol.* 54: 1125–1130.

- Parvez, Z., Khan, T., and Moncada, R. 1985. Ultrastructural changes in rat aortic endothelium during contrast media infusion. *Invest. Radiol.* **20**: 407-412.
- Peck, W.W., Slutsky, R.A., Hackney, D.B., Mancini, G.B., and Higgins, C.B. 1983. Effects of contrast media on pulmonary hemodynamics: comparison of ionic and non-ionic agents. *Radiology*, **149**: 371-374.
- Schrijen, F., Saunier, C., and Henriquez, A. 1992. Pressure/flow relation in the peripheral pulmonary vascular bed in dogs: a preliminary study. *Acta Physiol. Scand.* **145**: 395-399.
- Schrijen, F., Saunier, C., and Chabot, F. 1993. Peripheral pulmonary resistance. *J. Appl. Physiol.* **74**: 613-616.
- Shirai, M., Ninomiya, I., and Sada, K. 1991. Constrictor response of small pulmonary arteries to acute pulmonary hypertension during left atrial pressure elevation. *Jpn. J. Physiol.* **41**: 129-142.
- Snedecor, G.W., and Cochran, W.G. 1967. *Statistical methods*. State University Press, Ames, Iowa.
- Tajima, H., Kumazaki, T., Ito, K., Tajima, N., Gemma, K., and Ebata, K. 1991. Effect of an iso-osmolar contrast medium on pulmonary arterial pressure at pulmonary angiography. *Acta Radiol.* **32**: 134-136.
- Thiesen, B., and Mützel, W. 1990. Effects of angiographic contrast media on venous endothelium of rabbits. *Invest. Radiol.* **25**: 121-126.
- Zidulka, A., and Hakim, T.S. 1985. Wedge pressure in large vs small pulmonary arteries to detect pulmonary venoconstriction. *J. Appl. Physiol.* **59**: 1329-1332.

1- Méthodes

a- Adaptation de la technique pour les études pharmacologiques

Au vu des résultats des travaux décrits précédemment, plusieurs éléments méthodologiques ont été modifiés pour simplifier l'étude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques et permettre les études pharmacologiques.

Si l'artère du territoire bloqué est «coaxiale», la relation pression/débit est pratiquement linéaire avec une ordonnée à l'origine nulle et sans hystérésis. Cette relation s'exprime alors par sa pente. Dans ces conditions, la construction de la courbe peut être simplifiée, avec 3 points pour la partie ascendante et 2 points pour la partie descendante. L'angiographie est nécessaire après la construction des courbes pression-débit pour vérifier l'aspect «coaxial» de l'artère et mesurer le volume du territoire.

La technique est reproductible avec une faible variation des RVPP mesurées dans le même territoire mais les variations des RVPP d'un territoire à l'autre sont importantes. Il est donc indispensable de débiter toutes les études pharmacologiques par la réalisation d'une courbe pression/débit qui permet de calculer la RVPP basale du territoire étudié.

Les études pharmacologiques réalisées sont basées sur la réalisation de courbes dose-réponse. Il est donc nécessaire de faire plusieurs (généralement 3) courbes pression/débit consécutives avec des concentrations croissantes des drogues étudiées après la courbe contrôle. Des expériences ont été réalisées pour confirmer l'absence de variation significative des RVPP dans un même territoire avec une solution contrôle, après réalisation de 4 courbes consécutives pression/débit.

L'administration d'un produit vasoactif modifie le tonus vasculaire dans ce territoire. L'utilisation de concentrations croissantes de la drogue étudiée permet la construction d'une courbe dose-réponse mais ce type de préparation contre-indique l'utilisation d'une même substance à une concentration inférieure à la précédente dans un territoire donné au cours d'une expérience. Après avoir complété une courbe dose-réponse, il est nécessaire de changer la position du cathéter pour refaire une nouvelle série de courbes pression/débit dans un autre

territoire. Deux séries de courbes pression/débit consécutives peuvent être réalisées dans le même territoire si elles sont faites avec un produit vasoconstricteur pour l'une et vasodilatateur pour l'autre.

Les études pharmacologiques ont été réalisées en air et en hypoxie, selon un ordre randomisé. La distribution des RVPP en air et en hypoxie est présentée sur la figure 13. La méthodologie utilisée en hypoxie est celle décrite dans le chapitre consacré aux effets de l'hypoxie mais l'effet d'un même produit vasoactif n'a pas été étudié consécutivement dans le même territoire en air et en hypoxie pour les raisons détaillées quelques lignes plus haut. Les variations de résistances vasculaires pulmonaires périphériques en air et en hypoxie correspondent donc à des variations calculées sur des territoires différents. Le tonus vasomoteur pulmonaire a été augmenté dans certains cas par du L-NAME ou de l'almitrine. Nous démontrons l'action vasoconstrictrice pulmonaire périphérique de ces produits par la mesure de la RVPP avant l'administration de la substance vasodilatatrice.

L'administration d'un produit vasoactif a imposé quelques modifications de la préparation initiale. Ce produit est administré par l'intermédiaire d'une tubulure branchée en Y en aval de la pompe à galet. Le branchement est fait en aval pour maintenir un débit connu de sang veineux mêlé par l'intermédiaire de la pompe.

Les premières expériences ont été faites avec une injection directe en bolus du produit étudié, le vérapamil ou la solution contrôle (sérum glucosé à 5%). Dans ces premières expériences, 1 ml de sérum glucosé à 5% était injecté directement en bolus dans le cathéter bloqué dans le territoire pulmonaire périphérique, rincé avec 2 ml de sérum physiologique, puis une première courbe pression/débit (courbe contrôle) était réalisée 5 minutes plus tard. Les courbes suivantes étaient faites après injection en bolus de vérapamil à concentrations croissantes, dilué dans du sérum glucosé à 5%, selon les mêmes modalités. Les RVPP ont été étudiées dans 4 territoires. Cinq courbes contrôles consécutives dans un même territoire ont été réalisées après injection de sérum glucosé suivant les mêmes modalités dans 2 territoires (2 chiens différents). Contre toute attente, nous avons observé une augmentation des RVPP avec cette technique d'administration du vérapamil. Cela nous a amenés à modifier les modalités

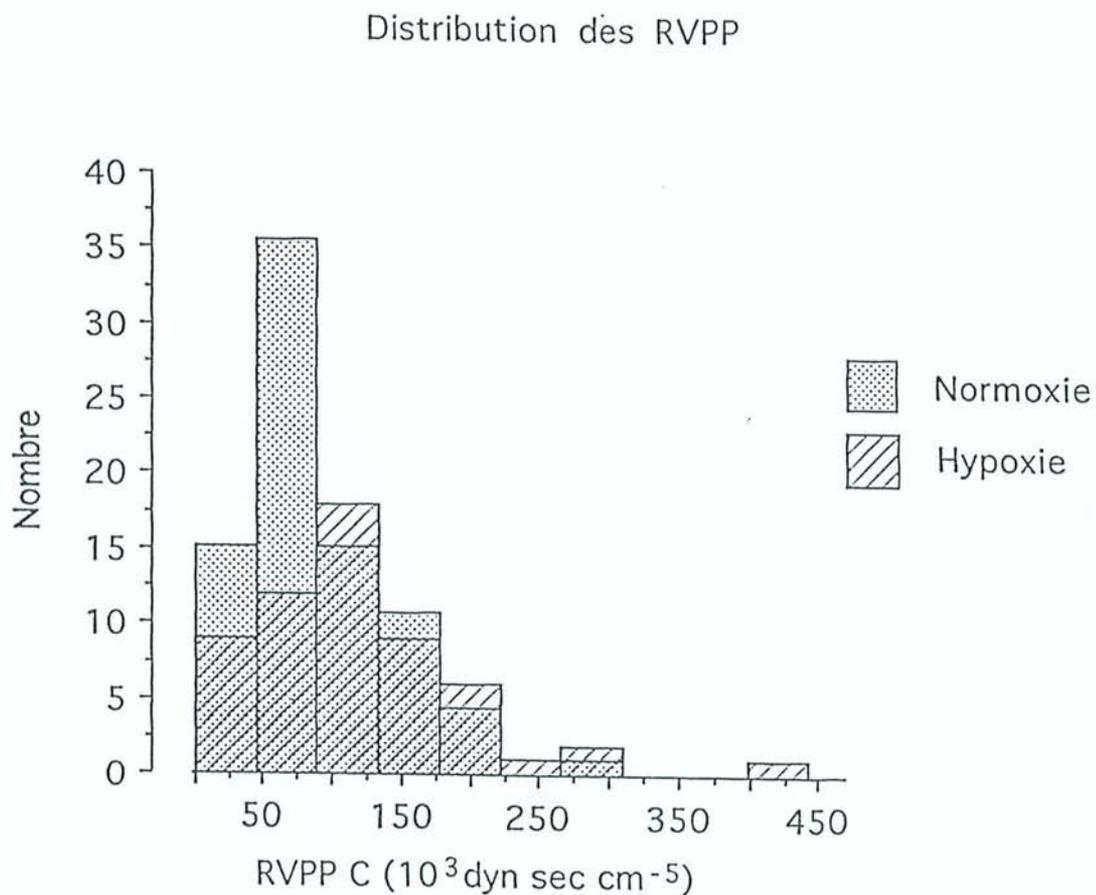


Fig 13 : Distribution de résistances vasculaires pulmonaires et périphériques en air (n = 82) et en hypoxie (n = 57).

Les RVPP sont obtenues lors de la réalisation de courbes contrôle, en air ou en hypoxie. Les valeurs des RVPP sont plus élevées en hypoxie qu'en normoxie, en moyenne.

d'administration. Nous avons réalisé quelques expériences en perfusant le vérapamil par voie générale dans l'oreillette droite qui ont confirmé l'absence d'effet vasoconstricteur du vérapamil par voie générale. Par contre, l'effet vasoconstricteur pulmonaire périphérique a été retrouvé lors de l'administration du vérapamil à la fois par voie générale et en bolus. Les résultats de ces premières expériences nous ont conduit à abandonner l'administration des substances étudiées sous forme d'injection directe en bolus.

Toutes les études pharmacologiques ont été réalisées ensuite au moyen d'une perfusion continue de la substance étudiée dans le territoire périphérique étudié. La solution contrôle ou la drogue diluée dans du sérum glucosé à 5%, est perfusée à un débit prédéterminé, de l'ordre de 15% de celui de la pompe, par l'intermédiaire d'un pousse-seringue automatique qui permet le mélange avec le sang veineux mêlé au niveau du raccordement de la tubulure en Y et du cathéter artériel pulmonaire bloqué (Fig 14). La réalisation de la courbe pression/débit est précédée de la mise en route de la pompe et de la perfusion pendant 1 minute. Après retour à l'état d'équilibre, la courbe pression/débit est faite par paliers de 1 minute pour chaque débit.

Rappelons que l'objectif de ces travaux pharmacologiques est d'étudier les effets de drogues vasoactives sur le tonus vasculaire pulmonaire périphérique sans modification de la circulation pulmonaire globale et systémique (cf p. 99). Dans des expériences préliminaires, nous avons déterminé, pour chaque drogue, la concentration susceptible d'induire une modification de la circulation systémique ou pulmonaire globale. Nous avons utilisé ensuite la drogue à concentration croissante, la concentration maximale utilisée étant 100 fois plus faible que la concentration à l'origine des modifications générales. La limitation de concentration n'a pas permis de faire des courbes dose-réponse complètes.

Les résultats des expériences sont précisés et discutés dans l'article soumis pour publication. Ils sont résumés ici. Seules sont détaillées les études pharmacologiques non incluses dans l'article, c'est à dire le vérapamil selon les 2 modalités d'administration (injection en bolus ou perfusion locale), l'urapidil, l'almitrine en hypoxie et la nicardipine après l'almitrine, également en hypoxie.

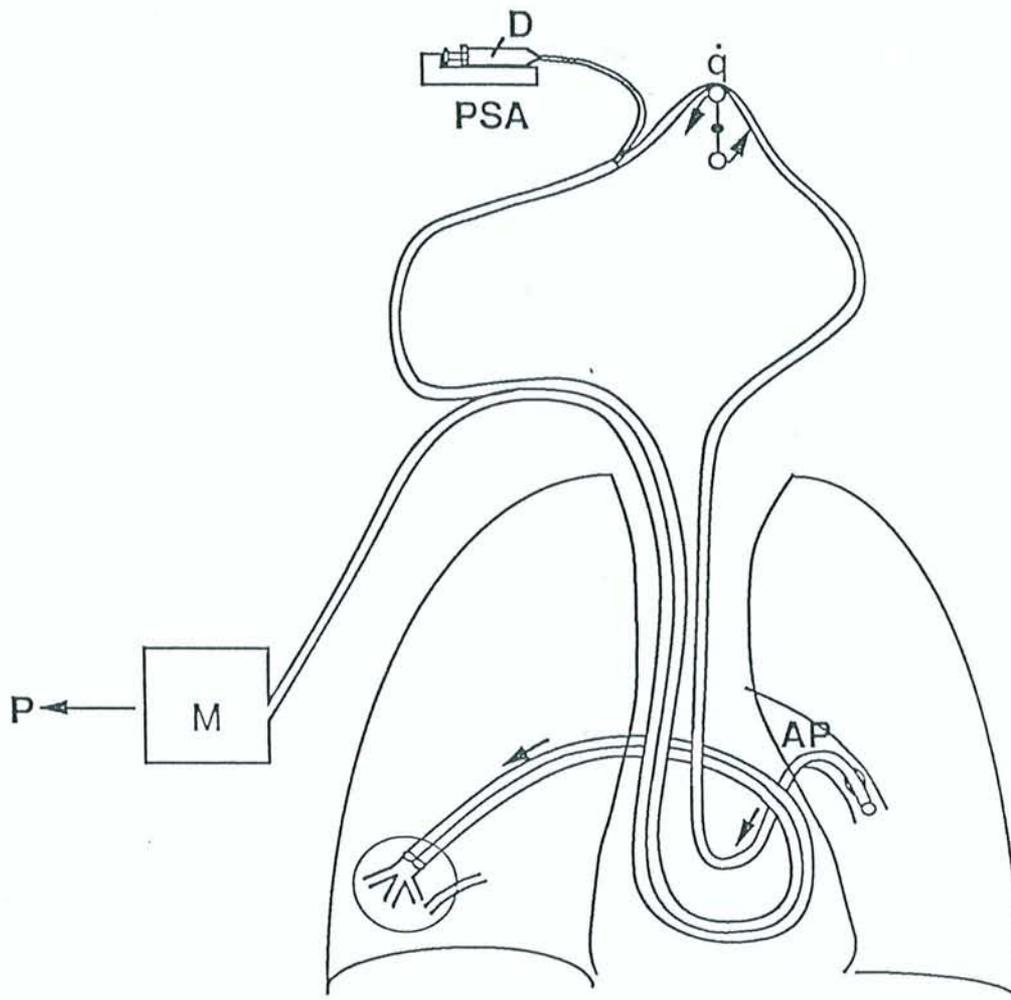


Fig 14 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : préparation pour les études pharmacologiques

La drogue est administrée par l'intermédiaire d'une seringue auto-pulsée dans une tubulure branchée en Y sur le cathéter artériel pulmonaire à double lumière bloqué en aval de la pompe à galets. Abréviations : D : drogue étudiée ; PSA : pousse seringue automatique ; autres : cf Fig 11.

b- Etudes pharmacologiques

Les solutions contrôles sont préparées à partir des solvants en l'absence du principe actif. Les solutions contrôles et les solutions contenant les principes actifs sont diluées avec du sérum glucosé isotonique. Le glucosé isotonique est utilisé comme contrôle avant chaque drogue. Le pH et la viscosité des solutions contrôles et des solutions contenant les principes actifs sont les mêmes.

Des expériences contrôles sont réalisées avec du sérum glucosé à 5%, administré 4 fois de suite dans le même territoire (12 expériences, 8 en air et 4 en hypoxie)

Dans les expériences faites avec des inhibiteurs calciques, les effets du vérapamil ($5 \cdot 10^{-10}$, $5 \cdot 10^{-8}$ et $5 \cdot 10^{-6}$ M), de la nifédipine ($3 \cdot 10^{-11}$, $3 \cdot 10^{-9}$ et $3 \cdot 10^{-7}$ M) et de la nicardipine ($2 \cdot 10^{-10}$, $2 \cdot 10^{-8}$ et $2 \cdot 10^{-6}$ M) sont étudiés.

Pour préciser le rôle du NO, les effets du L-NAME (10^{-7} , 10^{-5} et 10^{-3} M) et du nitroprussiate de sodium (10^{-7} , 10^{-5} et 10^{-3} M) sont étudiés. Les effets du nitroprussiate de sodium sont étudiés seuls ou après administration de L-NAME (10^{-3} M).

L'action vasculaire pulmonaire périphérique des activateurs des canaux potassiques a été étudiée avec le levromakalim (10^{-8} , 10^{-6} et 10^{-4} M), et le nicorandil (10^{-8} , 10^{-6} et 10^{-4} M) précédé de l'administration de L-NAME (10^{-3} M).

L'urapidil, antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, a été également étudié à 3 concentrations différentes ($1,3 \cdot 10^{-9}$, $1,3 \cdot 10^{-7}$ et $1,3 \cdot 10^{-5}$ M). Deux séries d'expériences ont été réalisées avec l'almitrine. L'almitrine est un stimulant des chémorécepteurs périphériques mais son mode d'action exact n'est pas connu. Dans la première série, nous avons étudié les effets hémodynamiques de l'almitrine ($6 \cdot 10^{-10}$ et $6 \cdot 10^{-9}$ M) et nous nous sommes assuré de l'absence de retentissement sur la ventilation. L'almitrine ($6 \cdot 10^{-9}$ M) a été étudiée aussi avant l'administration de nicardipine ($2 \cdot 10^{-9}$, $2 \cdot 10^{-8}$ et $2 \cdot 10^{-7}$ M).

c- Préparation des drogues

Le L-NAME et le nitroprussiate de sodium ont été obtenus de Sigma (France), le vérapamil de Knoll (France), la nifédipine de Bayer (Allemagne), la nicardipine de Sandoz (Suisse), l'urapidil de Byk (France) et l'almitrine de Servier (France). Le levromakalim a été

gracieusement fourni par Smith Klein Beecham (Grande-Bretagne) et le nicorandil par Bellon (France). Les drogues sont solubilisées dans du glucosé à 5% (L-NAME, nitroprussiate de sodium, vérapamil et nicorandil), dans de l'eau distillée (levcromakalim), dans de l'alcool et du polyéthylène glycol (nifédipine), dans de l'acide chlorhydrique (nicardipine), dans du propylène-glycol et de l'hydrogène-phosphate (urapidil), et dans de l'acide malique (almitrine). Une aliquote de ces solutions est dissoute dans du glucosé isotonique pour obtenir les concentrations désirées. Toutes les solutions sont préparées immédiatement avant l'expérience et maintenues à l'abri de la lumière si nécessaire.

2- Résultats

a - Effets du vérapamil : importance du mode d'administration

Après injection directe en bolus de vérapamil dans le cathéter bloqué, les RVPP augmentent. Les paramètres mesurés et calculés avec les courbes pression/débit après une injection locale de vérapamil à concentration croissante dans le territoire étudié sont présentés dans le tableau 2 (p. 115). Aux concentrations utilisées, le vérapamil administré dans le territoire pulmonaire périphérique n'a aucune action sur la circulation systémique ou pulmonaire générale. L'utilisation de concentrations croissantes de vérapamil est associée à une augmentation significative des RVPP. Après vérapamil, la pression de perfusion est plus élevée pour chaque débit. L'hystérésis et l'ordonnée à l'origine ne sont pas modifiés. Les différences entre 5 courbes contrôles consécutives pression/débit faites après injection d'1 ml de sérum glucosé à 5% dans un même territoire, ne sont pas significatives.

L'effet sur les RVPP du vérapamil administré par voie générale a été étudié dans 4 sites. Après injection de 2 ml de vérapamil dans l'oreillette droite à la concentration de $5 \cdot 10^{-3}$ M en 2 min suivis par une perfusion de vérapamil (20 ml/h à la concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M), la courbe pression/débit a été réalisée pendant la perfusion systémique de vérapamil (Fig 15). Les résultats de l'administration de vérapamil par voie systémique sont présentés dans le tableau 3. Dans ces conditions, la pression artérielle fémorale tend à diminuer. La baisse de la pression artérielle systémique ne devient significative qu'à la troisième période de cette étude, c'est à dire avec

l'injection et la perfusion systémique de vérapamil. Les autres variables hémodynamiques, systémiques, pulmonaires générales, et les RVPP ne sont pas modifiées.

L'étude des RVPP a été complétée dans ces 4 territoires par une administration simultanée de vérapamil par voie générale et locale à la concentration de 5.10^{-10} M. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le vérapamil perfusé par voie générale. L'administration simultanée de vérapamil par voie générale et locale en bolus (tableau 3) diminue la pression artérielle systémique (versus contrôle). La figure 15 représente les courbes pression/débit contrôle, sous vérapamil par voie générale et par voie générale associée à une injection directe locale en «bolus». Dans les 4 sites périphériques en normoxie, les RVPP et l'hystérésis augmentent avec l'injection directe locale «en bolus».

Après ces premières expériences, l'administration du vérapamil sous forme d'injection directe, en bolus, a été abandonnée. Ces résultats soulignent l'importance du mode d'administration de la drogue étudiée dans cette préparation.

Tableau 2

Variations des RVPP avec le vérapamil par voie locale «en bolus»

injectat	concentration	RVPP (10^3 dyn s cm ⁻⁵)
Contrôle		224 ± 61
vérapamil	5.10 ⁻¹⁰ M	303 ± 96
vérapamil	5.10 ⁻⁸ M	341 ± 94
vérapamil	5.10 ⁻⁶ M	362 ± 89

Anova (mesures répétées) : $p = 0,026$

n = 4

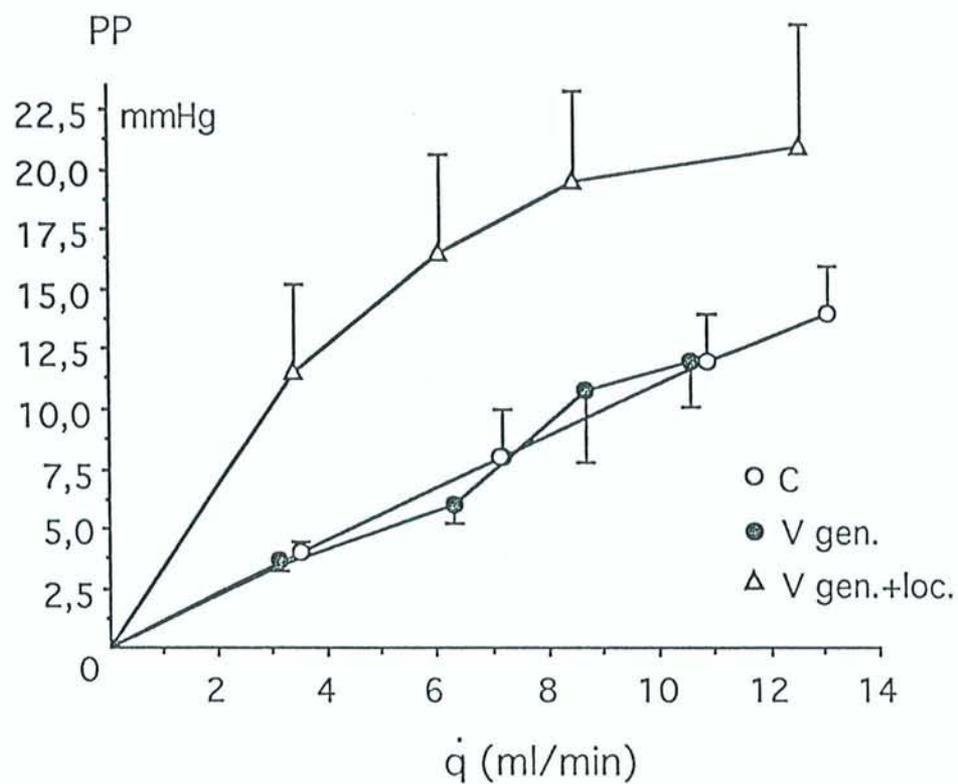


Fig 15 : Courbe pression/débit contrôle (C), sous vérapamil par voie générale (v gen) et par voie générale + locale en bolus (v gen + loc). Valeurs moyennes de 4 territoires en normoxie.

Abréviations : PP : pression de perfusion ; \dot{q} : débit à la pompe

Tableau 3

Valeurs hémodynamiques obtenues avec le vérapamil par voie générale et locale «en bolus»

	Contrôle	v. gén.	v. gén.+ loc.	p*
\bar{P}_{as} (mmHg)	150 ± 5	145 ± 6	131 ± 8	0,02
\dot{Q} (l/min)	4,3 ± 0,6	4,1 ± 0,8	4,8 ± 1,0	n.s.
\bar{P}_{ap} (mmHg)	18,8 ± 1,0	19,3 ± 1,4	22,5 ± 1,6	0,02
\bar{P}_{cp} (mmHg)	7,8 ± 0,9	8,0 ± 0,7	9,0 ± 1,6	n.s.
RVP (dyn s cm ⁻⁵)	230 ± 57	262 ± 84	262 ± 93	n.s.
RVPP (10 ³ dyn s cm ⁻⁵)	107 ± 39	97 ± 27	237 ± 74	0,02

v.gén. : vérapamil par voie générale

v.gén.+ loc. : vérapamil par voie générale et locale

*Anova (mesures répétées sur les 3 périodes)

\bar{P}_{as} : pression artérielle systémique moyenne

\dot{Q} : débit cardiaque

\bar{P}_{ap} : pression artérielle pulmonaire moyenne

\bar{P}_{cp} : pression capillaire pulmonaire moyenne

RVP : résistances vasculaires pulmonaires

RVPP : résistances vasculaires pulmonaires périphériques

Valeurs moyennes ± erreur standard dans 4 territoires

Toutes les expériences suivantes correspondent à des expériences réalisées avec une perfusion continue de la substance étudiée administrée par l'intermédiaire d'un pousse seringue automatique et diluée dans du sang veineux mêlé lors de son passage dans le cathéter artériel pulmonaire.

b - Effets du glucosé isotonique

La répétition des courbes pression-débit, 4 fois consécutives dans le même territoire, ne modifie pas les résistances vasculaires pulmonaires périphériques en normoxie (n = 8) et en hypoxie (n = 4 ; Fig 16).

c - Effets des inhibiteurs calciques

Phénylalkylamine : vérapamil. Le vérapamil (5.10^{-10} à 5.10^{-6} M), administré sous forme de perfusion continue diluée dans le sang veineux mêlé ne modifie pas les RVPP en normoxie (n = 5). En hypoxie (n = 5), les RVPP augmentent de 24% et diminuent de 22% après administration de vérapamil (Fig 17).

Dihydropyridines : nifédipine (3.10^{-11} à 3.10^{-7} M) et nicardipine (2.10^{-10} à 2.10^{-6} M). En normoxie, la nifédipine (n = 9) et la nicardipine (n = 7) n'induisent pas de modification des RVPP. En hypoxie, la nifédipine (n = 6) et la nicardipine (n = 9) diminuent les RVPP et la variation des RVPP est corrélée à la valeur des RVPP en hypoxie.

d- Voie de la NO synthétase

Effets du L-NAME et du nitroprussiate de sodium. Durant la perfusion de contrôle, les RVPP sont plus élevées en hypoxie qu'en normoxie. Le L-NAME (10^{-7} à 10^{-3} M) augmente les RVPP en normoxie (n = 5) et en hypoxie (n = 5). Les RVPP sont égales en normoxie et en hypoxie avec la concentration la plus élevée de L-NAME.

Le nitroprussiate de sodium diminue les RVPP en hypoxie. Après augmentation des RVPP par le L-NAME (10^{-3} M), le nitroprussiate de sodium les diminue également en normoxie (n = 5) et en hypoxie (n = 4).

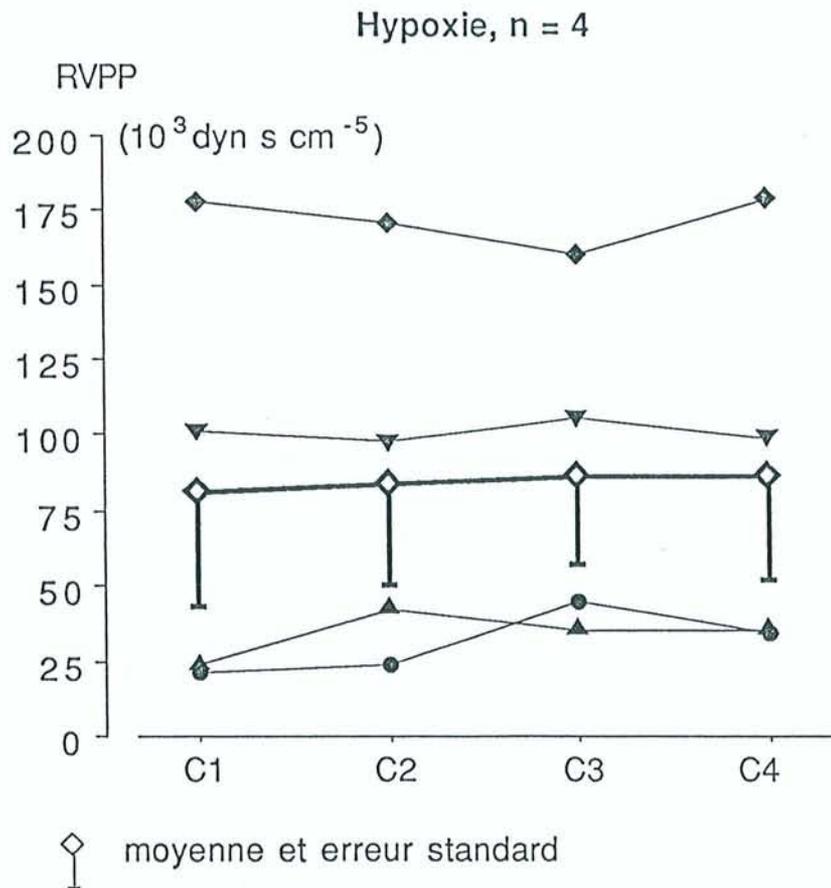
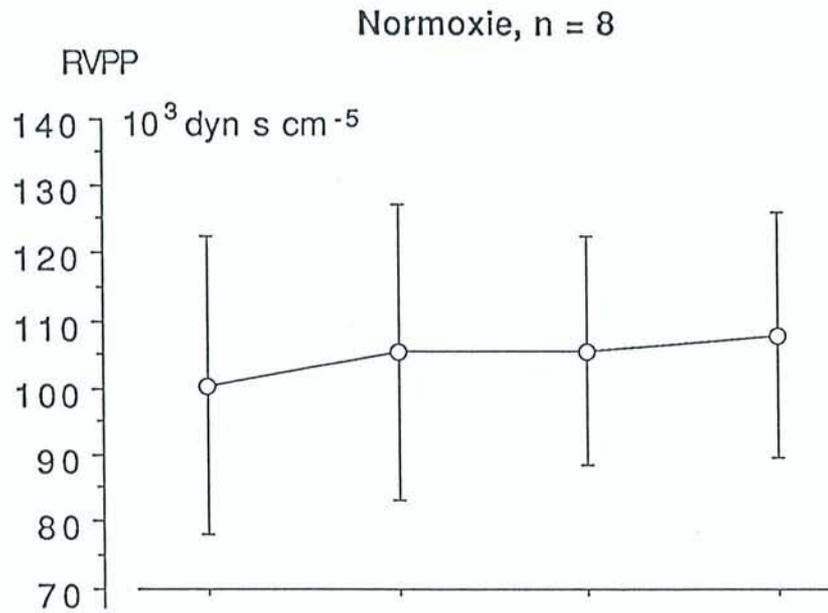
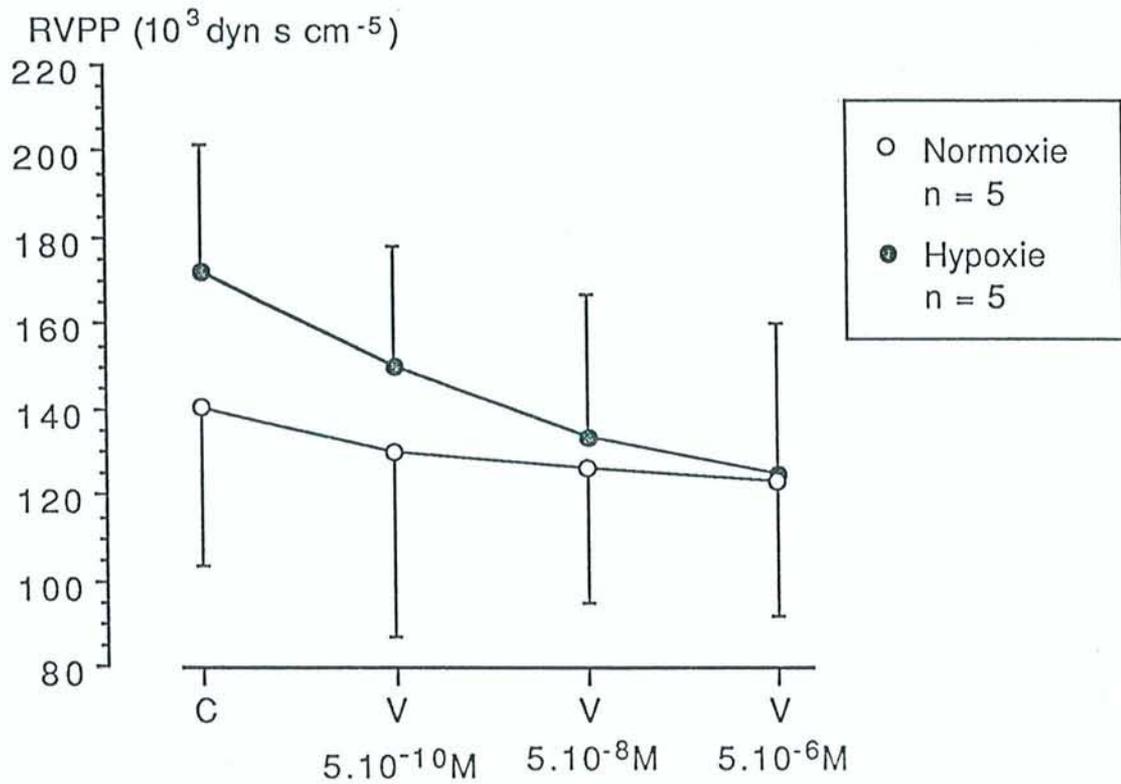


Fig 16 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets du sérum glucosé isotonique.

La répétition des courbes pression/débit avec du sérum glucosé isotonique ne modifie pas les RVPP en normoxie et en hypoxie.

Abréviation : C : contrôle

Vérapamil en perfusion locale



n = 5, anova n.s.

C = contrôle
V = vérapamil

Fig 17 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets du vérapamil en perfusion locale.

Le vérapamil en perfusion locale ne modifie pas les RVPP en normoxie. La baisse des RVPP en hypoxie atteint 22% mais n'est pas significative.

e- Activateurs des canaux potassiques

Le levromakalim, aux concentrations étudiées (10^{-8} à 10^{-4} M), ne modifie pas les RVPP en normoxie (n = 13) et en hypoxie (n = 12).

Après administration de L-NAME (10^{-3} M), le nicorandil (10^{-8} à 10^{-4} M) diminue les RVPP en normoxie (n = 4) et en hypoxie (n = 4).

f- Antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques : urapidil

L'urapidil, aux concentrations étudiées ($1,3 \cdot 10^{-9}$ à $1,3 \cdot 10^{-5}$ M), ne modifie pas les RVPP en normoxie (n = 8) et en hypoxie (n = 7 ; Fig 18). Dans 5 expériences supplémentaires, réalisées en hypoxie, des concentrations plus élevées d'urapidil ($1,3 \cdot 10^{-6}$ à $1,3 \cdot 10^{-4}$ M) n'ont pas modifié les RVPP (résultats non présentés).

g- Almitrine, almitrine et nicardipine

Deux séries d'expériences ont été réalisées en hypoxie. L'almitrine ($6 \cdot 10^{-10}$ et $6 \cdot 10^{-9}$ M) augmente les RVPP de manière dose-dépendante (n = 13 ; Fig 19). L'almitrine n'entraîne pas de variation significative de la ventilation. Dans la seconde série d'expériences, les RVPP ont été augmentées par l'administration d'almitrine ($6 \cdot 10^{-9}$ M) avant perfusion de nicardipine ($2 \cdot 10^{-9}$ à $2 \cdot 10^{-7}$ M). Sous nicardipine, une baisse concentration-dépendante des RVPP est observée, les RVPP retournant à la valeur contrôle obtenue avant almitrine (n = 13 ; Fig 20).

Les résultats non publiés et non soumis pour publications sont discutés dans les pages suivantes (p. 125-130). Les résultats soumis pour publication et les résumés des affiches présentés dans les congrès internationaux sont insérés au-delà de la page 130.

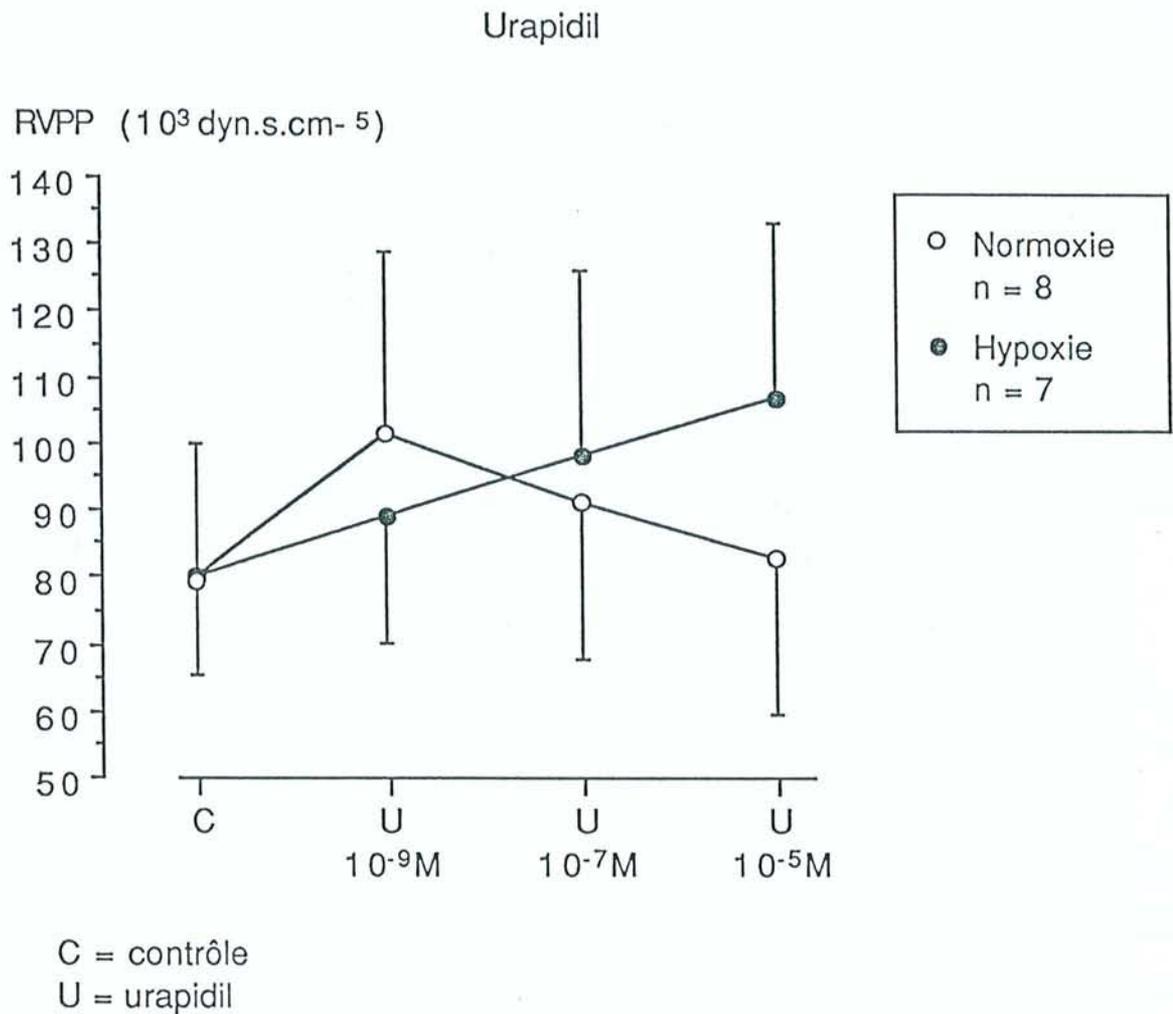
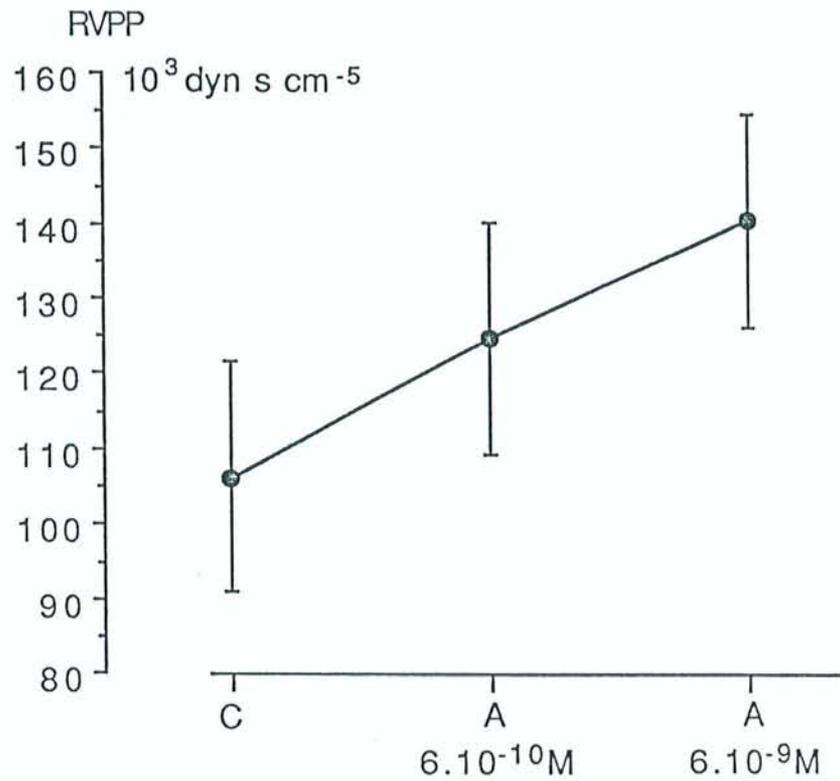


Fig 18 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets de l'urapidil.
L'urapidil, aux concentrations étudiées, ne modifie pas les RVPP en normoxie et en hypoxie.

Almitrine en hypoxie



n = 13

Anova mesures répétées: $p < 0,005$

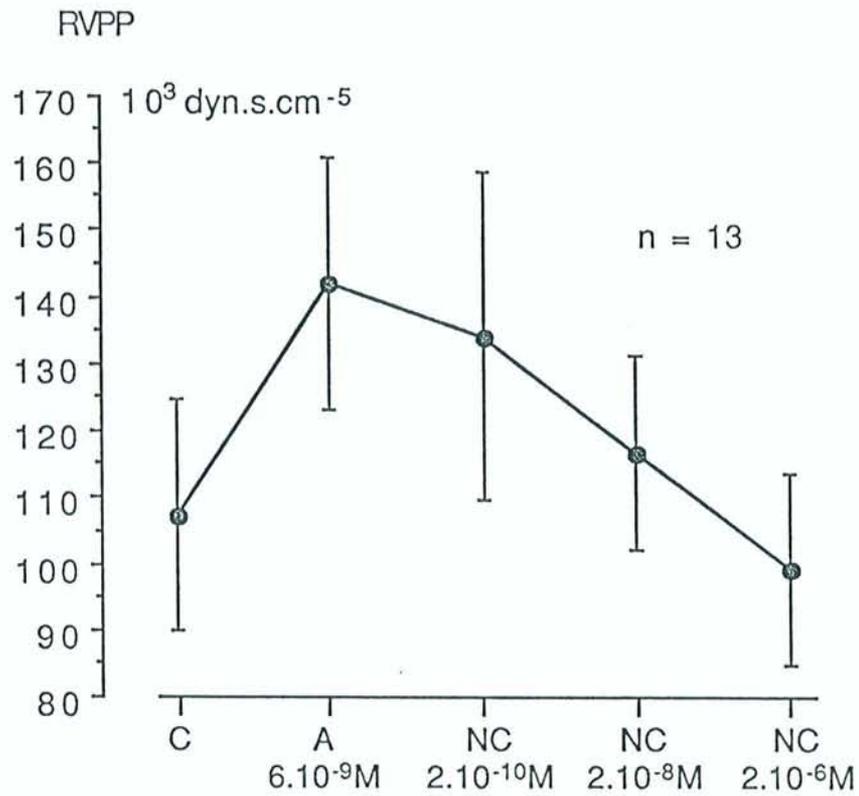
C = contrôle

A = almitrine

Fig 19 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets de l'almitrine en hypoxie.

L'almitrine augmente les RVPP significativement.

Almitrine et nicardipine en hypoxie



C = Contrôle
A = almitrine
NC = nicardipine

Fig 20 : Etude des résistances vasculaires pulmonaires périphériques : effets de l'almitrine et de la nicardipine en hypoxie.

Les RVPP sont augmentées par l'almitrine. La nicardipine diminue les RVPP significativement.

3- Discussion des résultats non publiés et non soumis pour publication

a- Effets du vérapamil : importance du mode d'administration

Le vérapamil est un inhibiteur de l'influx calcique. Il diminue la vasoconstriction hypoxique du poumon de rat isolé (McMurtry *et al.*, 1976). Chez le chien, il diminue également la vasoconstriction pulmonaire induite par la sérotonine (El-Kashef *et al.*, 1990). L'effet vasodilatateur pulmonaire n'est pas toujours retrouvé (Young *et al.*, 1983). Par ailleurs, les inhibiteurs calciques inhibent la contraction des fibres musculaires vasculaires et striées cardiaques. Le but de ce travail est de préciser l'action du vérapamil sur le lit vasculaire pulmonaire périphérique, selon le mode d'administration, indépendamment de toute action systémique ou cardiaque.

Nos résultats suggèrent que le chlorhydrate de vérapamil injecté en bolus dans une artère pulmonaire périphérique augmente la résistance vasculaire locale. Cet effet n'est pas dû à la répétition d'une courbe pression/débit dans le même territoire car il n'y a pas de différence entre les courbes contrôles successives. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur des préparations de segments d'artères pulmonaires dont le tonus vasomoteur est estimé par la mesure de la tension isométrique développée dans différentes conditions. En l'absence de vasoconstriction préalable, la force de contraction isométrique de segments d'artère pulmonaire n'est pas modifiée par le vérapamil à la concentration de 10^{-8} et de 10^{-6} M (Demiryurek *et al.*, 1991 ; Ohe *et al.*, 1992 ; Demiryurek *et al.*, 1993). Cette différence de résultats ne peut pas être expliquée par les concentrations de vérapamil qui, dans ces travaux, sont de l'ordre de grandeur de celles que nous avons utilisées. Il en est de même du diamètre des vaisseaux étudiés, de 0,3 mm (Demiryurek *et al.*, 1991; Demiryurek *et al.*, 1993) à 2 (Ohe *et al.*, 1992 ; Demiryurek *et al.*, 1993) et 4 mm (Demiryurek *et al.*, 1993). Dans notre cas, l'artère pulmonaire bloquée par la sonde a un diamètre interne égal à celui de la sonde, soit 2,3 mm. Il est également peu probable que la différence de résultats soit liée à une différence interspèce, artères humaines (Ohe *et al.*, 1992 ; Demiryurek *et al.*, 1993) ou de mouton (Demiryurek *et al.*, 1991) dans ces expériences.

Ces résultats différents des données de la littérature nous ont amenés à poursuivre nos

expériences en étudiant les conséquences de l'administration par voie générale de vérapamil. Dans ce cas, le vérapamil ne modifie pas le tonus vasculaire pulmonaire d'un territoire périphérique. Nous avons observé une tendance à la baisse de la pression artérielle systémique sans changement de l'hémodynamique pulmonaire générale. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés chez des chiens anesthésiés (Young *et al.*, 1983), chez des moutons conscients (Ahmed *et al.*, 1988) ou dans des préparations de lobe pulmonaire isolé de chien (El-Kashef *et al.*, 1990).

Pour confirmer le rôle du mode d'administration locale du vérapamil dans l'augmentation des RVPP, nous avons poursuivi ces expériences en associant injection locale en bolus et perfusion par voie générale de vérapamil. Les résultats mettent en évidence une baisse de la pression artérielle fémorale attribuée à la perfusion systémique de vérapamil, sans changement de l'hémodynamique pulmonaire générale. Dans les territoires en normoxie, les RVPP sont augmentées, résultat comparable à celui obtenu avec l'administration uniquement locale de vérapamil, en injection directe sous forme de «bolus». Cette expérience confirme que l'augmentation des RVPP en normoxie est due au mode d'administration locale du vérapamil. Cette hypothèse est confirmée par l'administration de vérapamil sous forme de perfusion continue diluée dans le sang veineux mêlé. Dans ces conditions, le vérapamil ne modifie pas les RVPP en normoxie et tend à diminuer les RVPP en hypoxie.

Un effet inhibiteur de la vasoconstriction, plus important en hypoxie qu'en normoxie, a déjà été décrit avec le vérapamil (Yuan *et al.*, 1990 ; Ohe *et al.*, 1992) ; inversement, l'administration en hypoxie d'un agoniste de l'influx calcique augmente le tonus vasomoteur pulmonaire (Tolins *et al.*, 1986 ; Ohe *et al.*, 1992). Les résultats obtenus sur des préparations de segments d'artères pulmonaires exposés à une hypoxie sont variables. Sur des petites artères de rat (Yuan *et al.*, 1990), l'augmentation de tonus induite par l'hypoxie diminue de 40% en présence de 10^{-7} M de vérapamil et de 78% avec 10^{-6} M de vérapamil. Avec des segments d'artères pulmonaires humaines, certains auteurs (Ohe *et al.*, 1992) ont des résultats équivalents. A l'inverse, d'autres n'observent pas de modification de la contraction isométrique avec du vérapamil à 10^{-6} M (Demiryurek *et al.*, 1993). Dans un modèle de poumon de rat isolé, le vérapamil a un effet inhibiteur sur la vasoconstriction pulmonaire (Mac Murtry *et al.*, 1976).

Cet effet est obtenu à partir d'une concentration de $2 \cdot 10^{-8}$ M et est concentration-dépendant. Sur un modèle de lobe isolé de chien avec une vasoconstriction induite par la sérotonine, le vérapamil à des concentrations de 10^{-6} à 10^{-4} M diminue les résistances vasculaires pulmonaires (El-Kashef *et al.*, 1990). A l'inverse chez des chiens anesthésiés et soumis à une hypoxie sous vérapamil par voie générale, les résistances vasculaires pulmonaires augmentent, sans modification de la pression artérielle pulmonaire et avec une baisse du débit cardiaque (Young *et al.*, 1983). Les mêmes résultats sont obtenus avec une hypertension artérielle pulmonaire induite par une perfusion de prostaglandines $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Il est difficile de préciser le mécanisme d'augmentation des RVPP lors de l'injection directe «en bolus» de vérapamil. La responsabilité isolée du cathéter dans l'augmentation des RVPP ne peut pas être retenue car il n'y a pas de variation des RVPP sur les courbes contrôles. Par contre, il est possible que l'administration du chlorhydrate de vérapamil sous forme de bolus sur un endothélium lésé par le cathéter induise cette augmentation des RVPP. Plusieurs mécanismes physiopathologiques peuvent être envisagés au niveau de l'endothélium. L'endothélium a un rôle modulateur du tonus musculaire lisse vasculaire. Les cellules endothéliales peuvent induire une vasoconstriction par la libération de facteurs constricteurs tels le thromboxane A_2 ou les endothélines par exemple (Furchgott & Vanhoutte, 1989). L'injection directe locale «en bolus» de vérapamil dans un cathéter distal bloqué peut léser ou agir sur l'endothélium et modifier l'équilibre entre facteurs constricteurs et dilatateurs. Cette dernière hypothèse a été confortée récemment. En effet, sur des anneaux vasculaires pulmonaires isolés provenant de lapin, la tension pariétale induit une contraction vasculaire par activation de la voie de la cyclooxygénase au niveau des cellules endothéliales avec augmentation de la libération de thromboxane A_2 et du rapport thromboxane A_2/PGI_2 (Nakayama *et al.*, 1997). D'autres mécanismes d'augmentation des RVPP peuvent être envisagés, comme une stimulation directe de la cellule musculaire lisse liée à la distension brusque du vaisseau par le bolus ou encore la mise en jeu du système nerveux autonome α adrénergique, mais l'importance du rôle du système nerveux autonome dans le contrôle du tonus vasomoteur pulmonaire est controversée (Liu & Barnes, 1997).

b- Effets de l'urapidil

Le tonus sympathique contribue au maintien du tonus vasculaire pulmonaire basal et à sa modulation en hypoxie aiguë (Liu & Barnes, 1997). Les artères pulmonaires de chien ont une innervation adrénergique importante. L'administration d'antagonistes α -adrénergiques réduit la vasoconstriction hypoxique chez des chiens anesthésiés (Brimioulle *et al.*, 1997). La distribution des différents sous-types de récepteurs α -adrénergiques n'est pas bien connue chez le chien. Dans un modèle de poumon perfusé chez le chien anesthésié, les agonistes α_1 -adrénergiques induisent une vasoconstriction artérielle (Shebuski *et al.*, 1986). La noradrénaline induit une vasoconstriction des artères pulmonaires proximales (Greenberg *et al.*, 1981 ; Hakim 1988), mais est dénuée d'efficacité au niveau des vaisseaux distaux (Hakim, 1988 ; Kemp *et al.*, 1997). Pour préciser le rôle des récepteurs α_1 -adrénergiques dans la circulation pulmonaire périphérique, nous avons étudié les effets de l'urapidil, un inhibiteur des récepteurs α_1 -adrénergiques doté d'une activité centrale agoniste des récepteurs serotoninérgiques $5HT_{1A}$ (van Zwieten, 1989). Dans notre modèle, nous étudions uniquement l'action vasculaire périphérique. Nos résultats montrent que, dans cette préparation, l'urapidil, aux concentrations étudiées, ne modifie pas les RVPP en normoxie et en hypoxie. Ces résultats suggèrent l'absence de récepteurs α_1 -adrénergiques fonctionnels dans la circulation pulmonaire périphérique chez le chien anesthésié.

c- Effets de l'almitrine

Nous avons terminé ce travail par l'étude des effets de l'almitrine et de la succession almitrine et dihydropyridine en hypoxie. Nos résultats mettent en évidence une augmentation dose-dépendante des RVPP en hypoxie sous l'effet de l'almitrine sans variation significative de la ventilation. L'almitrine chez le chien anesthésié potentialise en quelques secondes la vasoconstriction hypoxique sans modifier la ventilation (Romaldini *et al.*, 1983). Les effets de

l'almitrine sont controversés. Dans un modèle de lobe de chien isolé, l'almitrine a une action vasoconstrictrice dans les territoires hyperoxiques mais a une action vasodilatatrice sur les lobes siège d'une vasoconstriction hypoxique (Hughes *et al.*, 1986). Dans un modèle comparable, l'effet de l'almitrine apparaît dose-dépendant. De faibles doses d'almitrine augmentent la vasoconstriction hypoxique et des posologies élevées l'atténuent (Nakanishi *et al.*, 1988). La constatation de résultats similaires après chémodénervation périphérique suggère que la potentialisation de la vasoconstriction hypoxique par l'almitrine est due à un effet direct de l'almitrine sur les vaisseaux pulmonaires (Nakanishi *et al.*, 1988). De faibles doses d'almitrine restaurent la vasoconstriction hypoxique chez les chiens ne présentant pas de vasoconstriction en hypoxie dits «non répondeurs» mais sont dénuées d'effet chez les chiens «répondeurs». Cet effet pourrait être dû au fait que les animaux «répondeurs» ont une réponse vasopressive importante à l'hypoxie qui ne peut pas être augmentée. Les effets vasculaires pulmonaires de l'almitrine sont non seulement dose-dépendants mais également modulés par la vasoréactivité à l'oxygène (Naeije *et al.*, 1990). Ces résultats suggèrent que dans notre étude, les valeurs des RVPP en hypoxie avant la perfusion d'almitrine reflètent une vasoconstriction pulmonaire périphérique sous maximale en hypoxie, potentialisée ensuite par l'almitrine.

Dans notre seconde série d'expériences également réalisées en hypoxie, après augmentation des RVPP par l'almitrine, la nicardipine induit une baisse dose-dépendante des RVPP avec retour à la valeur contrôle initiale. Nos résultats ne permettent pas de préciser si la baisse des RVPP observée après administration des inhibiteurs des canaux calciques correspond à une réduction de la vasoconstriction induite par l'almitrine, l'hypoxie ou l'association de l'hypoxie et l'almitrine. Rappelons que dans des expériences précédentes, la nicardipine avait induit une baisse significative des RVPP en hypoxie avec une variation d'autant plus importante que les valeurs des RVPP en hypoxie étaient plus élevées avant administration de nicardipine. La nicardipine diminue donc l'augmentation de tonus observée après almitrine en hypoxie. Ces résultats obtenus *in vivo* confirment les données obtenues par l'étude de l'effet de l'almitrine sur la tension isométrique d'anneaux vasculaires pulmonaires isolés de rat et dans un modèle de poumon de rat isolé (Gottschall *et al.*, 1992). L'almitrine induit une vasoconstriction dans le poumon de rat isolé mais n'a pas d'effet sur les anneaux vasculaires isolés. A faibles doses, elle

potentialise la vasoconstriction hypoxique dans le poumon de rat isolé perfusé. La vasoconstriction causée par l'almitrine à fortes doses réduit la vasoconstriction induite par l'hypoxie et inversement de fortes doses d'almitrine n'augmentent pas la vasoconstriction hypoxique. Par ailleurs, la vasoconstriction induite par l'almitrine est inhibée par les inhibiteurs calciques comme la nifédipine qui inhibent la vasoconstriction hypoxique (Gottshall *et al.*, 1992). Ces éléments et l'interaction entre l'almitrine et l'hypoxie ont suggéré un mécanisme commun de vasoconstriction à l'almitrine et à l'hypoxie (Gottshall *et al.*, 1992). Cette hypothèse n'a pas été confirmée.

Les résultats obtenus avec les autres drogues sont présentés dans le manuscrit de l'article soumis pour publication et dans les résumés d'affiches présentés à des Congrès internationaux avec Comités de Lecture.

Role of NO pathway, calcium and potassium channels in the peripheral pulmonary vascular resistance, *in vivo*, during normoxia and mild acute normocapnic hypoxia in dogs

Short running title: Vasoreactivity in peripheral pulmonary circulation

F. Chabot (1,2), F. Schrijen (1) & C. Saunier (1).

(1) INSERM U14, Plateau de Brabois, CO 10, 54500 Vandœuvre-les-Nancy and (2) Service des Maladies Respiratoires et Réanimation Respiratoire, CHU Nancy-Brabois, rue du Morvan, 54500 Vandœuvre-les-Nancy. France.

Author for correspondence: F. Chabot. INSERM U14, Plateau de Brabois, CO 10, 54500 Vandœuvre-les-Nancy. France

SUMMARY

1- Pulmonary vasoreactivity may be different in proximal and peripheral vessels. Therefore, we investigated the effects of several vasoactive stimuli on the peripheral pulmonary circulation, *in vivo*. We studied the pressure-flow relationship in the peripheral pulmonary circulation, and computed the slope of the initial part of the pressure/flow relation (peripheral pulmonary vascular resistance or PPVR), using a double lumen catheter wedged in a distal pulmonary artery, without interference on the overall pulmonary or systemic circulation. Autologous mixed venous blood was infused at known flows in wedged areas (vascular volume : about 0.7 ml) in anaesthetised spontaneously breathing dogs. We reported the effects on PPVR of N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, sodium nitroprusside (SNP), an NO donor, various calcium channel blockers and potassium channel openers, during normoxia and acute mild normocapnic hypoxia.

2- The NO synthase inhibitor L-NAME caused a $+126\pm 48\%$ increase in PPVR during normoxia ($p<0.01$), and potentiated the pulmonary vasoconstrictor response (increase in PPVR $+96\pm 35\%$; $p<0.01$) to hypoxia. After an increase in PPVR by L-NAME, SNP decreased PPVR during normoxia ($-20\pm 7\%$; $p<0.001$) and hypoxia ($-23\pm 4\%$; $p<0.01$). During hypoxia, the decrease in PPVR induced by SNP only was similar to that after L-NAME during hypoxia ($-37\pm 13\%$; $p=0.07$).

3- The calcium channel blockers, verapamil, nifedipine and nicardipine, did not modify PPVR during normoxia but decreased PPVR ($-21\pm 23\%$, NS; $-26\pm 8\%$, $p<0.01$ and $-34\pm 15\%$, $p<0.05$, respectively) during hypoxia.

4- Levcromakalim, a potassium channel opener did not modify PPVR during normoxia or hypoxia. The effects of nicorandil, a potassium channel opener with NO donor properties, were studied after administration of L-NAME. After an increase in PPVR induced by L-NAME, nicorandil decreased PPVR during normoxia ($-15\pm 12\%$, $p<0.05$) and hypoxia ($-13\pm 3\%$, $p<0.02$).

5- Our results underline the role of NO pathway in the peripheral pulmonary circulation, *in vivo*. Endogenous NO is at least partially responsible for low basal pulmonary vascular tone, acts to modulate the hypoxic pulmonary vasoconstriction, and is not involved in the pulmonary vascular response to the SNP. Our results suggest that K_{ATP} channels are not a major component of pulmonary vasoregulation in the peripheral pulmonary circulation both

during normoxia and during mild acute hypoxia. The role of voltage-dependent calcium channels seems essential during acute hypoxia in the peripheral lung vasculature.

Key-words: peripheral pulmonary circulation; vasoreactivity; anaesthetised dogs; normoxia; mild acute normocapnic hypoxia; NO; L-NAME; sodium nitroprusside; calcium channel inhibitors; potassium channel openers.

INTRODUCTION

Under physiological conditions, a powerful vasodilator, nitric oxide (NO), is continually released by endothelial cells to regulate organ blood flow and perfusion pressure (Moncada *et al.*, 1991). NO is derived from L-arginine through NO synthase (NOS). Various inhibitors of NOS have been shown to increase the normoxic pulmonary vascular tone in some (Archer *et al.*, 1989; Perella *et al.*, 1992) but not all experiments (Barnard *et al.*, 1993; Hasunuma *et al.*, 1991a; Nishiwaki *et al.*, 1992).

Alveolar hypoxia is an important regulator of pulmonary vascular tone and causes vasoconstriction mainly in small pulmonary arteries. Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a mechanism intrinsic to the pulmonary vascular smooth muscle (Madden *et al.*, 1992), but it is modulated by various agents, including substances released from the endothelium. The role of NO in the pulmonary circulation during hypoxia has been debated. However, the inhibition of NO synthesis increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in intact lungs, suggesting an increased NO synthesis in response to hypoxia and/or vasoconstriction (Archer *et al.*, 1989).

The calcium and potassium channels seem also to play a role in the mechanism of HPV. Potassium channel blockers and openers cause pulmonary vasoconstriction (Hasunuma *et al.*, 1991b; Post *et al.*, 1992) and vasodilatation (Chang *et al.*, 1992), respectively, largely through their effects on the membrane potential and the calcium channels. It has been proposed that hypoxia might inhibit outward potassium current in pulmonary smooth muscle cells, causing membrane depolarization and thus permitting calcium entry through the voltage-dependent calcium channels sensitive to dihydropyridine (Weir & Archer, 1995). Calcium channel blockers like verapamil, a phenylalkylamine, have been shown to inhibit HPV (McMurtry *et al.*, 1976) but Young *et al.* (1983) did not observe this inhibition with verapamil whereas nifedipine, a dihydropyridine, appeared to be a more effective pulmonary vasodilator. Finally, the links between calcium and potassium channels and NO have been underlined recently (Zhao *et al.*, 1997).

Segmental differences in vasomotor reactivity are well documented in the pulmonary vasculature. Hypoxia causes sustained constriction in resistance pulmonary arteries (Madden *et al.*, 1992) while causing a biphasic response in conduit pulmonary arteries (Bennie *et al.*, 1991). Investigations on resistance vessels have been performed mainly *in vitro* on small isolated pulmonary artery rings. Studies of the peripheral pulmonary circulation are difficult

to perform *in vivo*. Some authors investigated the relationship between pressure and flow in the pulmonary circulation *in vivo* for a lobe *in situ* (Kadowitz *et al.*, 1989), but the preparation includes the most part of the conduit vessels and the flow changes induce modifications of other variables. We studied the pressure-flow relationship in a small peripheral portion of the pulmonary vascular bed, excluding most of the conduit arteries, where pressure could be pharmacologically modified without interfering with the rest of the circulation (Schrijen *et al.*, 1993). This technique was used to study, during normoxia or acute normocapnic hypoxia, the action of NO pathway by the administration of sodium nitroprusside (SNP), an NO donor, or by inhibition of NOS by N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). The role of calcium channels was studied by a blockade with verapamil, nifedipine and nicardipine, and the role of potassium channels by the administration of potassium openers, levcromakalim and nicorandil, (the last one is both a potassium opener and an NO donor) on the peripheral pulmonary vasculature.

Material and Methods

All experiences were conducted according to the “Guiding Principles in the care and Use of Animals”, as approved by the council of the American Physiological Society.

Peripheral pulmonary vascular resistance model

The system used has been described previously in detail (Schrijen *et al.* 1993). Anaesthesia was induced with an initial dose of 20 mg.kg⁻¹ thiopental i.v., and maintained by slow-rate infusion (14 mg.kg⁻¹.h⁻¹), with an electric syringe (Vial SE 400, France). The dogs were intubated with a cuffed tracheal cannula ; they breathed spontaneously. Ventilation was monitored with a Fleisch pneumotachograph n°1, expired O₂ with Servomex analyzer (Crowborough, U.K.), and expired CO₂ with a CO₂-test (Jaeger, Würzburg, Germany). Under sterile conditions, a femoral artery was cannulated with a catheter and an external jugular vein with two catheters : a conventional Swan-Ganz thermodilution catheter, with the proximal lumen opening at 20 cm from the tip, and a 7F custom-made balloon catheter with both lumens extending to the tip (part No 600518 model, American Edwards Laboratories, Santa Ana, CA, U.S.A.). Both catheters were advanced, under X-ray, pressure and ECG control, into the pulmonary artery. The thermodilution catheter tip was advanced until a wedge pressure could be obtained by balloon inflation (the proximal lumen was then in the right atrium). The double lumen catheter was advanced until it wedged itself in a peripheral pulmonary artery, i.e. when the internal diameter of the artery was equal to the external diameter of the catheter (2.3 mm).

The catheters were periodically flushed with heparinized saline (1 ml heparin, *i.e.*, 5,000 I.U., in 500 ml saline). The vascular pressures were measured with inductance manometers, monitored together with ECG on an oscilloscope (Gould Windograph 980), and a Gould 3600 recorder (Cleveland, OH, U.S.A.). The transducers were placed 5 cm above the table plane. Only mean pressures were taken into account, they were obtained by electronic filtering over 3 respiratory cycles. Static calibration was checked after each experiment with a mercury manometer.

Femoral arterial pressure was continuously monitored. Pulmonary arterial, pulmonary wedge, and right atrial pressures, as well as cardiac output, were measured with the Swan-Ganz catheter. Blood samples were withdrawn simultaneously from both femoral and pulmonary arterial catheters to determine arterial and mixed venous blood gases. To determine the pressure/flow curve, one lumen of the double lumen catheter was connected with a pressure transducer, the other one with a peristaltic pump (Ismatec, Zurich, Switzerland). Blood was withdrawn through the pump from the distal lumen of the thermodilution catheter, which was lying free in the pulmonary artery. The blood flow was monitored with a Transonic Systems (Ithaca, NY, USA) flowmeter. Drugs or control solution (isotonic glucose 5%), were mixed with the blood infusion using an electric syringe (Vial SE 400, Grenoble, France). The catheters were primed with blood. To study the pressure/flow curves, blood flow was increased by steps from 0 to about 5, 8 and 10 ml/min, then decreased to 5 and 0. The drugs were infused at about 15% of these flows ; each flow was maintained for one minute at least, and the pressure was measured, after equilibration, at the end of each period. Using this model in preliminary experiments, we determined the concentration for each drug that could induce any change in the overall systemic or pulmonary circulation, and then for the study, we added drugs at 100 fold dilution for each maximal determined concentration to avoid any hemodynamic change. Thus, the highest concentration of the studied drugs were limited. For this reason, we were unable to determine the concentration-response curves over the entire range.

After the pressure/flow runs had been completed, contrast medium was slowly infused into the wedged catheter, until the draining vein was visualized. The volume infused was taken as a measurement of the volume of the wedged area. As contrast medium increased the PPVR (Chabot *et al.*, 1997), angiogram was always performed after the pharmacological study for each site.

The dogs breathed alternately, at random, room air or a hypoxic mixture with FIO₂ 0.10, FICO₂ 0.03, administered from a bag through a non-rebreathing valve.

Haemodynamic data were measured after 10 min hypoxic ventilation. During this time, blood flow was maintained in the wedged area. Then, the pressure/flow curve was determined.

At the end of the experiment, the special catheter was withdrawn, and blood was sampled from the pulmonary artery via the thermodilution catheter, to calibrate the flowmeter with a stop-watch and a graduated tube.

Derived variables :

The perfusion pressure (PP) during the flow runs was taken as the difference between the actual wedge pressure and the wedge pressure measured at zero flow.

Overall pulmonary vascular resistance (PVR, dyn.s.cm^{-5}) was computed as 80 (pulmonary artery - wedge pressure, mmHg)/cardiac output (l/min).

Peripheral pulmonary vascular resistance (PPVR, 10^3dyn.s.cm^{-5}) was determined applying the same formula to the local pressure/flow curve, with the PP taken at 5 ml/min flow.

Pharmacological studies

The results were obtained from 114 experiments in 24 dogs, weighing 24.9 ± 0.8 kg (mean \pm SEM). Control solutions were prepared from the solvents in the absence of active principle. Isotonic glucose (5%) was used both to dilute carrier solutions in the same manner as that used to dilute the drug solution and as control before each drug. The pH and the viscosity of the control solutions and the drug solution were the same.

Control experiments were performed with isotonic glucose (5%) repeated 4 times consecutively in the same areas (12 experiments). In separate experiments, the effects of L-NAME (10^{-7} , 10^{-5} and 10^{-3} M) were studied. The effects of sodium nitroprusside (10^{-7} , 10^{-5} and 10^{-3} M) were investigated alone and after L-NAME (10^{-3} M). To assess the effects of calcium channel inhibitors, the effects of verapamil (5.10^{-10} , 5.10^{-8} , 5.10^{-6} M), nifedipine (3.10^{-11} , 3.10^{-9} , 3.10^{-7} M) and nicardipine (2.10^{-10} , 2.10^{-8} , 2.10^{-6} M) were studied. In experiments designed to assess the effects of potassium channel openers, the effects of levcromakalim (10^{-8} , 10^{-6} and 10^{-4} M) and L-NAME (10^{-3} M) before nicorandil (10^{-8} , 10^{-6} and 10^{-4} M) were investigated.

Drugs

L-NAME and sodium nitroprusside were purchased from Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France). Verapamil was obtained from Knoll (Levallois-Perret, France), nifedipine from Bayer (Leverkusen, Germany), nicardipine from Sandoz (Basel, Switzerland). Levromakalim was kindly supplied by Smith Klein Beecham (Worthing, U.K.) and nicorandil by Bellon (Neuilly sur Seine, France). Drugs were solubilized in glucose 5% (L-NAME, sodium nitroprusside and nicorandil), in distilled water (levromakalim), in alcohol and polyethylen glycol (nifedipine) and in hydrochloric acid (nicardipine). Then an aliquot of these solutions was dissolved in isotonic glucose for obtaining the various concentrations used. All solutions were prepared just before use.

Statistical analysis

Differences between groups were tested by variance analysis, differences between periods by paired t-tests, and relations between variables by least squares regression analysis (Snedecor & Cochran, 1967). All values are expressed as mean \pm standard error.

RESULTS

The pressure/flow relationship was determined in 56 sites during normoxia and 58 during hypoxia. The volume of the wedged area was 0.65 ± 0.03 ml on average for the sites studied in air, and 0.61 ± 0.04 ml for those studied during hypoxia. Blood gases during normoxia were within normal limits (table 1). During hypoxia, PaCO₂ stayed unchanged, PaO₂ was reduced, and ventilation doubled with increased breathing frequency. Haemodynamic data are shown in table 2. They were within normal limits during normoxia. During hypoxia, pulmonary artery pressure and pulmonary vascular resistance increased significantly.

Effects of isotonic glucose. Peripheral pulmonary vascular resistance, computed from four consecutive curves with isotonic glucose showed no difference with time during normoxia (n=8) or hypoxia (n=4) (data not shown).

Effects of NOS inhibition and sodium nitroprusside. With L-NAME, PPVR increased under normoxia (n=5) and hypoxia (n=10), and with the highest concentration, PPVR reached the same value (Figure 1). The dose-response was significant in normoxia and in hypoxia ($p < 0.01$).

As shown in Figure 2, perfusion of sodium nitroprusside at 10^{-7} , 10^{-5} and 10^{-3} M, after L-NAME, induced a significant decrease in PPVR, during normoxia (n=5; $p < 0.001$) and hypoxia (n=4; $p < 0.05$).

During hypoxia, sodium nitroprusside from 10^{-7} M to 10^{-3} M decreased PPVR (n=4; $p = 0.07$) (Figure 3).

Effects of calcium channel blockers. During normoxia, verapamil (n=5, Figure 4), nifedipine (n=9, Figure 5), or nicardipine (n=7, Figure 6) did not change PPVR. During normocapnic hypoxia verapamil (n=5) tended to cause a decrease in PPVR. Nifedipine (n=5) caused a significant decrease in PPVR ($p < 0.01$). These changes were significantly related to the control value of PPVR during hypoxia ($r = 0.78$, $p < 0.01$). The changes with nicardipine were of the same kind as with nifedipine: during hypoxia (n=9), PPVR decreased by $34 \pm 13\%$ ($p = 0.04$). These changes due to nicardipine were also closely related to the control value of PPVR during hypoxia ($r = 0.91$, $p < 0.001$).

Effects of potassium channel openers. Levromakalim from 10^{-8} to 10^{-4} M (25 experiments) did not induce a significant change in PPVR, during normoxia (n=13) or hypoxia (n=12), as shown in Figure 7.

After an increase in PPVR with L-NAME at 1 mM, nicorandil from 10^{-8} , 10^{-6} to 10^{-4} M, induced a decrease in PPVR. The dose-response was significant both during normoxia (n=4; $p < 0.05$) and hypoxia (n=4; $p < 0.02$) (Figure 8).

The summary of the effects of the various stimuli is shown in Table 3. We did not observe any significant decrease in the peripheral pulmonary vascular tone with a vasodilator when the pulmonary vascular tone was not increased before the vasodilator was perfused. L-NAME induced an impressive increase in the PPVR. After an increase in the PPVR with L-NAME or during hypoxia, vasodilator agents induced a decrease in the PPVR but the PPVR did not reach the control value.

DISCUSSION

This study assessed the effects of various vasoactive drugs acting on the NO pathway, Ca and K channels during normoxia and hypoxia, on the peripheral pulmonary circulation, in anaesthetised intact dogs. In our preparation, we observed the effects of drugs in a small portion of the lung vasculature, peripheral to a pulmonary artery with a 2.3 mm inner diameter. The amount of drug infused was too low to generate any effect on the systemic or overall pulmonary circulation. Our results show that 1/ L-NAME caused an increase in the peripheral pulmonary vascular tone, potentiated the pulmonary vasoconstrictor response to hypoxia and did not modify the vasodilation to sodium nitroprusside, 2/ the calcium channel blockers dihydropyridines decreased the PPVR during hypoxia, 3/ potassium channel openers did not modify PPVR, during normoxia or acute hypoxia.

Some of our data are in agreement with those provided by other models. Our results confirmed the importance of NO pathway and, during acute hypoxia, the importance of calcium channels in the peripheral lung vasculature, *in vivo*. The role of NO as a modulator of vascular tone in the pulmonary vascular bed has been demonstrated but its real importance is still debated, presumably because of differences in species and experimental conditions. The reported effects of NO inhibitors on the normoxic pulmonary circulation have been variable. In adult animals, acute administration of arginine analogs did not influence pulmonary vascular tone in perfused dog lungs (Barnard *et al.*, 1993), in conscious dogs (Nishiwaki *et al.*, 1992), and in intact anaesthetized dogs (Leeman *et al.*, 1994), and). In other studies, however, inhibitors of NO synthesis increased normoxic pulmonary vascular tone. N^w-monomethyl-L-arginine, another NOS inhibitor, increased pulmonary vascular resistance (Perella *et al.*, 1992), and in isolated blood-perfused rabbit lungs, L-NAME increased the pulmonary vascular resistance and the slope of the pressure-flow relationship (Sprague *et al.*, 1995). In response to acute hypoxia, the effects of NO synthesis inhibitors have been shown to potentiate the pulmonary vasoconstriction in isolated lungs (Hasunuma *et al.*, 1991a) and in intact anaesthetized dogs (Perella *et al.*, 1992 ; Leeman *et al.*, 1994).

In our study, L-NAME did also significantly increase normoxic and hypoxic pulmonary vascular tone. Our results show that, *in vivo*, the effects of NOS blockade by L-NAME were the same during normoxia and during hypoxia and suggest that the background production of NO is important in the modulation of the peripheral pulmonary vascular tone in the dog. The low pulmonary vascular tone could be related to a basal release of NO during normoxia, and during hypoxia the NO release would remain although the vascular tone was increased, this would attenuate the pulmonary vasoconstriction.

Sodium nitroprusside inhibited the hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs, as estimated by the pulmonary arterial pressure/cardiac output relationship (Naeije *et al.*, 1987). Moreover, sodium nitroprusside was an effective vasodilator of all pulmonary vessels with the exception of the smallest arteries in a model of sheep isolated pulmonary arteries and veins (Kemp *et al.*, 1997). Another NO donor, S-nitroso-N-acetylpenicillamine showed a dilator action in the isolated perfused rat lung during hypoxia, and was not consistently affected by blockade of endogenous release by L-NAME (Emery *et al.*, 1995). Our results in the peripheral lung vasculature were consistent with these since sodium nitroprusside decreased the PPVR during hypoxia, and the decrease was not modified by L-NAME. Moreover, as increased pulmonary vascular tone (with L-NAME) was reduced by sodium nitroprusside, during normoxia and hypoxia, our results confirmed that exogenous NO was able to induce a decrease in the peripheral pulmonary vascular tone (Kemp *et al.*, 1997).

Our results about calcium channel inhibitors also are in agreement with those provided with other models. The effects of verapamil, nifedipine and nicardipine on the PPVR were dependent on vascular tone : these drugs were ineffective in normoxia, and during acute hypoxia the vasodilation they produced was related to the increased resistance value. However, vasodilator action did reach statistical significance for dihydropyridines only. During normoxia, verapamil had no significant effect in sheep (Demiryurek *et al.*, 1991) and human (Demiryurek *et al.*, 1993) isolated pulmonary artery rings, and in isolated dog lung (El-Kashef *et al.*, 1990). In anaesthetised dogs, verapamil and nifedipine did not change the pulmonary vascular tone in normoxia (Young *et al.*, 1983). Several lines of evidence suggest an important role for voltage-dependent calcium channels during acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. The voltage-dependent calcium channel potentiator BAY K 8644 enhances the hypoxic pulmonary response, both in isolated perfused rat lungs and in anaesthetized dogs (Tolins *et al.*, 1986). Verapamil inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs (McMurtry *et al.*, 1976) although in human pulmonary artery rings, it blocks hypoxic vasoconstriction either partially (Ohe *et al.*, 1992) or not at all (Demiryurek *et al.*, 1993). Several studies have been performed with dihydropyridines, because they have a bigger vascular selectivity than phenylalkylamines. Although verapamil did not induce any significant change in the pulmonary vascular tone in anaesthetised dogs, nifedipine decreased pulmonary vascular resistance (Young *et al.*, 1983). In anaesthetised cats, nifedipine also was more potent than verapamil in reducing the pulmonary vascular resistance, at the infusion rates which cause no or little haemodynamic changes (Erdemli *et al.*, 1994). The results of these studies as well as ours demonstrated that calcium channel inhibitors decreased the

increased hypoxic pulmonary vascular tone. Moreover, our results showed that these conclusions can be extended to the peripheral pulmonary vasculature.

Our results did not confirm a vasodilating action of potassium channel openers in the peripheral pulmonary circulation. Several studies suggest the role of K^+ channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction (Hasunuma *et al.*, 1991b; Post *et al.*, 1991). Cromakalim induced vasodilation of precontracted pulmonary vascular bed (Erdemli *et al.*, 1994). Levocromakalim, the active enantiomer of cromakalim, and nicorandil produce a relaxation of smooth muscle as a consequence of K^+ channel opening producing a loss of cytosolic K^+ , cellular hyperpolarisation and closing of voltage dependent calcium channel with functional relaxation : the potassium channel openers activate ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP} channels) in vascular smooth muscle (Nelson & Quayle, 1995). Levocromakalim and cromakalim have a relaxant activity in K^+ -precontracted pulmonary vessels (Dumas *et al.*, 1993) and in hypoxic pulmonary vasoconstriction (Wiener *et al.*, 1991), respectively. Dumas *et al.* (1996) found that nicorandil caused vasorelaxation on hypoxic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused lung of rat. Among the vasodilators, nicorandil is of special interest because this drug has at least two mechanisms of action. It increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) through a nitrate-like effect and enhances membrane potassium conductance by opening K_{ATP} channel. Our experiments demonstrate that nicorandil decreased PPVR. However, it is not easy to discriminate between its effect as an NO donor and as a K_{ATP} channel opener. Our results did not show any effect of levocromakalim on PPVR, during both normoxia and hypoxia, whereas sodium nitroprusside decreased the PPVR, suggesting that in our preparation the effects of nicorandil were due principally to its NO donor properties and that the role of the K_{ATP} channel was not important in the control of the peripheral pulmonary vascular tone during both normoxia and moderate acute normocapnic hypoxia. Our results are in agreement with those of Hasunuma *et al.* (1991), and Dumas *et al.* (1996) who found that K_{ATP} channels were inactive in normoxia. Contrasting data were reported during hypoxia. Although there is evidence that K_{ATP} channel openers induced vasodilatation during severe hypoxia *i.e.* PiO_2 below 35 mmHg (Wiener *et al.*, 1991; Dumas *et al.*, 1993; Dumas *et al.*, 1996), it is apparently not a major component of pulmonary vasoregulation when hypoxia is less severe (Hasunuma *et al.*, 1991).

Contrasting data reported regarding the effects of various drugs on the pulmonary vascular tone may be due to both the diversity in experimental conditions and the regional vasoreactivity. Kemp *et al.* (1997) recently demonstrated in sheep that the reactivity to many vasoconstrictors and vasodilators was not uniform along isolated pulmonary vessels. In the

present study, most of the conduit arteries were excluded from the portion of the pulmonary vascular bed under study. This model allowed to study the peripheral lung vasculature during normoxia and mild hypoxia. Recent evidence underlined regional differences in pulmonary vasoreactivity (Archer *et al.*, 1996 ; Kemp *et al.*, 1997). The pulmonary myocytes in conduit and resistance arteries of rat and their response to NO and hypoxia were compared (Archer *et al.*, 1996). In conduit arteries the calcium activated K channels (K_{ca} channels) are predominant, whereas resistance arteries have a majority of delayed rectifier potassium (K_{DR}) channels but no K_{ATP} cell was identified. In our experiments, we operated on a peripheral portion of the pulmonary vascular bed, where the arteries are mainly resistance arteries. As we did not find any activity of K_{ATP} channels openers, our results are consistent with those of Archer *et al.* (1996).

The comparison of RVPP differences with the vasodilators and vasoconstrictor agents studied here *in vivo*, demonstrated that, in our model, the peripheral pulmonary vasoreactivity to vasodilator agents was moderate. The absent or very low basal pulmonary vascular tone could explain the absence of effects from vasodilator drugs when pulmonary vascular tone was not previously increased, and their moderate effects despite increased pulmonary vascular tone by hypoxia and vasoconstrictive drugs.

Our finding that the peripheral pulmonary vasculature during acute hypoxia failed to totally relax to calcium channel blockers confirms previous work (Leach *et al.*, 1990; Kemp *et al.*, 1997). The reason for this small response is unclear, but was observed also with NO and β adrenoceptor-mediated relaxation in other models (Kemp *et al.*, 1997).

In summary, we reported the effects of several vasoactive drugs on the peripheral pulmonary circulation without any effect on the systemic or overall pulmonary circulation, *in vivo*, in anaesthetised intact dogs, during normoxia and during mild acute normocapnic hypoxia. Our results underline the role of NO pathway, and the lack of functional K_{ATP} channels in peripheral pulmonary circulation during normoxia and during acute hypoxia. The role of calcium channels seems essential during mild acute hypoxia in the peripheral lung vasculature. This study has demonstrated that the peripheral pulmonary vasculature displayed little reactivity to vasodilator drugs.

Acknowledgements

The authors thank F. Poincelot and J. Lambert for skillful assistance, B. Clement for typing the manuscript, and M.C. Rohrer for drawing the figures.

REFERENCES

- ARCHER, S., TOLINS, J., RAIJ L. & WEIR, E. (1989). Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 1198-1205.
- ARCHER, S.L., HUANG, J.M.C., REEVE, H.L., HAMPL, V., TOLAROVA, S., MICHELAKIS, E. & WEIR, E.K. (1996). Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ. Res.*, **78**, 431-442
- BARNARD, J.W., WILSON, P.S., MOORE, T.M., THOMPSON, W.J. & TAYLOR, A.E. (1993). Effect of nitric oxide and cyclooxygenase products on vascular resistance in dogs and rat lungs. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 2940-2948.
- BENNIE, R.E., PACKER, C.S., POWELL, D.R., JIN, N. & RHOADES, R.A. (1991). Biphasic response of pulmonary artery to hypoxia. *Am. J. Physiol.*, **261**, L156-L163.
- CHABOT, F., SAUNIER, C. & SCHRIJEN, F. (1997). Changes in peripheral pulmonary vascular resistance after ioxaglate infusion in anaesthetized dogs. *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, **75**, 15-18.
- CHANG, J.K., MOORE, P., FINEMAN, J.R., SOIFER, S.J. & HEYMANN, M.A. (1992). K⁺ channel pulmonary vasodilation in fetal lambs: role of endothelium-derived nitric oxide. *J. Appl. Physiol.*, **73**, 188-194.
- DEMIRYUREK, A.T., WADSWORTH, R.M. & KANE, K.A. (1991). Pharmacological evidence for the role of mediators in hypoxia-induced vasoconstriction in sheep isolated intrapulmonary artery rings. *Eur. J. Pharmacol.*, **203**, 1-8.
- DEMIRYUREK, A.T., WADSWORTH, R.M., KANE, K.A. & PEACOCK, A.J. (1993). The role of endothelium in hypoxic constriction of human pulmonary artery rings. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, 283-290.
- DUMAS, M., DUMAS, J.P., ADVENIER, C. & GIUDICELLI, J.F. (1993). Effect of three K⁺ channel openers on airways and pulmonary circulation in the isolated guinea-pig lung. *Europ. J. Pharmacol.*, **239**, 141-147.
- DUMAS, M., DUMAS, J.P., ROCHETTE, L., ADVENIER, C. & GIUDICELLI, J.F. (1996). Comparison of the effects of nicorandil, pinacidil and nitroglycerin on hypoxic and hypercapnic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused lung of rat. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 633-638.

- EL-KASHEF, H.A., HOFMAN, W.F. & EHRHART, I.C. (1990). Verapamil inhibition of serotonin-induced vasoconstriction in dog lung. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **15**, 729-735.
- EMERY, C.J. (1995). Vasodilator action of the S-nitrosothiol, SNAP, in rat isolated perfused lung. *Physiol. Res.*, **44**, 19-24.
- ERDEMLI O., HAO, Q., CAI, B., LIPPTON, H.L. & HYMAN, A. (1994). Influence of nifedipine, verapamil and diltiazem on pulmonary vascular resistance and vasoconstrictors in cats. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.*, **328**, 165-179.
- HASUNUMA, K., YAMAGUCHI, T., RODMAN, D.M., O'BRIEN, R.F. & McMURTRY, I.F. (1991a). Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)*, **260**, L97-L104.
- HASUNUMA, K., RODMAN, D.M. & McMURTRY, I.F. (1991). Effects of K⁺channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **144**, 884-887.
- KADOWITZ, P.J., LIPPTON, H.L., BELLAN, J.A. & HYMAN, A.L. (1989). Nisoldipine inhibits vasoconstrictor responses in the cat pulmonary vascular bed. *J. Appl. Physiol.*, **66**, 2885-2890.
- KEMP, B.K., SMOLICH, J.J. & COCKS, T.M. (1997). Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and veins. *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 441-450.
- LEACH, R.M., TWORT, C.H.C., CAMERON, I.R. & WARD, J.P.T. (1990). The mechanism of action on endothelin-1 on small pulmonary arterial vessels. *Pulm. Pharmacol.*, **3**, 103-109.
- LEEMAN, M., ZEGERS DE BEYL, V., DELCROIX, M. & NAEIJE, R. (1994). Effects of endogenous nitric oxide on pulmonary vascular tone in intact dogs. *Am. J. Physiol.*, **266**, H2343-H2347.
- MADDEN, J.A., VADULA, M.S. & KURUP, V.P. (1992). Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, **263**, L384-L393.
- McMURTRY, I.F., DAVIDSON, A.B., REEVES, J.T. & GROVER, R.F. (1976). Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ. Res.*, **38**, 99-104.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.

- NAEIJJE, R., LEJEUNE, P., LEEMAN, M., MELOT, C. & DELOOF, T. (1987). Pulmonary arterial pressure-flow in dogs: effects of isoflurane and nitroprusside. *J. Appl. Physiol.*, **63**, 969-977.
- NELSON, M.T. & QUAYLE, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **268**, C799-C822.
- NISHIWAKI, K., NYHAN, D.P., ROCK, P., DESAI, P.J., PETERSON, W.P., PRIBBLE, C.G. & MURRAY, P.A. (1992). N^w-nitro-L-arginine and pulmonary vascular pressure-flow relationship in conscious dogs. *Am. J. Physiol.*, **262**, H1331-H1337.
- OHE, M., OGATA, M., KATAYOSE D. & TAKISHIMA, T. (1992). Hypoxic contraction of pre-stretched human pulmonary artery. *Resp. Physiol.*, **87**, 105-114.
- PERELLA, M.A., EDELL, E.S., KROWKA, M.J., CORTESES, D.A. & BURNETT, J.C., Jr. (1992). Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia. *Am. J. Physiol.*, **263**, R45-R50.
- POST, J.M., HUME, J.R., ARCHER, S.L. & WEIR, E.K. (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.*, **262**, C882-890.
- SCHRIJEN, F., SAUNIER, C. & CHABOT, F. (1993). Peripheral pulmonary vascular resistance. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 613-616.
- SPRAGUE, R.S., STEPHENSON, A.H., DIMMITT, R.A., WEINTRAUB, N.A., BRANCH, C.A., McMURDO, L. & LONIGRO, A.J. (1995). Effect of L-NAME on pressure-flow relationship in isolated rabbit lungs: role of red blood cells. *Am. J. Physiol.*, **269**, H1941-H1948.
- TOLINS, M., WEIR, E.K., CHESLER, E., NELSON, D.P. & FROM, A.H.L. (1986). Pulmonary vascular tone is increased by a voltage-dependent calcium channel potentiator. *J. Appl. Physiol.*, **60**, 942-948.
- WEIR, E.K. & ARCHER, S.L. (1995). The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J.*, **9**, 183-189.
- WIENER, C.M., DUNN, A. & SYLVESTER, J.T. (1991). ATP-dependent K⁺ channels modulate vasoconstrictor responses to severe hypoxia in isolated ferret lungs. *J. Clin. Invest.*, **88**, 500-504.
- YOUNG, T.E., LUNDQUIST, L.J., CHESLER, E. & WEIR, E.K. (1983). Comparative effects of nifedipine, verapamil, and diltiazem on experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Cardiol.*, **51**, 195-200.

ZHAO, Y.J., WANG, J., RUBIN, L.J. & YUAN, X.J. (1997). Inhibition of K_v and K_{Ca} channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am. J. Physiol.*, **272**, H904-H912

Figure 1 : Effect of L-NAME (LN) on PPVR. L-NAME increased PPVR with a significant dose-response during normoxia (o, n=5) and during hypoxia (*, n=10). Results are expressed as mean and standard error of 5-10 separate experiments. A statistically significant difference was found by 2-way ANOVA between the responses of PPVR to L-NAME during normoxia ($p < 0.01$, **) and during hypoxia ($p < 0.001$, ***). No significant difference was seen between normoxia and hypoxia.

Figure 2 : Effects of sodium nitroprusside (SNP) after L-NAME (LN) on PPVR. L-NAME at 1 mM increased PPVR during both normoxia (o, n=5) and hypoxia (*, n=4). A statistically significant difference was found by 2-way ANOVA between the responses of PPVR to L-NAME at 1 mM, during normoxia ($p < 0.001$, ***) and during hypoxia ($p < 0.05$, *) as well as to sodium nitroprusside at 10^{-7} , 10^{-5} and 10^{-3} M, after L-NAME, during normoxia and during hypoxia ($p < 0.05$, *). Results are the mean of 5 (normoxia) or 4 (hypoxia) separate experiments and vertical lines show standard error of the mean. No significant difference was seen between normoxia and hypoxia.

Figure 3 : Effect of sodium nitroprusside (SNP) on the PPVR during hypoxia. Sodium nitroprusside, from 10^{-7} M to 10^{-3} M decreased PPVR but the difference did not reach statistical difference ($p = 0.07$). Results are the mean of 4 separate experiments and vertical lines show standard error of the mean.

Figure 4 : Effect of verapamil (V) on PPVR in air (o, n=5) and during acute hypoxia (*, n=5). Verapamil did not change PPVR in air and tended to cause a decrease in PPVR during acute hypoxia. Results are the mean of 5 (normoxia) or 5 (hypoxia) separate experiments; vertical lines show standard error of the mean. No significant difference was seen between the responses to verapamil during normoxia or during hypoxia.

Figure 5 : Effect of nifedipine (Nif) on PPVR during normoxia (o, n=5) and hypoxia (*, n=5). Nifedipine did not change the PPVR during normoxia. A statistically significant difference ($p < 0.01$, **) was found by 2-way ANOVA between the responses of PPVR from control to nifedipine at $3 \cdot 10^{-7}$ M during hypoxia. Results are the mean of 9 (normoxia) or 5 (hypoxia) separate experiments and vertical lines show standard error of the mean. A statistically significant difference was found between normoxia and hypoxia by 2 way ANOVA ($p < 0.001$) and by unpaired t test after nifedipine at the concentrations illustrated ($p < 0.05$, *).

Figure 6 : Effect of nicardipine (NC) on PPVR during normoxia (o, n=7) and hypoxia (*, n=9). Nicardipine did not change PPVR in air. A statistically significant difference ($p < 0.05$, *) was found by 2-way ANOVA between the responses of PPVR from control to nicardipine at $2 \cdot 10^{-6}$ M during hypoxia. Results are the mean of 7 (normoxia) or 9 (hypoxia) separate experiments and vertical lines show standard error of the mean. No significant difference was seen between normoxia and hypoxia.

Figure 7 : Effect of levromakalim (LCK) on PPVR during normoxia (o, n=13) and hypoxia (*, n=12). Levromakalim from 10^{-8} to 10^{-4} M did not induce a significant change in PPVR, during normoxia or hypoxia. Results are the mean of 13 (normoxia) or 12 (hypoxia) separate experiments and vertical lines show standard error of the mean.

Figure 8 : Effects of nicorandil (Nic) after L-NAME (LN) on PPVR during normoxia (o, n=4) and hypoxia (*, n=4). A statistically significant PPVR change was found by 2-way ANOVA after L-NAME at 1 mM, during normoxia ($p < 0.001$, ***) and during hypoxia ($p < 0.01$, **) as well as after nicorandil at 10^{-8} M, 10^{-6} M and 10^{-4} M, after L-NAME, during normoxia and hypoxia ($p < 0.05$, *). Results are the mean of 4 (normoxia) or 4 (hypoxia) separate experiments and vertical lines show standard error of the mean. No significant difference was seen between normoxia and hypoxia.

Table 1

Blood gases and ventilation

	Normoxia	Hypoxia	p
pH	7.34 ± 0.01	7.35 ± 0.01	
PaCO ₂ (mmHg)	37.3 ± 0.5	35.6 ± 0.6	
PaO ₂ (mmHg)	84 ± 1	45 ± 1	NA
\dot{V} (l/min)	6.3 ± 0.3	14.0 ± 0.6	< 0.001
f (c/min)	21 ± 1	28 ± 2	< 0.01

\dot{V} : minute ventilation; f : breathing frequency; NA : not applicable

Table 2

Haemodynamic data

	Normoxia	Hypoxia	p
\bar{P}_a (mmHg)	159 ± 2	165 ± 3	
HR (b/min)	202 ± 4	200 ± 4	
\dot{Q} (l/min)	4.9 ± 0.2	4.7 ± 0.2	
\bar{P}_{pa} (mmHg)	20 ± 1	24 ± 1	< 0.001
\bar{P}_w (mmHg)	9 ± 0.3	9 ± 0.3	
PVR (dyn s cm ⁻⁵)	181 ± 10	269 ± 14	< 0.001
PPVR (10 ³ .dyn s cm ⁻⁵)	101 ± 9	126 ± 10	< 0.05

\bar{P}_a : mean systemic arterial pressure; HR : heart rate; \dot{Q} : cardiac output; \bar{P}_{pa} : mean pulmonary artery pressure; \bar{P}_w : mean wedge pressure; PVR : pulmonary vascular resistance; PPVR : peripheral pulmonary vascular resistance.

Table 3

PPVR difference between control and drugs

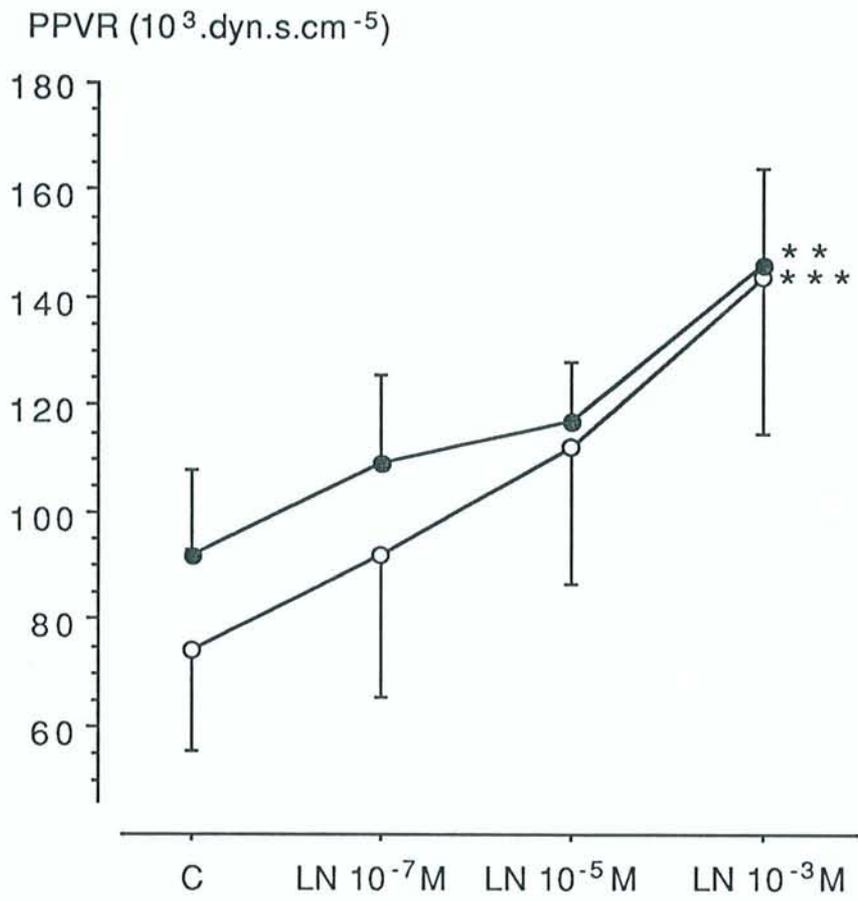
	Normoxia		Hypoxia	
L-NAME	70 ± 18*	(+126%)	55 ± 21*	(+96%)*
SNP after L-NAME†	-35 ± 19	(-20%)*	-30 ± 8*	(-23%)**
SNP			-67 ± 26	(-37%)
Verapamil	-17 ± 16	(-3%)	-48 ± 37	(-21%)
Nifedipine	2 ± 9	(+12%)	-31 ± 10*	(-26%)*
Nicardipine	10 ± 21	(+38%)	-60 ± 40*	(-34%)
Levcromakalim	0 ± 14	(0%)	+7 ± 14	(+20%)
Nicorandil after L-NAME †	-31 ± 10*	(-20%)	-20 ± 5*	(-13%)*

"Difference" refers to the mean absolute RVPP difference ($10^3 \cdot \text{dyn s cm}^{-5}$) between the highest drug concentration, and control or L-NAME. The % difference is this value divided by the control (or L-NAME) PPVR.

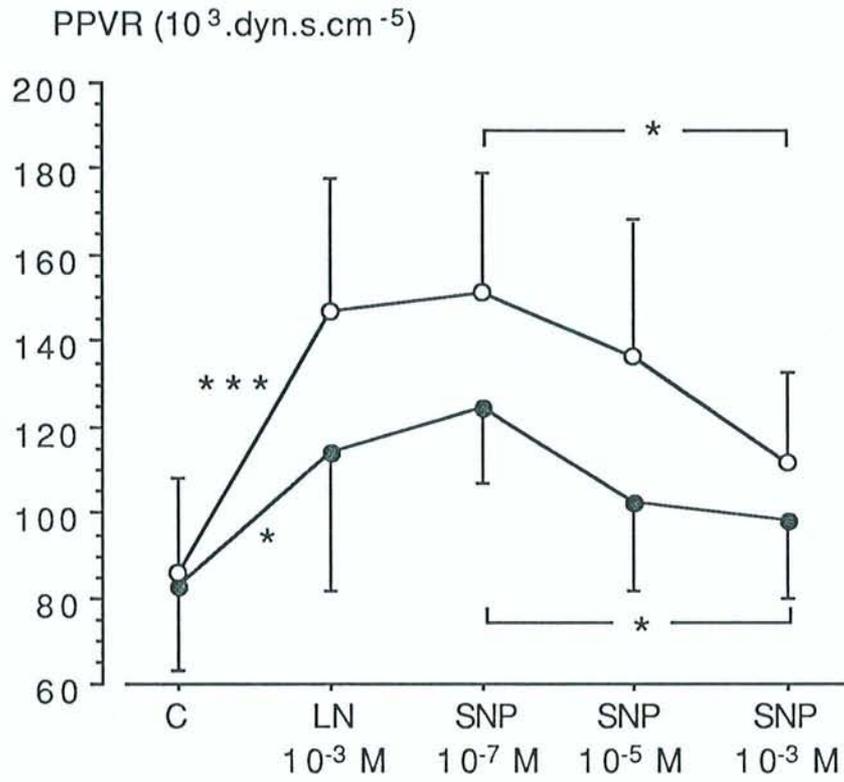
Statistical significance of the differences: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

† difference from L-NAME; SNP: sodium nitroprusside

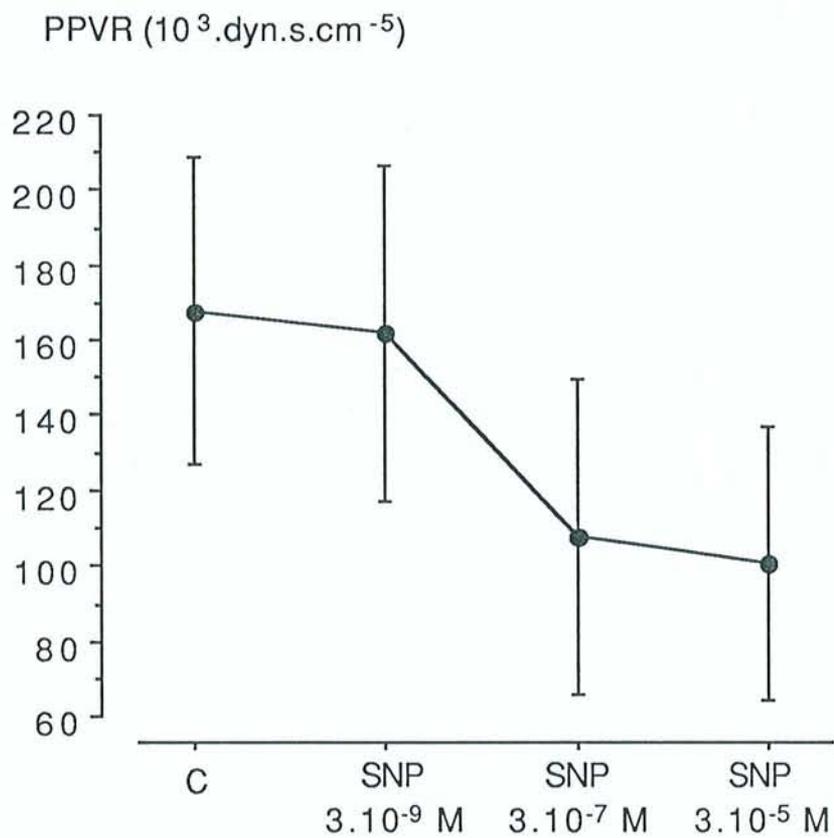
L-NAME



Sodium nitroprusside after L-NAME

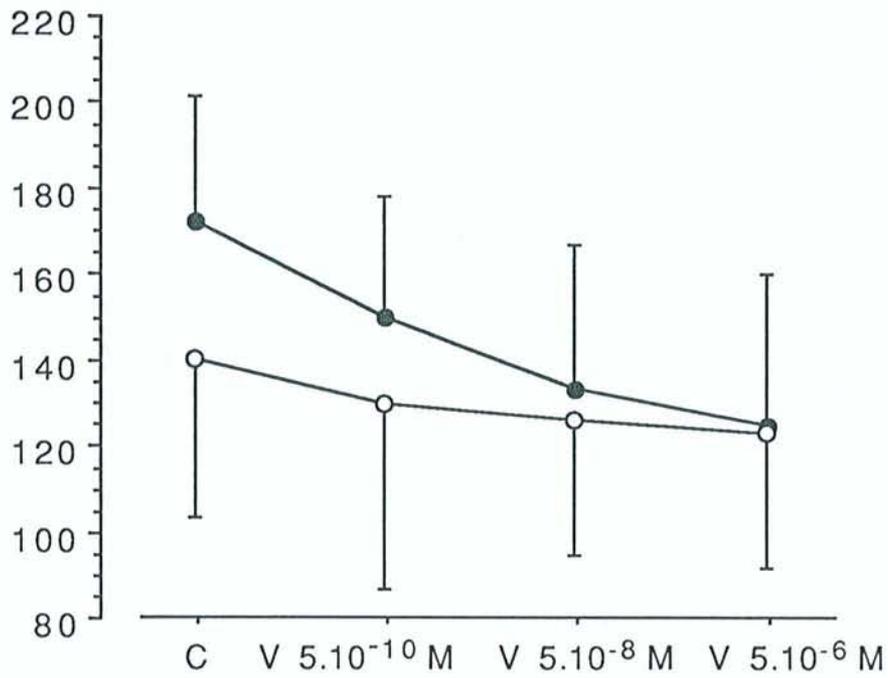


Sodium nitroprusside during hypoxia



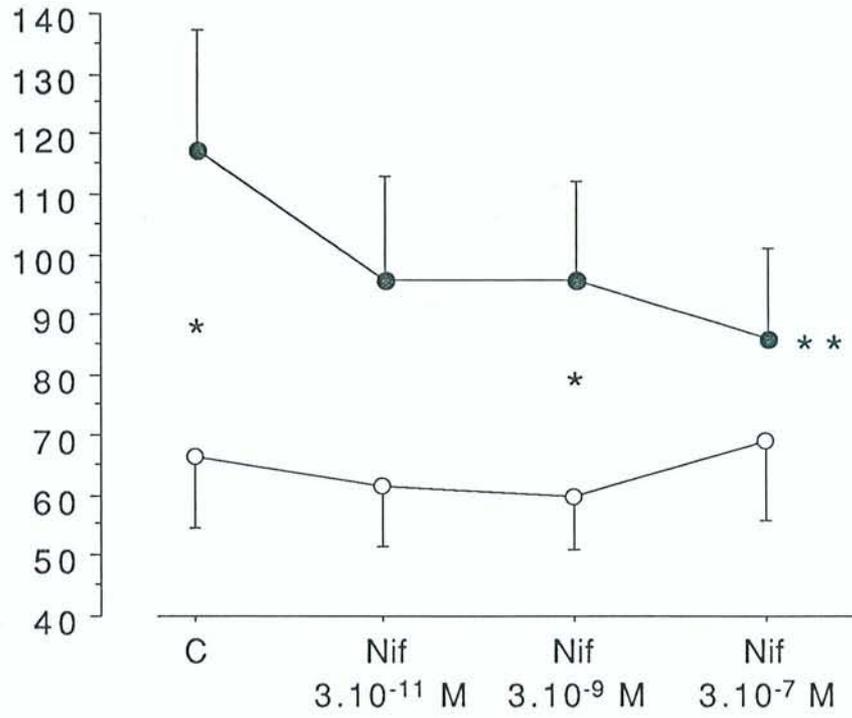
Verapamil

PPVR ($10^3 \cdot \text{dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$)

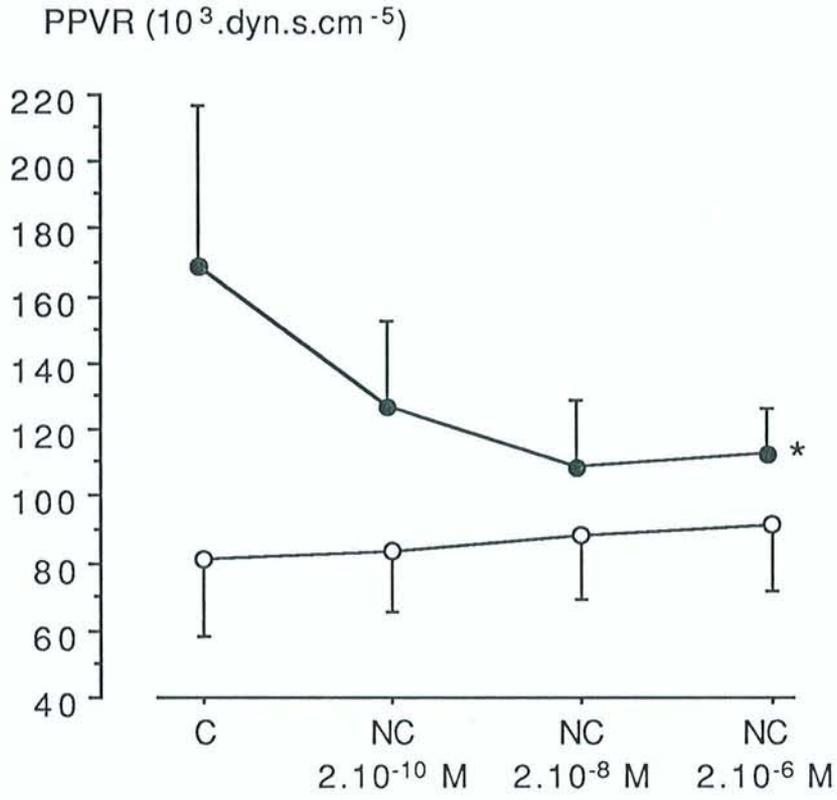


Nifedipine

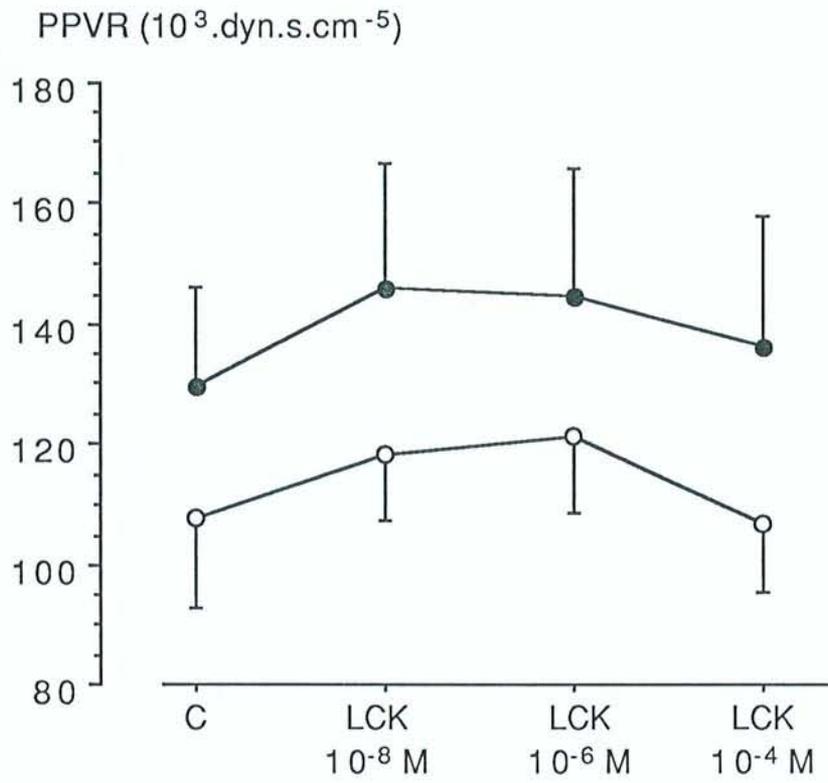
PPVR ($10^3 \cdot \text{dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$)



Nicardipine

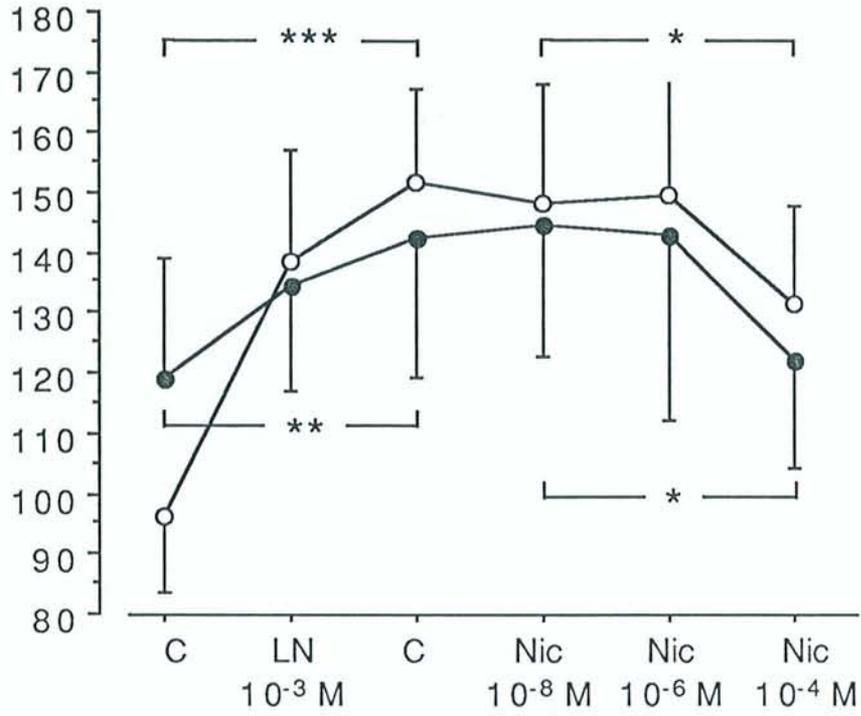


Levcromakalim



Nicorandil after L-NAME

PPVR ($10^3 \text{ dyn.s.cm}^{-5}$)



EFFECT OF VERAPAMIL ON PERIPHERAL PULMONARY VASCULAR RESISTANCE IN ANAESTHETISED DOGS: ROLE OF THE ROUTE OF ADMINISTRATION.

F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot
Unité 14 INSERM, Vandoeuvre lés Nancy, France.

In 5 anaesthetised dogs spontaneously breathing, mixed venous blood was infused at known flows in a peripheral portion of the lung vasculature (vascular volume: about 0.75 ml) to study the pressure/flow relation and to compute the peripheral pulmonary vascular resistance (PPVR). The pressure/flow curves were determined after local infusion of glucose or verapamil solution, after local infusion of glucose or verapamil mixed with the blood infusion, and after verapamil infusion into the general circulation. The local infusion mixed with the blood infusion was repeated while the dogs breathed a hypoxic mixture (FIO₂ 0.10, FICO₂ 0.03). After local infusion of verapamil (diluted in glucose), PPVR showed a dose-related increase, by 35% with 10⁻¹⁰M and 62% with 10⁻⁶M. When verapamil was mixed with the blood infusion, no change was observed during normoxia. Hypoxia produced a 55% increase in the total pulmonary vascular resistance, and a 24 % increase in RVPP. Verapamil then caused a progressive decrease in PPVR, of 22% with 10⁻⁶M. A 10% decrease in PPVR was observed with verapamil infusion into the general circulation. These results show that, in our preparation, verapamil administered directly into the peripheral pulmonary artery produced an unexpected PPVR increase. On the contrary, when mixed with blood, it produced the expected effect on the peripheral pulmonary circulation, namely a vasodilation when the vessel tone had been increased with hypoxia.

International Symposium Pulmonary Circulation VI,
Prague, 26-29 juin 1994.

P1267

EFFECT OF NICARDIPINE ON PERIPHERAL PULMONARY RESISTANCE IN ANAESTHETISED DOGS

F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot. Unité 14 INSERM, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

The pressure/flow relation can be studied in a peripheral portion of the lung vasculature, using a double lumen catheter wedged in a distal pulmonary artery, without interference on the overall pulmonary or systemic circulation (Schrijen F. *et al.* J Appl Physiol 1993; 74: 613-616). In 9 anaesthetised dogs spontaneously breathing, mixed venous blood was infused at known flows in the wedged area (vascular volume: about 0.7 ml) to study the pressure/flow relation and to compute the peripheral pulmonary vascular resistance (PPVR). The pressure/flow curves were determined during local infusion of glucose or nicardipine solution mixed with the blood infusion while the dogs breathed a normoxic or a hypoxic mixture (FIO₂: 0.10, FICO₂: 0.03). During normoxia, nicardipine induced no change in PPVR. During hypoxia, nicardipine ($2 \cdot 10^{-8}$ M) caused a 36% decrease in PPVR. The PPVR change due to nicardipine was closely related to the value of PPVR during hypoxia ($r=0.91$, $p<0.001$). These results show that, in our preparation, the effects of nicardipine on the peripheral pulmonary circulation were dependent on the vascular tone and that nicardipine was able to reverse partially an increase in vascular tone induced by acute hypoxia.

Congrès de l'E.R.S., Barcelone, 16-20 septembre 1995.
Eur Respir 1995; 8: 250 S.

EFFECT OF URAPIDIL ON PERIPHERAL PULMONARY RESISTANCE IN ANESTHETIZED DOGS. F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot.
Unité 14 INSERM, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Vasodilatory properties of urapidil are due to blockade of α_1 -adrenergic receptors and stimulation of central serotonin receptors. The aim of the study was to evaluate the effects of urapidil on peripheral pulmonary vasculature. The pressure/flow relation can be studied in a peripheral portion of the lung vasculature, using a double lumen catheter wedged in a distal pulmonary artery, without interference on the overall pulmonary or systemic circulation (Schrijen F. *et al.* J Appl Physiol 1993). In 9 anesthetized spontaneously breathing dogs, mixed venous blood was infused at known flows in 15 wedged areas (vascular volume : about 0.7 ml) to study the pressure/flow relation and to compute the peripheral pulmonary vascular resistance. The pressure/flow curves were determined during local infusion of glucose or urapidil solution mixed with the blood infusion while the dogs breathed air or a hypoxic mixture (FIO_2 : 0.10, $FICO_2$: 0.03). The study was repeated with increasing concentrations of urapidil (1.3×10^{-9} , 1.3×10^{-7} and 1.3×10^{-5} M). During normoxia or hypoxia, urapidil induced no change in peripheral pulmonary vascular resistance. These results show that, in our preparation, at the concentrations studied, urapidil has no effect on the peripheral pulmonary circulation. These findings suggest the lack of functional α_1 -adrenergic receptors in the peripheral pulmonary circulation of the dog.

This abstract is funded by:

Congrès de l'A.T.S., New Orleans, 10-15 mai 1996
Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: A 586

P1617

Effect of L-NAME on peripheral pulmonary circulation in anaesthetized dogs
F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier, F. Poincelot. *Unite 14 INSERM,
Vandoeuvre-les-Nancy, France*

The role of NO in the modulation of pulmonary vascular tone is difficult to study *in vivo*. The aim of the study was to evaluate the effect of L-NAME, a NO synthase inhibitor on peripheral pulmonary vasculature, in normoxia and during acute hypoxia. The pressure/flow relation can be studied in a peripheral portion of the lung vasculature, using a double lumen catheter wedged in a distal pulmonary artery, without interference on the overall pulmonary or systemic circulation (Schrijen et al., *J Appl Physiol* 1993; 74:613-616). In 9 anaesthetized spontaneously breathing dogs, mixed venous blood was infused at known flows in 15 wedged areas (vascular volume: about 0.7 ml) to study the pressure/flow relation and to compute the peripheral pulmonary vascular resistance. The pressure/flow curves were determined during local infusion of glucose or L-NAME solution mixed with the blood infusion while the dogs breathed air or hypoxic mixture (FIO₂: 0.10, FICO₂: 0.03). The study was repeated with increasing concentrations of L-NAME (10⁻⁷, 10⁻⁵ and 10⁻³ M). L-NAME caused a concentration-dependent increase in peripheral pulmonary vascular resistance. Maximal increase was 50 and 45%, during normoxia and hypoxia respectively. These results support the importance of NO release to maintain low pulmonary vascular tone in normoxia and suggest NO release to limit hypoxic vasoconstriction.

Congrès de l'E.R.S., Berlin; 20-24 septembre 1997.
Eur Respir J 1997; 10: 254 S.

EFFECTS OF LEVCROMAKALIM AND NICORANDIL ON PERIPHERAL PULMONARY RESISTANCE IN ANESTHETIZED DOGS. F. Chabot, F. Schrijen, C. Saunier. Unité 14 INSERM, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

The role of potassium channels in the control of the pulmonary vascular tone is controversial. The aim of the study was to evaluate the effects of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel openers, levcromakalim and nicorandil (the last one is also an NO donor) on peripheral pulmonary vasculature. The pressure/flow relation can be studied in a peripheral portion of the lung vasculature, using a double lumen catheter wedged in a distal pulmonary artery, without interference on the overall pulmonary or systemic circulation (Schrijen *et al.*, J Appl Physiol 1993). In 10 anesthetized spontaneously breathing dogs, mixed venous blood was infused at known flows in 32 wedged areas (vascular volume : about 0.7 ml) to study the pressure/flow relation and to compute the peripheral pulmonary vascular resistance (PPVR). The pressure/flow curves were determined during local infusion of glucose, levcromakalim (n=25) or an NO synthase inhibitor, L-NAME (10^{-3} M) before nicorandil (n=8) (solution mixed with the blood infusion). The dogs breathed air or a hypoxic mixture (FIO_2 : 0.10, $FICO_2$: 0.03). The study was repeated with increasing concentrations of levcromakalim or nicorandil (10^{-8} , 10^{-6} and 10^{-4} M). During normoxia or hypoxia, levcromakalim induced no change in PPVR; L-NAME increased PPVR and nicorandil decreased PPVR. These results show that, in our preparation, at the concentrations studied, levcromakalim has no effect on the peripheral pulmonary circulation. These findings underline the role of NO pathway and suggest the lack of functional K_{ATP} channels in the peripheral pulmonary circulation of the dog, both during normoxia and acute hypoxia.

Congrès de l'A.T.S., Chicago, 24-29 avril 1998
Am J Respir Crit Care Med 1998; A 383

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons réalisé des études pharmacologiques de la circulation pulmonaire *in vitro* et *in vivo*. Cette double approche nous a permis d'étudier la réponse fonctionnelle vasculaire au niveau de l'organe isolé et de l'animal entier. Les réponses mesurées ont un caractère multifactoriel et dépendent de nombreux facteurs physiologiques variables selon le type de préparation. Après un résumé des résultats des différents travaux, nous discutons leurs limites, notamment méthodologiques.

A - Résultats et limites des études *in vitro*

1- Vasoréactivité pulmonaire au cours de la cirrhose biliaire expérimentale

a- Résultats de l'étude

La réponse contractile à la phényléphrine des anneaux artériels pulmonaires isolés provenant de rats ayant une cirrhose biliaire est réduite par rapport à celle d'anneaux provenant de rats contrôles. Le prétraitement avec l'inhibiteur de la NOS, le L-NA, augmente la réponse contractile des anneaux vasculaires de rats cirrhotiques mais ne modifie pas celle des rats contrôles. Le L-NA restaure une réponse normale des anneaux vasculaires de rats cirrhotiques à la phényléphrine. La relaxation des anneaux vasculaires pulmonaires des 2 groupes de rats en réponse à l'acétylcholine et au nitroprussiate de sodium n'est pas différente. L'hyporéactivité artérielle pulmonaire à la phényléphrine résulte probablement d'un excès de production de NO dans la circulation pulmonaire. Cette hyporéactivité pourrait rendre compte au moins en partie des anomalies hémodynamiques rencontrées au cours du syndrome hépatopulmonaire.

b- Limites de cette étude

Nous n'avons pas précisé l'état hémodynamique de ces rats qui ont subi 4 semaines auparavant une ligature de la voie biliaire principale. Dans ce modèle, il a été démontré que les rats présentaient les caractéristiques hémodynamiques et gazométriques d'un syndrome hépatopulmonaire (Chang & Ohara, 1992).

Nous avons utilisé un inhibiteur de la NOS, le L-NA. Certains inhibiteurs de la NOS seraient plus spécifiques des isoformes constitutives (Schini & Vanhoutte, 1992 ; Zembowicz *et*

al., 1993) et inductibles (Griffiths *et al.*, 1993 ; Yu 1994 ; Wolff & Lubeskie, 1995) de la NOS et pourraient, peut-être, être utiles pour mieux caractériser les effets observés.

Les résultats de ce travail sont en faveur d'un excès de production de NO dans le syndrome hépatopulmonaire mais nous n'avons pas mesuré le NO produit. La mesure des produits d'oxydation du NO, comme cela a été effectué dans un modèle de poumon perfusé isolé (Isaacson *et al.*, 1994) dans le bain d'organe aurait pu peut-être confirmer cette hypothèse. Une étude récente a apporté des éléments importants en faveur de cette hypothèse en utilisant également le modèle de syndrome hépatopulmonaire de Chang & Ohara (1992). Il existe une augmentation des taux de NOS endothéliale corrélée au gradient alvéolo-artériel d'oxygène et associée à une augmentation de la densité de la NOS endothéliale dans les vaisseaux pulmonaires alvéolaires (Fallon *et al.*, 1997). La concentration et la localisation de la NOS inductible ne sont pas modifiées.

Les anneaux vasculaires ont été placés dans le bain d'organe avec de l'indométacine. L'inhibition de la voie de la cyclooxygénase permet d'éliminer l'interférence des prostaglandines dans les résultats obtenus. Mais à l'inverse, le rôle éventuel des prostaglandines dans les anomalies de la vasoréactivité pulmonaire ne peut pas être exploré. Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe consacré au syndrome hépatopulmonaire dans le chapitre sur la circulation pulmonaire, les prostaglandines participent au contrôle du tonus vasculaire systémique au cours de la cirrhose (Wu *et al.*, 1993). Leur participation au contrôle du tonus vasculaire pulmonaire ne peut pas être exclue.

2- Propriétés vasodilatatrices du peroxy-nitrite : rôle de la PARS

a- Résultats de l'étude

Le peroxy-nitrite n'a aucune action sur les anneaux vasculaires pulmonaires à l'état de base mais provoque une relaxation, dépendante de la concentration, des anneaux précontractés (1 à 100 μM). Le peroxy-nitrite (1 ou 10 μM), ajouté dans le bain d'organe avant une précontraction par l'analogue du thromboxane, l'U46619, ne modifie pas la relaxation dépendante de l'endothélium induite par l'acétylcholine. Cependant le peroxy-nitrite à la plus haute concentration étudiée (100 μM) augmente la relaxation induite par l'acétylcholine.

L'action vasodilatatrice du peroxy-nitrite n'est pas modifiée par l'inhibiteur de la NOS, le L-NAME, ni par la superoxyde dismutase. L'inhibiteur de la PARS, le 3-aminobenzamide, inhibe la relaxation induite par le peroxy-nitrite. Le 3-aminobenzamide n'a pas d'effet sur la relaxation induite par l'acétylcholine mais augmente la relaxation induite par le nitroprussiate de sodium.

Ces résultats montrent que le peroxy-nitrite a un effet vasodilatateur sur les artères pulmonaires de rat, probablement par activation de la PARS. Toutefois, aux concentrations permettant d'obtenir une vasodilatation, le peroxy-nitrite ne modifie pas la vasoréactivité à l'acétylcholine. Ces résultats suggèrent que le peroxy-nitrite, et non pas le NO endothélial, active la PARS, produisant une déplétion rapide en ATP à l'origine d'une réduction de la contraction du muscle lisse vasculaire. L'inhibition de l'action du peroxy-nitrite et non pas de l'acétylcholine par le 3-aminobenzamide suggère que le peroxy-nitrite et le NO ont un effet vasodilatateur par des mécanismes d'action différents. Ces résultats suggèrent que les inhibiteurs de la PARS pourraient être utiles dans le traitement des troubles hémodynamiques induits par le peroxy-nitrite, en particulier au cours du sepsis, sans modifier l'action du NO endothélial.

b- Limites de l'étude

Les propriétés vasodilatatrices du peroxy-nitrite sont très probablement secondaires à une activation de la PARS. Cette hypothèse repose sur la réduction de l'effet vasodilatateur du peroxy-nitrite par le 3-aminobenzamide qui est un inhibiteur spécifique de la PARS très largement utilisé (Banasik *et al.*, 1992). L'hypothèse aurait été confirmée si nous avions mesuré l'activité de la PARS et mis en évidence une augmentation de son activité après administration de peroxy-nitrite.

L'activation de la PARS par le peroxy-nitrite provoque une déplétion intracellulaire en ATP. La mise en évidence d'une baisse du contenu intracellulaire en ATP après administration de la solution de peroxy-nitrite apporterait un argument supplémentaire en faveur de notre hypothèse.

3- Technique des anneaux vasculaires isolés : intérêts, limites

Cette méthode permet d'étudier la réponse propre d'un anneau vasculaire pulmonaire à une stimulation pharmacologique. Ces études *in vitro* s'affranchissent des éléments de contrôle du tonus vasculaire pulmonaire, en particulier nerveux et humoraux. Cependant les réponses mesurées dépendent encore de nombreux facteurs physiologiques. Au niveau de l'anneau vasculaire pulmonaire isolé, la réponse mesurée dépend de l'effet direct de la drogue étudiée sur la tension isométrique mais aussi de l'intervention éventuelle de médiateurs libérés sous l'effet de la drogue par les cellules endothéliales de l'anneau vasculaire. L'abrasion endothéliale permet de distinguer les effets dus à l'endothélium de ceux dépendant des cellules musculaires lisses. L'hétérogénéité de l'anneau vasculaire doit être prise en compte dans l'interprétation des résultats. Une lésion endothéliale doit être suspectée si l'acétylcholine ou un autre vasodilatateur dépendant de l'endothélium ne provoque pas de relaxation. La fréquence des lésions endothéliales induites par la préparation de l'anneau conduit certains auteurs à réaliser une étude histologique après chaque expérience pour quantifier morphologiquement ces lésions endothéliales.

Plusieurs études ont souligné les différences régionales de réactivité vasculaire pulmonaire. Ces différences sont structurelles mais également fonctionnelles (Leach *et al.*, 1992 ; Frid *et al.*, 1994 ; Archer *et al.*, 1996 ; Kemp *et al.*, 1997 ; Higashi *et al.*, 1997). La diversité régionale limite les conclusions des travaux réalisés aux segments vasculaires étudiés. Dans la technique des anneaux vasculaires, les anneaux proviennent des branches principales de l'artère pulmonaire. Les résultats obtenus à partir des anneaux vasculaires proximaux ne peuvent pas être extrapolés aux vaisseaux de résistance.

B- Résultats et limites des études in vivo

1- Résultats des études

Les résultats démontrent que la relation pression-débit peut être déterminée dans la circulation pulmonaire périphérique chez des chiens anesthésiés en partant d'un débit nul sans interférer avec la circulation pulmonaire globale ni avec la circulation systémique. Quand l'artère

bloquée est dans le même axe que le cathéter, la relation pression/débit est linéaire avec une origine à 0 et sans hystérésis. Cette relation peut être exprimée simplement par sa pente. Cela n'est pas possible quand l'ordonnée à l'origine n'est pas nulle. La pente peut être calculée dans ce cas avec au moins 2 points sur la courbe pression/débit comme cela a déjà été proposé (Lodato *et al.*, 1985). La résistance vasculaire pulmonaire périphérique varie d'un territoire à l'autre et est inversement corrélée au volume du territoire. Il est donc nécessaire de comparer la résistance vasculaire pulmonaire périphérique dans le même territoire.

L'angiographie est nécessaire pour préciser la direction de l'artère principale du territoire par rapport à l'axe de la sonde. Cette angiographie ne doit être obtenue qu'après avoir réalisé l'ensemble des courbes pression-débit du territoire étudié car le produit de contraste augmente la RVPP.

En hypoxie, les RVPP augmentent plus que les RVP globales. Ceci reflète le siège périphérique de la vasoconstriction hypoxique (Madden *et al.*, 1985). La correction de l'hypoxie diminue les RVPP. Ces résultats apportent des éléments supplémentaires pour valider cette technique et permettent aussi de préciser la différence entre la circulation pulmonaire entière et locale car les gros vaisseaux sont exclus dans ce modèle.

Cette méthode a été simplifiée pour permettre la réalisation d'études pharmacologiques. Ces études pharmacologiques de la vascularisation pulmonaires périphérique n'ont eu aucun retentissement sur la circulation pulmonaire globale ni sur la circulation systémique. Les RVPP ne sont pas modifiées en normoxie par les inhibiteurs des canaux calciques. La baisse des RVPP en hypoxie est en faveur d'un rôle important des canaux calciques dépendants du voltage dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire en hypoxie. L'augmentation de la pression de perfusion par le L-NAME en normoxie suggère que le NO est partiellement responsable du faible tonus vasculaire pulmonaire basal. La potentialisation de la réponse pressive à l'hypoxie par le L-NAME montre que le NO module la vasoconstriction hypoxique. L'absence de modification de la réponse des RVPP au nitroprussiate de sodium par le L-NAME indique que la réponse vasodilatatrice pulmonaire induite par le nitroprussiate de sodium n'est pas dépendante du NO endogène produit à partir de la L-arginine. Les activateurs des canaux potassiques ne modifient pas les RVPP en normoxie ni en hypoxie. Les canaux potassiques

dépendants de l'ATP ont donc vraisemblablement un rôle mineur dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire périphérique en normoxie et en hypoxie. L'absence d'effet de l'urapidil sur les RVPP en air et en hypoxie suggère l'absence de récepteurs α_1 -adrénergiques fonctionnels dans la circulation pulmonaire périphérique. En hypoxie, le tonus vasculaire pulmonaire périphérique est augmenté par l'almitrine. Les RVPP diminuent et reviennent à leur valeur initiale après administration de nicardipine. La baisse des RVPP induite par la nicardipine peut refléter une inhibition de la vasoconstriction induite par l'almitrine, une inhibition de la vasoconstriction hypoxique ou une inhibition partielle des deux mécanismes de vasoconstriction.

L'ensemble des résultats démontre que, *in vivo* et dans ce modèle, la vasoréactivité pulmonaire périphérique est peu importante vis à vis de différents stimuli vasodilatateurs. L'absence de tonus vasculaire pulmonaire de base ou sa très faible valeur est probablement à l'origine de l'absence d'effet des différents vasodilatateurs en l'absence de vasoconstriction préalable, de leur effet modeste et difficile à mettre en évidence malgré une vasoconstriction préalable et de l'augmentation significative des résistances vasculaires pulmonaires périphériques après perfusion de drogues vasoconstrictrices.

2- Technique de perfusion périphérique : intérêts, limites.

Nous avons utilisé une technique originale. Comme toute technique originale, elle a dû être validée. Les deux premières publications correspondent à la description et à la validation de la technique. Au niveau de l'animal entier, la réponse mesurée fait intervenir les mécanismes de régulation paracrines comme au niveau de l'anneau vasculaire isolé mais aussi l'ensemble des régulations nerveuses centrales et périphériques et des régulations humorales.

Ce modèle permet une étude des RVPP de poumons intacts *in situ*. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de valeurs des RVPP mais les résultats obtenus sont plausibles. Le volume moyen des vaisseaux en aval du cathéter bloqué est, au vu de nos résultats, de 0,75 ml, c.a.d. environ $3 \cdot 10^{-3}$ du volume sanguin pulmonaire total de ces chiens. Les RVPP calculées à partir des courbes pression/débit sont environ 1 000 fois plus élevées que les RVP globales mais les gros vaisseaux pulmonaires qui ont une faible résistance (Madden *et al.*, 1985) sont

exclus. A la différence de la technique utilisée par Bain (Bain *et al.*, 1963), notre procédé n'inclut pas la résistance du cathéter car la pression est mesurée au site de perfusion. Cette technique est reproductible avec une variation moyenne des RVPP de 14% entre 2 courbes consécutives.

Le produit de contraste (ioxaglate de sodium et de méglumine) a été injecté dans les conditions où il est utilisé pour les angiographies des territoires bloqués. Quoique l'ioxaglate ait été purgé avec du sérum salé, ses effets sur les résistances vasculaires peuvent encore être observés pendant la courbe pression/débit. L'injection du produit de contraste permet de visualiser la position du cathéter par rapport à l'artère principale du territoire mais cette manoeuvre ne doit être réalisée qu'à la fin de l'étude du territoire.

La procédure a pu être simplifiée pour des études pharmacologiques, en utilisant seulement 3 débits. Des études dose-effets ont été faites avec des concentrations croissantes des drogues. Les résultats obtenus sont compatibles avec les données de la littérature fournies par d'autres modèles d'étude de la circulation pulmonaire, notamment avec les études récentes soulignant l'importance de la diversité régionale de la vasoréactivité pulmonaire (Archer *et al.*, 1996 ; Kemp *et al.*, 1997). L'intérêt de ce modèle est la possibilité d'étude de différentes substances pharmacologiques vasoactives dans un territoire pulmonaire périphérique, *in vivo*, chez l'animal anesthésié.

Ce modèle a également des limites qu'il convient de souligner. La première tient à la réalisation des études chez l'animal anesthésié. L'animal conscient est le modèle le plus physiologique. Certains modèles *in vivo* utilisent des animaux cathétérisés au long cours, permettant ainsi la réalisation d'études chez des animaux éveillés (Lodato, 1985). Ces animaux sont équipés des différents cathéters de façon chronique, la pose des cathéters étant réalisée au moins 2 semaines avant les expériences pharmacologiques. Ce modèle est difficile à utiliser dans certaines conditions physiopathologiques. L'hypoxie est source de stress et l'agitation induite dans ces conditions peut modifier l'hémodynamique. De plus ce modèle est coûteux (perte d'animaux en cours de chirurgie par hémorragie et au décours de l'acte chirurgical par infection, chez le chien notamment). Enfin ce modèle n'est pas adapté à notre modèle d'étude de la circulation pulmonaire périphérique qui nécessite le blocage du cathéter dans une artère

distale. Le cathéter doit être perfusé en permanence et ne peut pas être maintenu en place de façon prolongée sans risque de thrombose et donc d'infarctus du territoire pulmonaire étudié. Ceci nous a conduit à développer ce modèle chez l'animal entier anesthésié.

L'étude est réalisée chez des animaux anesthésiés avec du thiopental. Les barbituriques dépriment la contractilité myocardique et ont des effets vagolytiques. La fréquence cardiaque et la pression artérielle systémique sont souvent élevées, d'autant plus que l'animal est stressé au moment de l'induction anesthésique. Le retentissement des barbituriques sur la circulation pulmonaire est discuté, minime pour certains (Bjertnaes, 1982 ; Benumof, 1985). Pour d'autres, l'administration de barbituriques a des conséquences fonctionnelles sur la circulation pulmonaire. Ainsi dans une préparation de poumon perfusé isolé de lapin, l'administration de barbituriques (thiopental et pentobarbital) bloque la vasoconstriction induite par un analogue du thromboxane et par le chlorure de potassium, suggérant une inhibition de l'entrée du calcium dans la cellule, mais les effets sur la vasoconstriction hypoxique n'ont pas été étudiés dans ce modèle (Mc Shane *et al.*, 1989).

La reproductibilité de la méthode est bonne (variations des RVPP dans un même territoire égales à 14%), mais les variations des RVPP d'un territoire à l'autre sont très importantes. Ceci rend compte de la dispersion des résultats, dès la perfusion de contrôle et impose souvent la réalisation de nombreuses expériences pour pouvoir affirmer l'effet vasoactif ou surtout l'absence d'effet vasoactif d'une substance pharmacologique (levcromakalim, urapidil).

Le temps de préparation pour chaque expérience est long. Ceci tient à la mise en place des différents cathéters après avoir anesthésié l'animal et surtout aux difficultés de cathétériser un territoire susceptible de faire l'objet de courbes pression/débit répétées. L'absence de variation de pression lors de la perfusion du territoire fait suspecter la grande taille du volume du territoire et il sera difficile de mettre en évidence une variation des RVPP. A l'inverse, une élévation rapide de la pression de perfusion conduit à suspecter soit un territoire latéral (non coaxial), soit un territoire dont les RVPP sont très élevées. Les courbes pression/débit dans ces territoires ont souvent une ordonnée à l'origine positive et la pente n'est pas toujours linéaire. Par ailleurs, après la réalisation d'une courbe pression/débit, un territoire peut devenir inutilisable avec une

augmentation très importante de la pression de perfusion. Une série complète de courbes pression-débit ne peut pas être menée à son terme dans 20 à 30% des territoires cathétérisés. En général, 1 à 2 territoires sont étudiés au cours de chaque expérience.

Nous n'avons pas observé de variations systématiques des RVPP avec le nombre d'expériences chez un même animal. Le nombre d'expériences chez un même animal n'a jamais dépassé 8 pour des raisons d'abord vasculaire jugulaire et pour limiter le nombre d'expériences dans un même territoire et chez le même animal. Nous ne pouvons pas exclure une modification de la vasoréactivité d'un territoire par les manoeuvres pharmacologiques antérieures dans le même territoire. Lors du cathétérisme d'un territoire chez un animal qui a déjà fait l'objet d'au moins une expérience antérieure, nous ne pouvons pas toujours être certains, malgré l'utilisation d'un système de radioscopie, que ce territoire n'a pas été utilisé antérieurement.

La méthode apparaît meilleure pour l'étude des drogues vasoconstrictrices que pour la recherche d'un effet vasodilatateur, plus difficile à mettre en évidence même après une vasoconstriction au préalable.

C- Perspectives

Notre principal pôle d'intérêt est la pharmacologie du contrôle du tonus vasculaire pulmonaire en hypoxie. Malgré ses limites, ce modèle d'étude pharmacologique de la circulation pulmonaire périphérique nous apparaît intéressant. Nous souhaitons perfectionner ce modèle pour diminuer la variabilité des résultats et donc améliorer la reproductibilité. Ce modèle pourrait être utilisé pour étudier de nouvelles molécules et devrait permettre de définir de façon plus fine l'action de molécules *in vivo* sur le tonus vasculaire pulmonaire périphérique. Pour préciser le mécanisme d'action des drogues, il est nécessaire de coupler ou de comparer ces études *in vivo* avec des études *in vitro*. Nous souhaitons développer les études *in vitro* avec du matériel humain prélevé lors d'interventions chirurgicales (Dinh-Xuan *et al.*, 1991), en appliquant des méthodes d'étude de la signalisation intracellulaire à différents types d'anomalies de la vasoréactivité pulmonaire (hypertension artérielle pulmonaire hypoxique chronique, hypertension artérielle pulmonaire primitive).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADNOT S, CHABRIER PE, BRUN-BUISSON C, VIOSSAT I, BRAQUET P. Atrial natriuretic factor attenuates the pulmonary pressor response to hypoxia. *J Appl Physiol* 1988; 65: 1975-1983.

ADNOT S, CIGARINI I, HERIGAULT R, HARF A. Effects of substance P and calcitonin gene-related peptide on the pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 1991a; 70: 1707-1712.

ADNOT S, RAFFESTIN B, EDDAHIBI S, BRAQUET P, CHABRIER P.E. Loss of endothelium dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991b; 87: 155-162.

ADNOT S, RAFFESTIN B, EDDAHIBI S. Régulation du tonus vasculaire pulmonaire. In : AUBIER M, FOURNIER M, PARIENTE R. «Pneumologie», pp 61-66. Flammarion, Paris 1996.

AHMED T, D'BROT J, WASSERMAN M, MUCCITELLI R, ROBINSON M, TUCKER S, MARCHETTE B. Effect of verapamil on pulmonary and eicosanoid responses to endotoxin in awake sheep. *J Appl Physiol* 1988; 64: 1700-1708.

ALBARWANI S, HEINERT G, TURNER JL, KOZLOWSKI RZ. Differential K⁺ channel distribution in smooth muscle cells isolated from the pulmonary arterial tree of the rat. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 208: 183-189.

ARCHER S, TOLINS JP, RAIJ L, WEIR EK. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 1198-1205.

ARCHER SL, HUANG J, HENRY T, PETERSON D, WEIR EK. A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res* 1993; 73 : 1100-1112.

ARCHER SL, HUANG JMC, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7583-7587.

ARCHER SL, HUANG JMC, REEVE HL, HAMPL V, TOLAROVA S, MICHELAKIS E, WEIR EK. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ Res* 1996; 78: 431-442.

ARNET UA, MCMILLIAN AB, LOWENSTEIN CJ. Hypoxia induces bovine aortic endothelial nitric oxide synthase expression. *Circulation* 1994; 90: 1-34.

ARNOULD T, MICHIELS C, ALEXANDRE I, REMACLE J. Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 15: 215-221.

BAERTSCHI AJ, TEAGUE WG. Alveolar hypoxia is a powerful stimulus for ANP release in conscious lambs. *Am J Physiol* 1989; 256: H 990-H998.

BAIN WH, LANCASTER JR., EVANS RH, SCHOENFELD FG, MOULDER PV, ADAMS WE. Perfusion of the wedged pulmonary artery catheter as a method of assessing pulmonary vasomotion. *Dis. Chest* 1963; 43: 50-56.

BANASIK M, KOMURA H, SHIMOYAMA M, UEDA K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono (ADP-ribosyl) transferase. *J Biol Chem* 1992; 267: 1569-1575.

BARNARD JW, WILSON PS, MOORE TM, THOMPSON WJ, TAYLOR AE. Effect of nitric oxide and cyclooxygenase products on vascular resistance in dog and rat lungs. *J Appl Physiol* 1993; 74: 2940-2948.

BARNES PJ, LIU SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 87-131.

BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.

BENNIE RE, PACKER CS, POWELL DR, JIN N, RHOADES RA. Biphasic response of pulmonary artery to hypoxia. *Am J Physiol* 1991; 261: L156-L163.

BENUMOF JL. One-lung ventilation and hypoxic pulmonary vasoconstriction: implications for anesthetic management. *Anesth Analg* 1985; 64: 821-833.

BERRIDGE MJ, IRVINE RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature (London)* 1989; 341: 197-205.

BIRNBAUMER L. G protein in signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 675-705.

BJERTNAES LJ. Intravenous versus inhalation anesthesia-pulmonary effects. *Acta Anaesthesiol Scand* 1982; 75 Suppl: 18-24.

BOLOTINA VM, NAJIBI S, PALACINO JJ, PAGANO PJ, COHEN RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850-853.

BOMZON A, BLENDIS LM. The nitric oxide hypothesis and the hyperdynamic circulation in cirrhosis. *Hepatology* 1994; 20: 1343-1350.

BRASHERS VL, PEACH MJ, ROSE Jr CE. Augmentation of hypoxic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused rat lung by in vitro antagonists of endothelium-dependent relaxation. *J Clin Invest* 1988; 82: 1495-1502.

BRAYDEN JE. Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clin and Experiment Pharmacol and Physiol* 1996; 23: 1069-1076.

BRIMIOULLE S, NAEIJE R. Hémodynamique pulmonaire et fonction ventriculaire droite. In : AUBIER M, FOURNIER M, PARIENTE R. «Pneumologie», pp 67-73. Flammarion, Paris 1996.

BRIMIOULLE S, VACHIERY JL, BRICHANT JF, DELCROIX M, LEJEUNE P, NAEIJE R. Sympathetic modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction in intact dogs. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 384-392.

BURKE-WOLIN T, WOLIN MS. H_2O_2 and cGMP may function as an O_2 sensor in the pulmonary artery. *J Appl Physiol* 1989; 66: 167-170.

BUSSE R, MULSCH A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1990; 275: 87-90.

CASTRO M, KROWKA MJ. Hepatopulmonary syndrome. A pulmonary vascular complication of liver disease. *Clin Chest Med* 1996; 17: 35-48.

CHABOT F, MESTIRI H, SABRY SP, DALL'AVA-SANTUCCI J, LOCKHART A, DINH-XUAN AT. Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis. *Eur Respir J* 1996; 9: 560-564.

CHABOT F, SAUNIER C, SCHRIJEN F. Changes in peripheral pulmonary vascular resistance after ioxaglate infusion in anaesthetized dogs. *Can J Physiol and Pharmacol* 1997a; 75: 15-18.

CHABOT F, MITCHELL JA, QUINLAN GJ, EVANS TW. Characterization of the vasodilator properties of peroxynitrite on rat pulmonary artery: role of poly (adenosine 5'-diphosphoribose) synthase. *Br J Pharmacol* 1997b; 121: 485-490.

CHANG SW, OHARA N. Pulmonary circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis: an animal model of the hepatopulmonary syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 795-805.

CHERRY PD, FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JD, JOTHIANANDAN D. The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 70: 2105-2110.

CIGARINI I, ADNOT S, CHABRIER PE, VIOSSAT I, BRAQUET P, GAUJOUR B. Pulmonary vasodilator responses to atrial natriuretic factor and sodium nitroprusside. *J Appl Physiol* 1989; 67: 2269-2275.

CLAPP LH, GURNEY AM. ATP-sensitive K^+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 262: H916-H920.

CLAPP LH, DAVEY R, GURNEY AM. ATP-sensitive K^+ channels mediate vasodilation produced by lemakalim in rabbit pulmonary artery. *Am J Physiol* 1993; 264 : H1907-H1915.

COOKE JP, ROSSITCH Jr E, ANDON NA, LOSCAIZO J, DZAU VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88: 1663-1671.

COOPER JC, LANDZBERG MJ, ANDERSON TJ, CHARBONNEAU F, CREAGER MA, GANZ P, SELWYN AP. Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance in humans. *Circulation* 1996; 93: 266-271.

CORNFIELD DN, STEVENS T, McMURTRY IF, ABMAN SH, RODMAN DM. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994; 266: L469-L475.

CRAWLEY DE, LIU SF, EVANS TW, BARNES PJ. Inhibitory role of endothelium-derived relaxing factor in rat and human pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 166-170.

CRAWLEY DE, LIU SF, BARNES PJ, EVANS TW. Endothelin-3 is a potent pulmonary vasodilator in the rat. *J Appl Physiol* 1992; 72: 1425-1431.

CREMONA G, HIGENBOTTAM TW, MAYORAL V, ALEXANDER G, DEMONCHEAUX E, BORLAND C, ROE P, JONES GJ. Elevated exhaled nitric oxide in patients with hepatopulmonary syndrome. *Eur Respir J* 1995; 8: 1883-1885.

DAWSON CA, LINEHAN JH, BRONIKOWSKI TA. Pressure and flow in the pulmonary vascular bed. In: WEIR EK, REEVES JT eds. «Pulmonar Vascular Physiology and Pathophysiology» pp. 51-104. M. Dekker New-York, 1989.

DEMIRYUREK AT, WADSWORTH RM, KANE KA. Pharmacological evidence for the role of mediators in hypoxia-induced vasoconstriction in sheep isolated intrapulmonary artery rings. *Eur J Pharmacol* 1991; 203: 1-8.

DEMIRYUREK AT, WADSWORTH RM, KANE KA, PEACOCK AJ. The role of endothelium in hypoxic constriction of human pulmonary artery rings. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 283-290.

DINH-XUAN AT, HIGENBOTTAM TW, CLELLAND CA, PEPKE-ZABA J, CREMONA G, BUTT AY, LARGE SR, WELLS FC, WALLWORK J. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1539-1547.

DINH-XUAN AT. Endothelial modulation of pulmonary vascular tone. *Eur Respir J* 1992; 5: 757-762.

DUKE HN. The site of action of anoxia on the pulmonary blood vessels of the cat. *J Physiol (London)* 1954; 125: 373-382.

DUMAS M, DUMAS JP, ROCHETTE L, ADVENIER C, GIUDICELLI JF. Comparison of the effects of nicorandil, pinacidil and nitroglycerin on hypoxic and hypercapnic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused lung of rat. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 633-638.

EL-KASHEF HA, HOFMAN WF, EHRHART IC. Verapamil inhibition of serotonin-induced vasoconstriction in dog lung. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990, 15: 729-735.

EMERY CJ, SLOAN PJM, MOHAMMED FH, BARER GR. The action of hypercapnia during hypoxia on pulmonary vessels. *Bull Eur Physiopathol Respir*, 1977; 13 : 763-776.

FALLON MB, ABRAMS GA, LUO B, HOU Z, DAI J. The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 1997; 113: 606-614.

FINEMAN JR, HEYMANN MA, SOIFER SJ. N^o-nitro-L-arginine attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilation in lambs. *Am J Physiol* 1991; 260: H1299-H1306.

FISHMAN AP. Pulmonary circulation. In: «Handbook of Physiology. The Respiratory System. Circulation and Nonrespiratory Functions». pp 93-165. Am Physiol Soc, sect 3, Vol 1, Bethesda, Maryland, USA. 1985.

FOWLER KT, WEST JB, PAIN MCF. Pressure-flow characteristics of horizontal lung preparations of minimal height. *Resp Physiol* 1966; 1: 88-98.

FRANGOS JA, ESKIN SG, McINTIRE LV, IVES CL. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 1985; 227: 1477-1479.

FRID MG, MOISEEVA EP, STENMARK KR. Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circ Res* 1994; 75: 669-681.

FRIEDMAN LS, FITZPATRICK TM, BLOOM MF, RAMWELL PW, ROSE JC, KOT PA. Cardiovascular and pulmonary effects of thromboxane B₂ in the dog. *Circ Res* 1979; 44: 748-755.

FRITTS HW Jr, COURNAND A. Physiological factors regulating pressure, flow and distribution of blood in the pulmonary circulation. In: ADAMS WR and VEITH I eds. «Pulmonary Circulation: An International Symposium», p 62 Chicago, 1958. New York, Grune & Stratton, 1959.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.

FURCHGOTT RF, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3: 2007-2018.

GAMBONE LM, MURRAY PA, FLAVAHAN NA. Synergistic interaction between endothelium-derived NO and prostacyclin in pulmonary artery: potential role for K^+_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 271-279.

GENG Y, HANSSON GK, HOLME E. Interferon- γ and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992; 71: 1268-1276.

GOMI N. Vasoconstriction by angiographic contrast media in isolated canine arteries. *Br J Radiol* 1992; 65: 961-967.

GOTTSCHALL EB, FERNYAK S, WUERTEMBERGER G, VOELKEL NF. Almitrine mimics hypoxic vasoconstriction in isolated rat lungs. *Am J Physiol* 1992; 263: H383-H391.

GREENBERG S, KADOWITZ PJ, HYMAN A, CURRON FA. Adrenergic mechanisms in canine intralobar pulmonary arteries and veins. *Am J Physiol* 1981; 240: H274-H295.

GREENBERG S, DIECKE FPJ, PEEVY K, TANAKA TP. Endothelium modulates adrenergic neurotransmission to canine pulmonary arteries and veins. *Eur J Pharmacol* 1989; 162: 67-80.

GRIFFITHS MJD, MESSENT M, MACALLISTER JR, EVANS TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 963-968.

GRIFFITHS MJD, LIU S, CURZEN NP, MESSENT M, EVANS TW. In vivo treatment with endotoxin induces nitric oxide synthase in rat main pulmonary artery. *Am J Physiol* 1995; 268: L509-L518.

GRIMMINGER F, SPRIESTERSBACH R, WEISSMANN N, WALMRATH D, SEEGER W. Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1509-1515.

HAGGMARK S, HIETALA SO, REIZ S, SJODIN JG, SUNNEGARDH O, WIRELL S. Central and renal haemodynamic effects of intravenous infusion of non-ionic and ionic contrast media. An experimental investigation in the pig. *Acta Radiol (Diagn)* 1985; 26: 491-495.

HAKIM TS, MICHEL RP, CHANG HK. Partitioning of pulmonary vascular resistance in dogs by arterial and venous occlusion. *J Appl Physiol* 1982; 52: 710-715.

HAKIM TS, MICHEL RP, MINAMI H, CHANG HK. Sites of pulmonary hypoxic vasoconstriction studied with arterial and venous occlusion. *J Appl Physiol* 1983; 54: 1298-1302.

HAKIM TS. Identification of constriction in large versus small vessels using the arterial-venous and the double-occlusion techniques in isolated canine lungs. *Respiration* 1988; 54: 61-69.

HAMPL V, CORNFIELD DN, COWAN NJ, ARCHER SL. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J* 1995; 8: 515-522.

HARDER DR, MADDEN JA, DAWSON C. Hypoxic induction of Ca^{2+} -dependent action potentials in small pulmonary arteries of cat. *J Appl Physiol* 1985; 59: 1389-1393.

HASUNUMA K, RODMAN DM, O'BRIEN RF, McMURTRY IF. Endothelin 1 causes pulmonary vasodilatation in rats. *Am J Physiol* 1990; 259: H48-H54.

HASUNUMA K, YAMAGUCHI T, RODMAN DM, O'BRIEN RF, McMURTRY IF. Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1991a; 260: L97-L104.

HASUNUMA K, RODMAN DM, McMURTY IF. Effects of K^+ channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am Rev Respir Dis* 1991b; 144: 884-887.

HAYNES J, ROBINSON J, SAUNDERS L, TAYLOR AE, STRADA SJ. Role of cAMP - dependent kinase in cAMP-mediated vasodilation. *Am J Physiol* 1992; 262: H511-H516.

HECKER M, MULSCH A, BASSENGE E, BUSSE R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. *Am J Physiol* 1993; 265: H828-H833.

HIGASHI T, ISHIZAKI T, SHIGEMORI K, NAKAI T, MIYABO S, INUI T, YAMAMURA T. Pharmacological heterogeneity of constrictions mediated by endothelin receptors in rat pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1997; 272: L287-L293.

HILL NS, ROUND S. Vascular reactivity is increased in rat lungs injured with α -naphthylthiourea. *J Appl Physiol* 1983; 54: 1693-1701.

HILLIER SC, GRAHAM JA, HANGER CC, GODBEY PS, GLENNY RW, WAGNER Jr WW. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1084-1090.

HOOD JS, McMAHON TJ, KADOWITZ PJ. Influence of lemakalim on the pulmonary vascular bed of the cat. *Eur J Pharmacol* 1991a; 202: 101-104.

HOOD JS, McMAHON TJ, KADOWITZ PJ. Pulmonary vasodilator responses to RP 52891 are mediated by activation of a glibenclamide-sensitive K^+_{ATP} channel. *Eur J Pharmacol* 1991b; 202: 121-124.

HUGHES AD. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 1995; 32: 353-370.

HUGHES JMB, ALLISON DJ, GOATCHER A, TRIPATHI A. Influence of alveolar hypoxia on pulmonary vasomotor responses to almitrine in the dog. *Clin Sci* 1986; 70: 555-564.

HYMAN AL, LIPPTON HL, KADOWITZ PJ. Nature of α_1 and postjunctional α_2 adrenoceptors in the pulmonary vascular bed. *Federation Proc* 1986; 45: 2336-2340.

HYMAN AL, KADOWITZ PJ, LIPPTON HL. Methylene blue selectively inhibits pulmonary vasodilator responses in cats. *J Appl Physiol* 1989; 66: 1513-1517.

IGNARRO LJ, BYRNES RE, BUGA GM, WOOD KS. Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth relaxation elicited by bradykinin and VIP. *Am J Physiol* 1987; 253: H1074-H1082.

ISAACSON TC, HAMPL V, WEIR EK, NELSON DP, ARCHER SL. Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 1994; 76: 933-940.

JABR RI, TOLAND H, GELBAND CH, WANG XX, HUME JR. Prominent role of intracellular Ca^{2+} release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 21-30.

JIN N, PACKER CS, ENGLISH D, RHOADES RA. Inositol triphosphate is involved in norepinephrine- but not in hypoxia-induced pulmonary arterial contraction. *Am J Physiol* 1993; 264: L160-L164.

JOHNS RA, LINDEN JM, PEACH MJ. Endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP accumulation in rabbit pulmonary artery are selectively impaired by moderate hypoxia. *Circ Res* 1989; 65: 1508-1515.

KADOWITZ PJ, KNIGHT DS, GREENBERG S, HYMAN AL. Structure and function of the adrenergic nerves in the canine pulmonary vascular bed. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1981; 3: 341-359.

KADOWITZ PJ, LIPPTON HL, BELLAN JA, HYMAN AL. Nisoldipine inhibits vasoconstrictor responses in the cat pulmonary vascular bed. *J Appl Physiol* 1989; 66: 2885-2890.

KEMP BK, SMOLICH JJ, COCKS TM. Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and veins. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 441-450.

KOBAYASHI Y, AMENTA F. Neurotransmitter receptors in the pulmonary circulation with particular emphasis on pulmonary endothelium. *J Auton Pharmacol* 1994; 14: 137-164.

KOBZIK L, BREDT DS, LOWENSTEIN CJ, DRAZEN J, GASTON B, SUGARBAKER D, STAMLER JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: Immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-377.

KOMORI K, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood vessels* 1990; 27: 238-245.

KOOY NW, ROYALL JA, YE YZ, KELLY DR, BECKMAN J. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1250-1254.

KOVITZ KL, ALESKOWITCH TD, SYLVESTER JT, FLAVAHAN NA. Endothelium-derived contracting and relaxing factors contribute to hypoxic responses of pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1993; 265: H1139-H1148.

LANGE PE, NEUBERT D, ONNASCH DGW, SIEVERS HH, HEINTZEN PH. Effects of angiocardigraphic contrast media on the pulmonary circulation in pigs. *Am J Cardiol* 1984; 54: 1125-1130.

LEACH RM, TWORT CHC, CAMERON IR, WARD JPT. A comparison of the pharmacological and mechanical properties in vitro of large and small pulmonary arteries of the rat. *Clin Sci* 1992; 82: 55-62.

LEACH RM, ROBERTSON TP, TWORT CHC, WARD JPT. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1994; 266: L223-L231.

LEE FY, ALBILLOS A, COLOMBATO LA, GROSZMANN RJ. The role of nitric oxide in the vascular hyporesponsiveness to methoxamine in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1992; 16: 1043-1048.

LEEMAN M, NAEIJE R, LEJEUNE P, MELOT C. Influence of cyclooxygenase inhibition and of leukotriene receptor blockade on pulmonary vascular pressure-cardiac index relationship in hyperoxic and hypoxic dogs. *Clin Sci* 1987; 72 : 717-724.

LEEMAN M, ZEGERS DE BEYL V, DELCROIX M, NAEIJE R. Effects of endogenous nitric oxide on pulmonary vascular tone in intact dogs. *Am J Physiol* 1994; 266: H2343-H2347.

LINCOLN TM, CORNWELL TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb J* 1993; 7: 328-338.

LINEHAN JH, HAWORTH ST, NELIN LD, KRENTZ GS, DAWSON CA. A simple distensible vessel model for interpreting pulmonary vascular pressure-flow curves. *J Appl Physiol* 1992; 73: 987-994.

LIU S, BECKMAN JS, KU DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 1114-1121.

LIU SF, CRAWLEY DE, BARNES PJ, EVANS TW. Endogenous nitric oxide modulates adrenergic neural vasoconstriction in guinea pig pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1991a; 104: 565-569.

LIU SF, CRAWLEY DE, EVANS TW, BARNES PJ. Endothelium-derived relaxing factor inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Am Rev Respir Dis* 1991b; 143: 32-37.

LIU SF, CRAWLEY DE, EVANS TW, BARNES PJ. Endothelium-dependent non-adrenergic non-cholinergic neural relaxation in guinea pig pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1992a; 260: 541-548.

LIU SF, CRAWLEY DE, RHODE JAL, EVANS TW, BARNES PJ. Role of nitric oxide and guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate in mediatory nonadrenergic noncholinergic neural relaxation in guinea-pig pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 1992b; 107: 861-866.

LIU SF, BARNES PJ. Neural control of pulmonary vascular tone. In CRYSTAL RG, WEST JB, WEIBEL ER & BARNES PJ. «The Lung: Scientific Foundations», pp1457-1472, Raven Publishers, Philadelphia. 1997.

LODATO RF, MICHAEL JR, MURRAY PA. Multipoint pulmonary vascular pressure-cardiac output plots in conscious dogs. *Am J Physiol* 1985; 249: H351-H357.

MADDEN JA, DAWSON CA, HARDER DR. Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J Appl Physiol* 1985; 59: 113-118.

MADDEN JA, VADULA MS, KURUP VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 263: L384-393.

MARKS AR. Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation* 1992; 86 (Suppl III) : 61-67.

MARSHALL BE, MARSHALL C, BENUMOF J, SAIDMAN LJ. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size and oxygen tension. *J Appl Physiol* 1981; 51: 1543-1551.

MARSHALL C, MARSHALL BE. Influence of perfusates PO₂ on hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Circ Res* 1983; 52: 691-696.

MAZMANIAN GM, BAUDET B, BRINK C, CERRINA J, KIRKIACHARIAN S, WEISS M. Methylene blue potentiates vascular reactivity in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1989; 66: 1040-1045.

McCALL D. Excitation-contraction coupling in cardiac and vascular smooth muscle: modification by calcium-entry blockade. *Circulation* 1987; 75 (suppl 5): 3-14.

McMAHON TJ, HOOD JS, BELLAN JA & KADOWITZ PJ. N^ω-nitro-L-arginine methyl ester selectively inhibits pulmonary vasodilator responses to acetylcholine and bradykinin. *J Appl Physiol* 1991a; 71: 2026-2031.

McMAHON TJ, HOOD JS, NOSSAMAN BD, IBRAHIM IN, FENG CJ, KADOWITZ PJ. Influence of SQ 30741 on thromboxane receptor-mediated responses in the feline pulmonary vascular bed. *J Appl Physiol* 1991b; 71: 2026-2031.

McMAHON TJ, KADOWITZ PJ. Methylene blue inhibits neurogenic cholinergic vasodilator responses in the pulmonary vascular bed of the cat. *Am J Physiol* 1992; 263: L575-L584.

McMAHON TJ, HOOD JS, KADOWITZ PJ. Pulmonary vasodilator response to vagal stimulation is blocked by N^ω-nitro-L-arginine methyl ester in the cat. *Circ Res* 1992; 70: 364-369.

McMAHON TJ, KADOWITZ PJ. Analysis of responses to substance P in the pulmonary vascular bed of the cat. *Am J Physiol* 1993; 264: H394-H402.

McMAHON TJ, IGNARRO LJ, KADOWITZ PJ. Influence of zaprinast on vascular tone and vasodilator responses in the cat pulmonary vascular bed. *J Appl Physiol* 1993a ; 74: 1704-1711.

McMURTRY IF, DAVIDSON AB, REEVES JT, GROVER RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res* 1976; 38: 99-104.

McMURTRY IF. BAY K 8644 potentiates and A23187 inhibits hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *Am J Physiol* 1985; 249: H741-H746.

McMURTRY IF. Humoral control. In: BERGOSFKY EH. «Abnormal Pulmonary Circulation», pp 83-125, Churchill Livingstone, London, 1986.

McSHANE AJ, CROWLEY K, SHAYEVITZ JR, MICHAEL JR, ADKINSON F, TRAYSTMAN RJ, GURTNER GH. Barbiturate anesthetics inhibit thromboxane-, potassium-, but not angiotensin-induced pulmonary vasoconstriction. *Anesthesiology* 1989; 70 : 775-779.

MINKES RK, KVAMME P, HIGUERA TR, NOSSAMAN BD, KADOWITZ PJ. Analysis of pulmonary and systemic vascular response to cromakalim, an activator of K^+_{ATP} channels. *Am J Physiol* 1991; 260: H957-H966.

MITZNER W. Resistance of the pulmonary circulation. *Clin Chest Med* 1983; 4: 127-137.

MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.

MURRAY PA, LODATO RF, MICHAEL JR. Neural antagonists modulate pulmonary vascular-pressure-flow plots in conscious dogs. *J Appl Physiol* 1986; 60: 1900-1907.

MURRAY TR, CHEN L, MARSHALL BE, MACARAK EJ. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3: 457-465.

NAEIJJE R, LEJEUNE P, VACHIERY JL, LEEMAN M, MELOT C, HALLEMANS R, DELCROIX M, BRIMOUILLE S. Restored hypoxic pulmonary vasoconstriction by peripheral chemoreceptor agonists in dogs. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 789-795.

NAKANISHI S, HIRAMOTO T, AHMED N, NISHIMOYO Y. Almitrine enhances in low dose the reactivity of pulmonary vessels to hypoxia. *Respir Physiol* 1988; 74: 139-150.

NAKAYAMA K, UETA K, TANAKA Y, TANABE Y, ISHII K. Stretch-induced contraction of rabbit isolated pulmonary artery and the involvement of endothelium-derived thromboxane A₂. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 199-208.

NELIN LD, KRENTZ GS, RICKABY DA, LINEHAN JH, DAWSON CA. A distensible vessel model applied to hypoxic pulmonary vasoconstriction in the neonatal pig. *J Appl Physiol* 1993; 74 : 2049-2056.

NISHIWAKI K, NYHAN DP, ROCK P, DESAI PM, PETERSON WP, PRIBBLE CG, MURRAY PA. N^o-nitro-L-arginine and pulmonary vascular pressure-flow relationship in conscious dogs. *Am J Physiol* 1992; 262: H1331-H1337.

NOSSAMAN BD, KAYE AD, FENG CJ, KADOWITZ PJ. Effects of charybdotoxin on responses to nitrovasodilators and hypoxia in the rat lung. *Am J Physiol* 1997; 272: L787-L791.

OGATA M, OHE M, KATAYOSE D, TAKISHIMA Y. Modulatory role of EDRF in hypoxic contraction of isolated porcine pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1992; 262: H691-H697.

OHE M., OGATA M., KATAYOSE D., TAKISHIMA T. Hypoxic contraction of prestretched human pulmonary artery. *Respir Physiol* 1992; 87:105-114.

OKA M, HASUNUMA K, WEBB SA, STELZNER TJ, RODMAN DM, McMURTRY IF. 1993. EDRF suppresses an unidentified vasoconstrictor mechanism in hypertensive rat lungs. *Am J Physiol* 1993; 264: L585-L597.

OMAR HA, WOLIN MS. Endothelium-dependent and independent cGMP mechanisms appear to mediate O₂ responses in calf pulmonary resistance arteries. *Am J Physiol* 1992; 262: L560-L565.

ORTON EC, RAFFESTIN B, McMURTRY IF. Protein kinase influences rat pulmonary vascular reactivity. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 654-658.

PACE JB. Influence of carotid occlusion on pulmonary vascular resistance in anesthetized dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978; 158: 215.

PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-667.

PANOS RJ, BAKER SK. Mediators, cytokines, and growth factors in liver-lung interactions. *Clin Chest Medicine* 1996; 17: 151-169.

PEPKE-ZABA J, HIGENBOTTAM TW, DINH-XUAN AT, RIDDEN C, KEALEY T. α -Adrenoceptor stimulation of porcine pulmonary arteries. *Eur J Pharmacol* 1993; 235: 169-175.

PERMUTT S, BROMBERGER-BARNEA B, BANE HN. Alveolar pressure, pulmonary venous pressure and the vascular waterfall. *Med Thorac* 1962; 19: 239-260.

PERSSON MG, GUSTAFSSON LE, WIKLUND NP, MONCADA S, HEDQVIST P. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic response *in vivo*. *Acta Physiol Scand* 1990; 140: 449-457.

PETROS A, BENNETT D, VALLANCE P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338: 1557-1558.

PIZCUETA MP, PIQUE JM, BOSCH J, WHITTLE BJR, MONCADA S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 184-190.

POST JM, HUME JR, ARCHER SL, WEIR EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992; 262 :C882-890.

POST JM, GELBAND CH, HUME JR. $(Ca^{2+})_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ Res* 1995; 77: 131-139.

RABINOVITCH MW, GAMBLE AS, NADAS, MIETTINEN O, REID L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia : hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 1979; 236 : H818-H827.

RADI R, RODRIGUEZ M, CASTRO L, TELLERI R Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxyntirite. Arch Biochem Biophys 1994; 308: 89-95.

REES CR, PALMAZ JC, GARCIA O, ALVARADO R, SIEGLE RL. The hemodynamic effects of the administration of ionic and nonionic contrast materials into the pulmonary arteries of a canine model of acute pulmonary hypertension. Invest Radiol 1988; 23: 184-189.

REES DD, CELLEK S, PALMER RMJ, MONCADA S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone. An insight into endotoxin shock. Biochem Biophys Res Commun 1990; 173: 541-547.

RICH GF, ROOS CM, ANDERSON CM, URICH DC, DAUGHERTY MO, JOHN RA. Inhaled nitric oxide: dose response and the effects of blood in the isolated rat lung. J Appl Physiol 1993; 75: 1278-1284.

RODMAN DM, YAMAGUCHI T, HASUNUMA K, O'BRIEN RF, McMURTRY IF. Effects of hypoxia on endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary artery. Am J Physiol 1990; 258: L207-L214.

RODMAN DM, VOELKEL NF. Regulation of vascular tone. In CRYSTAL RG, WEST JB, WEIBEL ER & BARNES PJ. «The Lung: Scientific Foundations», pp 1473-1492, Raven Publishers, Philadelphia 1997.

RODRIGUEZ-ROISIN R, ROCA J, AGUSTI AGN, MASTAI R, WAGNER PD, BOSCH J. Gas exchange and pulmonary vascular reactivity in patients with liver cirrhosis. Am Rev Respir Dis 1987; 135: 1085-1092.

RODRIGUEZ-ROISIN R, AGUSTI AGN, ROCA J. The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities (Editorial). *Thorax* 1992; 47: 897-902.

ROLLA G, BUCCA C, BRUSSINO L. Methylene blue in the hepatopulmonary syndrome (Letter). *N Engl J Med* 1994; 331: 1098.

ROLLA G, BRUSSINO L, COLAGRANDE P, DUTTO L, POLIZZI S, SCAPPATICCI E, BERGERONE S, MORELLO M, MARZANO A, MARTINASSO G, SALIZZONI M, BUCCA C. Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26: 842-847.

ROMALDINI H, RODRIGUEZ-ROISIN R, WAGNER PD, WEST JB. Enhancement of hypoxic pulmonary vasoconstriction by almitrine in the dog. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 288-293.

ROTTA A, CANEPA A, HURTADO A, VELASQUEZ T, CHAVEZ R. Pulmonary circulation at sea level and at high altitudes. *J Appl Physiol* 1956; 9 : 328.

RUBANYI GM, ROMERO JC, VANHOUTTE PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H1145-H1149.

SALGO MG, STONE K, SQUADRITO GL, ATTISYA JR, PRYOR WA. Peroxynitrites causes DNA nicks in plasmid pBR332. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 1025-1030.

SALVATERRA CG, GOLDMANN WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary myocytes. *Am J Physiol* 1993; 264 : L323-L328.

SCHINI VB, VANHOUTTE PM. Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 553-559.

SCHRAUFNAGEL DE, KAY JM. Structural and pathologic changes in the lung vasculature in chronic liver disease. *Clin Chest Medicine* 1996; 17: 1-15.

SCHRAUFNAGEL DE, MALIK R, GOEL V, OHARA N, CHANG SW. Lung capillary changes in hepatic cirrhosis in rats. *Am J Physiol* 1997; 272: L139-L147.

SCHRAUFSTATTER IU, HINSHAW DB, HYSLOP PA, SPRAGG RG, COCHRANE CG. Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 1986; 77: 1312-1320.

SCHRIJEN F, SAUNIER C, CHABOT F. Peripheral pulmonary vascular resistance. *J Appl Physiol* 1993; 74: 613-616.

SHAUL PW, FARRAR MA, ZELLERS TM. Oxygen modulates endothelium-derived relaxing factor production in fetal pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1992; 262 : H355-H364.

SHEBUSKI RJ, FUJITA T, RUFFOLO RR Jr. Evaluation of alpha-1 & and alpha-2 adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the in situ, autoperfused, pulmonary circulation of the anesthetized dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 217-223.

SHIRAI M, SHIMOUCI A, KAWAGUCHI AT, IKEDA S, SUNAGAWA K, NINOMIYA I. Endogenous nitric oxide attenuates hypoxic vasoconstriction of small pulmonary arteries and veins in anesthetized cats. *Acta Physiol Scand* 1997; 159: 263-264.

SHOUKAS AA. Pressure-flow and pressure-volume relations in the entire pulmonary vascular bed of the dog determined by two-port analysis. *Circ Res* 1975; 37: 809-818.

SIEBER CC, GROSZMANN RJ. *In vitro* hyporeactivity to methoxamine in portal hypertensive rats: reversal by nitric oxide blockade. *Am J Physiol* 1992; 262: G996-G1001.

SOGNI P, MOREAU R, OHSUGA M, CAILMAIL S, OBERTI F, HADENGUE A, PUSSARD E, LEBREC D. Evidence for normal nitric oxide-mediated vasodilator tone in conscious rats with cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16: 980-983.

SOGNI P, GARNIER P, GADANO A, MOREAU R, DALL'AVA-SANTUCCI J, DINH-XUAN AT, LEBREC D. Endogenous pulmonary nitric oxide production measured from exhaled air is increased in patients with severe cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 23: 471-473.

STAMLER JS, LOH E, RODDY MA, CURRIE KE, CREAGER MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89: 2035-2040.

STEEDS RP, THOMPSON JS, CHANNER KS, MORICE AH. Response of normoxic pulmonary arteries of the rat in the resting and contracted state to NO synthase blockade. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 99-102.

STEVENS T, CORNFIELD DN, McMURTRY IF, ROFMAN DM. Acute reductions in PO₂ depolarize pulmonary artery endothelial cells and decrease [Ca²⁺]_i. *Am J Physiol* 1994; 266: H1416-H1421.

SZABO C, ZINGARELLI B, SALZMAN AL. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res* 1996; 78: 1051-1063.

SZAREK JL, BAILLY DA, STEWART NL, GRUETTER CA. Histamine H_1 -receptors mediate endothelium-dependent relaxation of rat isolated pulmonary arteries. *Pulm Pharmacol* 1992; 5: 67-74.

TESFAMARIAN B, COHEN RA. Inhibition of adrenergic vasoconstriction by endothelial cell shear stress. *Circ Res* 1988; 63: 720-725.

TOLINS M, WEIR EK, CHESLER E, NELSON DP, FROM AHL. Pulmonary vascular tone is increased by a voltage-dependent calcium channel potentiator. *J Appl Physiol* 1986; 60: 942-948.

VALLANCE P, MONCADA S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 331: 776-778.

VAN ZWIETEN PA. Pharmacologic profile of urapidil. *Am J Cardiol* 1989; 64 : 1D-6D.

VILLA LM, SALAS E, DARLEY-USMAR VM, RADOMSKI MW, MONCADA S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12383-12387.

VON EULER US, LILJESTRAND G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946; 12: 301-320.

WANG J, JUHASZOVA M, RUBIN LJ, YUAN XJ. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺ channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 2347-2353.

WARREN J, MALTBY NH, McCORMACK D, BARNES P. Pulmonary endothelium-derived relaxing factor is impaired in hypoxia. *Clin Sci* 1989; 77: 671-676.

WEIR EK, ARCHER SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction : the tale of two channels. *FASEB J* 1995; 9: 183-189.

WEST JB, DOLLERY CT, NAIMARK A. Distribution of blood flow in isolated lung: relation to vascular and alveolar pressures. *J Appl Physiol* 1964; 19 : 713-724.

WIENER CM, DUNN A, SYLVESTER JT. ATP-dependent K⁺ channels modulate vasoconstrictor responses to severe hypoxia in isolated ferret lungs. *J Clin Invest* 1991; 88: 500-504.

WOLFF DJ, LUBESKIE A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthesis. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316: 290-301.

WU M, PRITCHARD KAJ, KAMINSKI PM, FAYNGERSH RP, HINTZE TH, WOLIN MS. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am J Physiol* 1994; 266 : H2108-H2113.

WU Y, BURNS RC, SITZMANN JV. Effects of nitric oxide and cyclooxygenase inhibition on splanchnic hemodynamics in portal hypertension. *Hepatology* 1993; 18: 1416-1421.

YOUNG TE, LUNDQUIST LJ, CHESLER E, WEIR EK. Comparative effects of nifedipine, verapamil, and diltiazem on experimental pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 1983; 51: 195-200.

YU SM. Thaliporphine selectively inhibits expression of the inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase. *Biochem J* 1994; 303: 289-294.

YUAN X.J, TOD ML, RUBIN LJ, BLAUSTEIN MP. Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1990; 259: H281-H289.

YUAN XJ, GOLDMAN WF, TOD ML, RUBIN LJ, BLAUSTEIN MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993; 264 : L116-L123.

ZELENKOV P, McLOUGHIN T, JOHNS RA. Endotoxin enhances hypoxic constriction of rat aorta and pulmonary artery through induction of EDRF/NO synthase. *Am J Physiol* 1993; 265: L346-L354.

ZEMBOWICZ A, HATCHETT RJ, RADZISZEWSKI W, GRYGLEWSKI RJ. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase by ebselen. Prevention by thiols suggests the inactivation by ebselen of a critical thiol essential for the catalytic activity of nitric oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 1112-1118.

ZHANG J, DAWSON VL, DAWSON TM, SNYDER SH. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263: 687-689.

ZIDULKA A, HAKIM TJ. Wedge pressure in large vs small pulmonary arteries to detect pulmonary venoconstriction. *J Appl Physiol* 1985; 59: 1329-1332.

ANNEXES





TAL ANTOINE-BÉCLÈRE

ue de la Porte-de-Trivaux
CLAMART Cedex
01 45 37 44 44
u central des Rendez-Vous
01 41 07 95 95 ligne directe
ent Jean Hamburger

ICE DE PNEUMOLOGIE
mation Respiratoire

le Service
DUROUX

t
SIMONNEAU

iens hospitaliers
PARENT
SITBON

de Clinique et Assistant
FARTOUKH
HUMBERT

és
ANGEBAULT
GIRARD
HERVE
LEGALL
LE ROY LADURIE
PHAM

ariat Médical
1 45 37 47 76
1 45 37 47 79
1 46 30 38 24

TALISATION

Infirmier Supérieur
REBILLARD
7 49 68

Infirmiers :

nation
LEGENDRE
7 47 78

BARRE
LAURÈS
7 47 86

ocial
JEGADO
7 47 87

La thèse du Docteur F. CHABOT commence par un résumé très clair et très précis des caractéristiques anatomiques, fonctionnelles et métaboliques de la circulation pulmonaire chez l'homme et l'animal normaux.

Cette thèse se poursuit par les études de pharmacologie sur la circulation pulmonaire réalisées in vitro et in vivo.

A - Résultats in vitro :

- La technique utilisée est la réponse fonctionnelle d'un anneau vasculaire pulmonaire à une stimulation pharmacologique.

- Une première étude concerne des rats ayant une cirrhose biliaire et dont on pouvait penser qu'ils présenteraient une hyporéactivité vasculaire pulmonaire. Il a été vérifié que ces rats présentaient une réponse moindre à la Phényléphrine ; le LNA en pré-traitement, qui est un inhibiteur de la NO synthase, augmente la réponse à la Phényléphrine et restaure la réactivité vasculaire pulmonaire.

Cette étude montre le rôle du NO dans les anomalies de la circulation pulmonaire en cas de cirrhose hépatique ; ils éclairent la pathogénie du syndrome hépato-pulmonaire des cirrhotiques chez l'homme.

- La deuxième étude a étudié les propriétés vasodilatatrices du peroxy-nitrite (PNO) ; ces propriétés ont été confirmées probablement par activation du PARS, déplétion rapide en ATP et réduction de la contraction du muscle lisse vasculaire. Le PNO et le NO pourraient avoir des effets vasodilatateurs par des mécanismes d'action différents ; ils suggèrent l'utilité thérapeutique possible des inhibiteurs de la PARS en particulier au cours du sepsis.

B - Résultats in vivo :

- Les techniques utilisées permettent chez l'animal entier d'étudier la circulation pulmonaire dans son ensemble et les circulations pulmonaires localisées périphériques ; cette dernière technique est originale ; son intérêt, ses limites, sont très précisément décrites dans cette thèse.

- Très intéressants sont les résultats pharmacologiques obtenus au niveau des résistances vasculaires pulmonaires périphériques (RVPP) : en particulier, l'hypoxie augmente plus les RVPP que les résistances globales.

Les RVPP ne sont pas modifiées en normoxie par les bloqueurs des canaux calciques.

Les activateurs des canaux K^+ ne modifient pas les RVPP.

Les bloqueurs α - n'ont aucun effet en hypoxie et normoxie.

En hypoxie, le tonus vasculaire périphérique est augmenté par l'almitrine ; il revient à la normale après administration de nicardipine.

C - Commentaires :

- La thèse est claire et précise.

- Les résultats sont présentés en fixant toujours les avantages mais également les limites de ces études.

- Les techniques utilisées sont intéressantes en particulier l'étude des RVPP chez l'animal entier. D'autres techniques auraient pu être développées en particulier celles qui étudient la répartition des résistances : pré-capillaire, capillaire et post-capillaire.

- Il existe dans cette thèse un ensemble de travaux qui est homogène et intéressant ; la clinique humaine est souvent la base à ces travaux (par exemple cirrhose du foie, sepsis). Des retombées thérapeutiques sont envisagées.

- Il conviendrait pour l'avenir d'élargir probablement la thématique développée. Il faudrait surtout associer à l'exploration physiologique classique des méthodes d'étude plus récentes : biologie moléculaire, en particulier étude des signalisations intracellulaire.

Le rapporteur donne sans réserve un avis très favorable à la soutenance de thèse du Docteur F. CHABOT.

Fait à Clamart, le 9/5/1998

Professeur P. DUROUX

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Duroux', written over a horizontal line.

Introduction: I have read the thesis of François Chabot "Études pharmacologique in vitro et in vitro de la circulation pulmonaire. Applications à la circulation pulmonaire périphérique en air et en hypoxie in vivo".

The thesis is a compilation of experiments conducted both in vivo (establishment of a new method for studying pressure/volume relationship in the dog) and in vitro (studies using pulmonary artery rings to evaluate the role of nitric oxide (NO) in experimental cirrhosis).

The thesis focuses on three topics:

1. Hepatopulmonary syndrome-Dr. Chabot examines the hypothesis that excessive production of NO inhibits various forms of pulmonary vasoconstriction, including hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), thereby promoting ventilation/perfusion (V/Q) mismatch and hypoxemia
2. Sepsis impairs responsiveness of the pulmonary arteries (PA) to vasoconstrictors -Dr. Chabot hypothesizes that peroxynitrite (ONOO) is formed by the interaction of NO and O₂ radicals and that this then modulates pulmonary vascular tone
3. Pressure/flow relationships in vivo-Dr. Chabot proposes a new means of studying pressure/flow (P/Q) in vivo to obviate the errors caused by reducing total lung flow to very low levels or using non-blood perfusates

I am familiar with the publications Dr. Chabot has authored and have visited his laboratory in Nancy.

Literature review: Dr. Chabot presents a balanced and thorough review of the literature. It is rare to see as focused and clear a summary. The literature review deals with subject matter with which I am quite familiar (HPV, the role of NO in the modulation of pulmonary vascular tone). He uses the review to set the stage for his thesis and establish the areas of investigation he wishes to pursue.

He indicates pulmonary vascular resistance (PVR) is largely controlled by muscular, precapillary arteries. He discusses the many endothelial constrictor and dilator substances, which modulate the tone of the pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC). He is clearly well grounded in pulmonary hemodynamics. However, he also understands the pharmacology and electrophysiology of this circulation. He reviews the regulation of NO synthase (NOS) and concludes pulmonary vasoconstriction is moderated by a compensatory increase in NO synthesis. I enjoyed his discussion of the role of K⁺ channels in HPV-he displays a mastery of the literature in this area.

In the case of P/Q he points out the absence of an adequate means to characterize pressure/flow in vivo, particularly at low flows. He indicates the potential value of an in vivo means of determining P/Q, both to understand physiology and to test the hemodynamic effects of various drugs.

He also establishes that there is an animal model for the human condition of "hepatopulmonary syndrome", in which cirrhotic patients develop a syndrome of depressed PVR and hypoxemia. The hypoxemia appears to relate to excessive NO production, which suppresses HPV and thus promotes intrapulmonary shunting. He then sets the stage for evaluating this proposed mechanism in PA rings from cirrhotic rats.

In the case of sepsis, a condition with excess NO and O₂ radical production, he notes there is increased production of ONOO. He proposes testing the hypothesis that this excess in ONOO explains vascular hyporeactivity to a variety of vasoconstrictors-such as phenylephrine.

Experimental Models:

Cirrhosis: The model of cirrhosis was created by ligating the biliary duct, allowing the rat to recover and then awaiting the development of cirrhosis over the next month. The model is reasonable and was validated by histological confirmation that cirrhosis did occur. The experimental studies largely focused on studies of vascular reactivity in isolated PA rings from these rats.

V/Q: He uses the anesthetized dog to study P/Q. Unlike conventional models in which V/Q is studied by varying flow to the entire lung, he uses a model in which a double-lumen catheter was wedged into a lobar artery. Flow to the lobe can be terminated by balloon inflation (wedge) and wedge pressure is measured, flow can be varied by graded infusion of blood (aspirated from a proximal port on the catheter). This allows flow to be reduced to 0 ml/min without causing acidosis or hypotension. Furthermore, since the flow is augmented using mixed venous blood, artifacts caused by use of saline or blood of inappropriate PO₂ are avoided. The model was effective in showing a shift in V/Q caused by acute hypoxia. The model was shown to be highly reproducible, although there were considerable regional variations in PVR discovered. He is aware of the need to have the catheter and the PA branch aligned to avoid artifactually high resistances. Dr. Chabot then used this model to document that the contrast agent, Hexabrix, augments regional PVR. He also presents data using this model to prove that almitrine, a respiratory stimulant, increases PVR in a manner, which can be reduced by a calcium channel blocker (verapamil).

PA rings ± endothelium in experimental sepsis: ONOO is a dilator of pre constricted PA rings. This vasodilator effect is not inhibited by SOD or L-NAME but is blocked by the putative PARS inhibitor, 3-aminobenzamide. Dr. Chabot convincingly shows that ONOO causes pulmonary vasodilation at doses, which do not inhibit endothelial function.

Training: Dr. Chabot has had excellent training in the laboratories of Dr. Time Evans (London England) and Prof. Stridde, Nancy France. In addition he has worked closely with Dr. Tuan Dinh-Xuan, Cochin, Paris. Dr. Evans is an internationally recognized expert in the study of sepsis and the pulmonary circulation. Dr. Schrijen has a long and productive career in pulmonary physiology. Dr. Dinh-Xuan is an authority of nitric oxide in the lung. This superb faculty has provided the candidate with the necessary techniques and training to produce several excellent publications and a very lucid thesis.

Productivity: The candidate has been quite productive and has produced 4 excellent, first authored, publications in high quality peer-reviewed journals. I read each of these and found them clear and thorough. Dr. Chabot has also had several abstracts at important international meetings.

Work in progress: The thesis includes an interesting paper using the in vivo P/Q technique to show that NO is important in regulating PVR whereas KATP channels play little role in determining PVR. These results are consistent with reports using in vitro models.

Limitations of the studies-Virtually all of the limitations of the thesis have been identified by the candidate. For each of his studies Dr. Chabot has done a good job discussing the limitations of his experiments. The main area in which he acknowledges weaknesses is in the failure to measure

PARS activity. He also appropriately acknowledges that the V/Q studies are done in anesthetized dogs and the anesthesia itself may have hemodynamic effects.

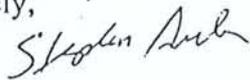
Questions for Dr. Chabot:

The following are the questions that I would pose if I were present for the thesis. None of these questions require a modification of the thesis.

1. Hepatopulmonary syndrome: It might have been useful to pharmacologically dissect the molecular origins of the excessive NO in this syndrome. Could Dr. Chabot please discuss the use of the preferential iNOS inhibitors, such as aminoguanidine, to inhibit iNOS and ascertain the relative contribution of various NOS isoforms to this syndrome.
2. Effect of NOARG in normal PA rings: If sepsis causes excess NO production it makes sense that a NOS inhibitor should, as demonstrated, restore constrictor responses to phenylephrine. However, it is surprising (and unexplained) why NOS inhibition does not enhance phenylephrine-constriction in normal arteries. Most studies have found that NOS-inhibition enhances vasoconstriction even in normal arteries, since there is a compensatory NO synthesis, which counters vasoconstriction. Please discuss.
3. PARS: Dr. Chabot presents evidence that ONOO inhibits vascular tone by inhibition of a mitochondrial enzyme, PARS (adenosine 5-diphosphoribose synthase). Inhibition of this enzyme is thought to diminish the production of high energy phosphates. It is concerning that this conclusion rest primarily of the specificity of a single PARS inhibitor-3-aminobenzamide. Dr. Chabot should discuss what measurements could be made to document changes in energy state (phosphocreatine, ATP) and what other PARS inhibitors might now be available (if any).
4. Applicability of the P/Q technique to studies in humans-It would be interesting to hear Dr. Chabot discuss the possibility of using this technique in humans.

Conclusions: I regret that I will not be able to be present for the thesis defense. However, this is an excellent thesis and I strongly support that François Chabot be awarded his Ph.D. with felicitations. Based on the quality of the thesis, the merit of the associated publications and my personal interaction with Dr. Chabot I have complete confidence he will be a great credit to L'Université Henri Poincaré. Thank you for giving me the chance to be involved in this outstanding thesis.

Yours sincerely,



Stephen L. Archer MD. FRCP(C)
Professor of Medicine
Director Division of Cardiology
Heart and Stroke Foundation Chair
University of Alberta Hospitals
2C2.36 Walter Mackenzie Health Sciences Center
Telephone: 1-403-492-6353
Fax: 1-403-491-6689
slarcher@cha.ab.ca

Responses to the questions of Pr ARCHER

To the first question: «Hepatopulmonary syndrome: It might have been useful to pharmacologically dissect the molecular origins of the excessive NO in this syndrome. Could Dr Chabot please discuss the use of the specific iNOS inhibitors, such as aminoguanidine, to inhibit iNOS and ascertain the relative contribution of various isoforms to this syndrome?».

Various methods can be used to dissect the molecular origins of the excessive NO in this syndrome :

A- Pharmacological methods with specific inhibitors of iNOS such as aminoguanidine or thialorphone, specific inhibitors of cNOS such as calmidazolium or ebselen. The comparison of the effects of these various inhibitors of NOS on pulmonary vascular rings would be useful.

Mechanical removal of the endothelium is another interesting method to study the relative importance of eNOS (endothelial localization) and iNOS (in endothelium and vascular smooth muscle).

B- Biochemical studies of the NO pathway :

- biological assays of NO : measurement of the production of citrulline (as a surrogate for NO) from arginine could be studied by chromatography.
- eNOS and iNOS proteins can be detected by specific antibodies (Western blot).
- mRNA : use of specific probes for eNOS and iNOS mRNA.
- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) to identify DNA.

C- Immunohistochemical staining with antibodies to identify cells expressing e-NOS or i-NOS.

Recently an increase in the NO synthesis was shown to occur in hepatopulmonary syndrome (Fallon *et al.*, 1997). In the study, the authors, using the same animal model as we did (Chang & Ohara, 1992), showed an increase in pulmonary endothelial eNOS. No change in pulmonary iNOS levels or localization was detected. Increased eNOS levels correlated with the alterations in gas exchange and were accompanied by enhanced NO activity and a blunted response to phenylephrine, reversible by NOS inhibition, in pulmonary artery rings (Fallon *et al.*, 1997).

To the second question: «Effect of L-NA in normal PA rings: if sepsis causes excess NO production, it makes sense that a NOS inhibitor should, as demonstrated, restore constrictor responses to phenylephrine. However, it is surprising (and unexplained) why NOS inhibition does not enhance phenylephrine-constriction in normal arteries. Most studies have found that NOS-inhibition enhances vasoconstriction even in normal arteries, since there is a compensatory NO synthesis, which counters vasoconstriction. Please discuss».

Two hypotheses could be considered:

A- partial NO endothelial dysfunction induced by endothelial lesions during dissection of the pulmonary vascular rings.

B- difference in the type of rat used (Sprague-Dawley) in the experiments. In some studies, NOS inhibition does not enhance phenylephrine-constriction in normal arteries, like for example, in the study of Fallon *et al.* This study was made with Sprague-Dawley rats.

To the third question: «Dr Chabot presents evidence that ONOO inhibits vascular tone by inhibition of a mitochondrial enzyme, PARS. Inhibition of this enzyme is thought to diminish the production of high energy phosphates. It is concerning that this conclusion rests primarily of the specificity of a single inhibitor, 3-aminobenzamide. Dr Chabot should discuss what measurements could be made to document changes in energy state (phosphocreatine, ATP) and what other PARS inhibitors might now be available (if any)».

A- Various techniques could be used to measure changes in energy state

a- RMN with ³¹P spectroscopy is useful to show a spectrum of intracellular pH, creatine concentration, ATP, inorganic phosphate and ATP/phosphocreatine.

b- cAMP and cGMP could be measured by immuno or enzymatic assay.

c-ATP tissue levels.

d- Microdialysis: this method, used in other organs (gut, brain), has not been applied to vascular rings. The method allows measurements of ATP or adenosine from pericellular interstitial liquid.

B- Other PARS inhibitors

3-aminobenzamide is the most often used PARS inhibitor (Banasik *et al.*, 1992). Its specificity is low but in our experiments, it inhibited effects of peroxynitrite but did not inhibit actions of acetylcholine (and thus NO).

Drugs as thymidine or nicotinamide are not used *in vivo* because of their side effects. More specific inhibitor have a very low aqueous solubility and need to be dissolved first in Me₂SO and then in water (Banasik *et al.*, 1992). We do not know of any other PARS inhibitor which would be easier to use and more specific.

To the fourth question: «Applicability of the P/Q technique to studies in humans. It would be interesting to hear Dr Chabot discuss the possibility of using this technique in humans».

We do not think that this technique could be used in humans for several reasons:

A- The technique requires right heart catheterization. It is invasive and slow, and needs the insertion of another pulmonary arterial catheter, with extracorporeal circulation. It thus carries the risks of right heart catheterization and extracorporeal circulation.

B- The pathophysiological interest of the study is unquestionable but the therapeutic consequences for the patient are less certain. Very few drugs can be studied during each experiment and, after vasodilator use, it would be necessary to study another peripheral pulmonary site. Moreover, for patients with pulmonary hypertension, it would be necessary to study several peripheral pulmonary sites to be sure of the beneficial effects of a vasodilator.

C- For these reasons, it is doubtful that an ethical committee would allow the use of this technique in humans.

Première question : « Syndrome hépatopulmonaire (SHP): il aurait pu être utile de préciser l'origine moléculaire de l'excès de NO observé dans ce syndrome avec l'utilisation d'inhibiteurs de l'iNOS comme l'aminoguanidine pour inhiber l'iNOS et préciser la contribution relative des différentes isoformes de l'enzyme au SHP ».

Il est certain qu'il aurait été intéressant de préciser l'origine de l'excès de NO. Plusieurs méthodes pourraient être utilisées. Ces méthodes sont complémentaires.

A- Méthode pharmacologique.

a- Nous avons utilisé un inhibiteur de la NOS, le L-NA. Certains inhibiteurs de la synthèse de NO sont plus spécifiques des isoformes constitutives comme le calmidazolium, un inhibiteur de la calmoduline qui est un cofacteur indispensable à l'action de la cNOS (Schini & Vanhoutte, 1992) ou l'ebesen qui, par l'intermédiaire de radicaux thiols, inhibe l'action catalytique de la cNOS (Zembowicz *et al.*, 1993). D'autres inhibiteurs sont spécifiques de la NOS inductible, comme l'aminoguanidine (Wolff & Lubeskie, 1995) et la thaliporphine (Yu 1994). Dans notre étude, l'origine du NO aurait pu être précisée en réalisant les expériences avec 4 sous groupes d'anneaux vasculaires pulmonaires isolés prétraités selon le protocole suivant (1- inhibiteur spécifique de l'iNO : aminoguanidine; 2- inhibiteur de la cNOS : calmidazolium; 3- inhibiteur non spécifique de la NOS : L-NA; 4- contrôle : absence d'inhibiteur) dans chaque groupe d'animaux, cirrhotiques et témoins. La comparaison des résultats aurait permis sans doute de préciser l'origine de l'excès de NO.

b- Le retrait mécanique de l'endothélium est une technique intéressante car la cNOS est localisée uniquement dans l'endothélium. Pour chaque animal, l'endothélium de la moitié des anneaux vasculaires pulmonaires aurait pu être retiré. La comparaison des résultats obtenus lors des expériences pharmacologiques sur les anneaux vasculaires isolés, avec et sans endothélium aurait permis d'établir le rôle de l'endothélium et donc l'origine de l'excès de NO (endothéliale ou inductible).

B- *Les études biochimiques de la voie du NO* pourraient apporter des résultats complémentaires utiles.

a- les dosages biologiques du NO

Le principe repose sur une étude de la production de citrulline à partir de la L-arginine. Cette production est le témoin de l'activité biologique du NO car pour chaque molécule de citrulline libérée, une molécule de NO est synthétisée. Cette étude est faite par chromatographie échangeuse d'ions. L'arginine marquée au tritium est mise dans la colonne où en présence d'oxygène elle est transformée en citrulline. L'arginine tritiée est bloquée dans la colonne. La quantité de citrulline tritiée libérée reflète une libération équivalente de NO. En utilisant un milieu riche en cofacteurs (Calmoduline et calcium), le taux de NO d'origine endothéliale est estimé.

Un milieu dépourvu de ces cofacteurs donne le NO d'origine inductible. Toutefois, la faisabilité et la signification de ces dosages biologiques dans le liquide du bain d'organe est à évaluer.

b- les dosages de protéines, voire d'ARNm et d'ADN peuvent être fait après les expériences pharmacologiques, sur un broyat d'anneaux vasculaires pulmonaires isolés :

- Les protéines eNOS et iNOS sont identifiées par Western blot avec des anticorps spécifiques.
- L'utilisation de sondes spécifiques dirigées contre les ARNm permet d'identifier les ARNm d'eNOS et d'iNOS et donc de préciser l'origine de l'excès de NO.
- Après identification de l'ARN, l'utilisation de la Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) permet d'identifier le segment de DNA à l'origine de la synthèse de NO.

C- *L'immunohistochimie.* L'anneau vasculaire pulmonaire est fixé puis incubé avec des anticorps. L'utilisation d'anticorps marqués dirigés contre une protéine (e-NOS ou i-NOS) permet l'identification des cellules exprimant ces protéines. La comparaison des anneaux vasculaires provenant de rats cirrhotiques et de rats témoins identifie l'origine de l'excès de NO.

Une étude récente (Fallon *et al.*, 1997) a apporté des éléments importants en faveur d'une augmentation de la synthèse de NO au cours du syndrome hépatopulmonaire en utilisant certaines de ces techniques dans le modèle de syndrome hépatopulmonaire de Chang & Ohara (1992). Les taux de protéines, la localisation régionale des iNOS et eNOS dans le poumon et l'activité NO dans des anneaux vasculaires pulmonaires isolés estimée par l'effet du L-NAME ont été étudiés. Il existe une augmentation des taux de NOS endothéliale. Cette augmentation de NOS endothéliale est corrélée au gradient alvéolo-artériel d'oxygène qui reflète la sévérité du SHP. Il s'y associe une augmentation de la densité de la NOS endothéliale dans les vaisseaux pulmonaires alvéolaires provenant de rats ayant un syndrome hépatopulmonaire. La concentration et la localisation de la NOS inductible ne sont pas modifiées par rapport aux rats témoins (Fallon *et al.*, 1997). L'augmentation de l'expression de la NOS endothéliale pourrait être secondaire à une augmentation des forces de cisaillement sur les parois vasculaires induites par le syndrome hyperkinétique, la nature du stimulus à l'origine du syndrome hyperkinétique restant à déterminer.

Deuxième question : « Syndrome hépatopulmonaire. Effet du L-NA dans des anneaux vasculaires pulmonaires isolés provenant de rats témoins : il est surprenant de ne pas observer d'augmentation de la réponse vasoconstrictrice à la phényléphrine après inhibition de la NOS. Dans la majorité des études, l'inhibition de la NOS augmente la vasoconstriction des artères provenant de rats témoins car il existe une augmentation de synthèse du NO qui limite la vasoconstriction ».

Dans la majorité des études, les analogues de la L-arginine potentialisent la vasoconstriction pharmacologique d'artères pulmonaires provenant de rats sains. Deux hypothèses pourraient être envisagées.

a- une déplétion endothéliale partielle en NO liée à des lésions endothéliales lors de la dissection. En effet, lors de l'administration d'acétylcholine, la relaxation était de l'ordre de 40 à 50% de la valeur de base obtenue après précontraction. La valeur de cette vasorelaxation est moins importante que celles souvent rapportées dans des conditions expérimentales similaires. Nous ne pouvons pas exclure que des lésions endothéliales expliquent en partie l'absence d'effet du L-NAME sur les vaisseaux témoins. Toutefois, dans la mesure où les conditions expérimentales sont les mêmes, cette hypothèse ne rend pas compte de l'augmentation de tonus observée avec le L-NAME sur les vaisseaux provenant de rats souffrant de syndrome hépatopulmonaire.

b- la race de rats (Sprague-Dawley) utilisée pour les expériences pourrait peut-être intervenir. Les résultats observés dans les différentes expériences avec les analogues de la L-arginine dépendent de l'espèce étudiée (Barnard *et al.*, 1993). Dans la majorité des études réalisées chez le rat, les analogues de la L-arginine potentialisent la vasoconstriction pharmacologique d'artères pulmonaires provenant d'animaux sains. Cependant d'autres études ne confirment pas ces résultats. Par exemple, dans l'étude de Fallon *et al.*, le prétraitement des anneaux vasculaires pulmonaires isolés provenant des rats témoins (Sprague-Dawley, poids 200-250g) par du L-NAME (0,3 mmole/L), n'augmente pas de manière significative la réponse contractile des anneaux vasculaires à des doses croissantes de phényléphrine (10^{-9} à 10^{-5} M) (Fallon *et al.*, 1997). Cette étude, comme la nôtre, a été réalisée avec des rats Sprague-Dawley.

Troisième question : « Le peroxy-nitrite diminue le tonus vasculaire pulmonaire en inhibant la PARS. L'inhibition de cette enzyme est probablement à l'origine d'une baisse de la production de phosphates riches en énergie. Les résultats observés dans l'étude reposent sur la spécificité d'un seul inhibiteur, le 3-aminobenzamide. Quelles mesures auraient pu être faites pour préciser les changements d'état énergétique (phosphocréatine, ATP) et quels autres inhibiteurs sont actuellement disponibles ? ».

A- Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour mesurer les changements d'états énergétiques :

a- La spectroscopie RMN au ^{31}P permet de visualiser sous forme de spectre, le pH intracellulaire, les concentrations en créatine, ATP, phosphate inorganiques et la balance entre ATP et phosphocréatine.

Cette technique permet un monitoring continu de l'état énergétique tout au long de l'expérimentation. Toutefois, elle ne permet pas de préciser l'origine cellulaire des variations énergétiques mises en évidence (endothélium, cellule musculaire lisse vasculaire, adventice).

b- Les dosages dans le bain d'organe des composés riches en énergie : ATP, GTP, AMPc, GMPc peuvent révéler des variations énergétiques.

ATP et GTP : dosages par HPLC en fluorescence (greffe d'un radical fluorescent puis HPLC avec phase mobile en acide sulfurique et colonne thermostatée à 37°C). AMPc et GMPc sont dosés par méthode enzymatique ou immunologique.

c- Des mesures du contenu tissulaire en ATP peuvent être réalisées dans un broyat tissulaire avec un dosage en HPLC ou enzymatique.

d- La microdialyse permet le dosage de l'ATP ou de l'adénosine contenu dans le liquide interstitiel qui baigne les cellules. C'est une méthode intéressante car l'ATP est non seulement un composé riche en énergie mais a également un rôle de signalisation. La mise en place de la sonde dans la couche cellulaire musculaire lisse ou l'intima devrait permettre de préciser l'origine cellulaire des molécules recueillies. Toutefois, cette technique validée pour d'autres organes (myocarde, intestin, cerveau) n'a pas été encore étudiée sur des anneaux vasculaires.

B- Autres inhibiteurs de la PARS

Le 3-aminobenzamide est l'inhibiteur de la PARS le plus utilisé (Banasik *et al.*, 1992). Sa spécificité n'est pas excellente mais, dans nos expériences, il inhibe l'action du peroxy-nitrite et non pas celle de l'acétylcholine (et donc du NO).

Il existe d'autres inhibiteurs de la PARS. Certaines molécules (thymidine, nicotinamide) ne sont pas utilisables *in vivo* en raison de leurs effets secondaires. Les molécules les plus spécifiques ont une faible solubilité dans l'eau et doivent être solubilisées dans du Me_2SO pour pouvoir être dissoutes dans l'eau ensuite, ce qui limite leur utilisation (Banasik *et al.*, 1992). Ces éléments

rendent compte de notre choix pour le 3-aminobenzamide. Nous ne connaissons pas d'autre inhibiteur de la PARS récent plus spécifique et d'usage aisé.

Quatrième question : « Applicabilité de la technique d'étude des relations pression/débit dans la circulation pulmonaire périphérique chez l'homme ».

Cette technique apparaît inapplicable actuellement chez l'homme pour plusieurs raisons.

a- Cette technique devrait être envisagée à l'occasion d'un cathétérisme cardiaque droit après réalisation des mesures hémodynamiques usuelles. C'est une technique invasive et longue, nécessitant au minimum la mise en place d'un deuxième cathéter artériel pulmonaire et incluant une circulation extracorporelle. Cette technique comporte donc des risques inhérents au cathétérisme cardiaque droit (complications des ponctions vasculaires, rupture vasculaire, infection) et également à la circulation extracorporelle (hémolyse, activation de radicaux libres de l'oxygène).

b- L'intérêt physiopathologique de ces études est certain mais les conséquences thérapeutiques, utiles pour le patient étudié, plus incertaines. Le nombre de drogues étudiées au cours d'une même séance est réduit avec nécessité de changer de territoire après l'utilisation d'un vasodilatateur. Cette règle pourrait peut être être modulée, notamment chez les patients souffrant d'HTAP, avec utilisation d'un nouveau vasodilatateur en l'absence de vasodilatation périphérique avec la première molécule. Cependant, plusieurs territoires devraient être étudiés pour confirmer l'effet vasoactif de la drogue étudiée. Le rapport bénéfice attendu/risque potentiel est donc faible.

c- Pour toutes ces raisons, il paraît peu vraisemblable que le Comité Consultatif pour la Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biologique accepte, dans l'état actuel des choses, de donner son accord pour l'utilisation de cette technique chez l'homme.

Nom, Prénom : CHABOT François

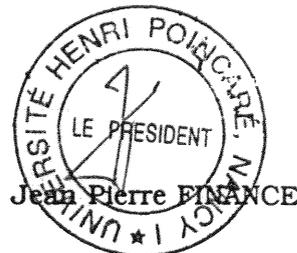
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 16 juin 1998 n°470

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



July 10th, 1998

Congratulations!

I have read the responses to my questions and am entirely satisfied with their spirit and content. I recommend they be considered adequate and the thesis considered complete.

Yours sincerely,

Professor Stephen Archer



RESUME

Cette thèse présente des études physiopathologiques et pharmacologiques de la circulation pulmonaire réalisées *in vitro* par la technique des anneaux vasculaires isolés et *in vivo*, par une technique originale mesurant les résistances vasculaires pulmonaires périphériques (RVPP). Dans un modèle de syndrome hépatopulmonaire, la réponse contractile à la phényléphrine des anneaux artériels pulmonaires réduite par rapport à celle d'anneaux provenant de rats normaux, est corrigée par un inhibiteur de la NO synthétase (NOS). L'hyporéactivité artérielle pulmonaire à la phényléphrine résulte probablement d'un excès de production de NO dans la circulation pulmonaire. Le rôle majeur du NO dans le tonus vasculaire pulmonaire nous a conduit à étudier les effets vasculaires pulmonaires du peroxy-nitrite, radical libre de l'oxygène produit en cas d'excès de production de NO et d'anion superoxyde. Le peroxy-nitrite provoque une relaxation des anneaux précontractés. Un prétraitement par le peroxy-nitrite avant une précontraction ne modifie pas la vasoréactivité à l'acétylcholine. L'action vasodilatatrice du peroxy-nitrite n'est pas modifiée par un inhibiteur de la NOS mais est inhibée par le 3-aminobenzamide, un inhibiteur de la poly (adénosine 5'-diphosphoribose) synthase (PARS), qui n'a pas d'effet sur la relaxation induite par l'acétylcholine. Ces résultats montrent que le peroxy-nitrite a un effet vasodilatateur sur les artères pulmonaires de rat par activation de la PARS. L'inhibition de l'action du peroxy-nitrite et non pas celle de l'acétylcholine par le 3-aminobenzamide suggère que l'effet vasodilatateur du peroxy-nitrite et du NO résulte de mécanismes d'action différents.

La vasoréactivité des différents segments vasculaires pulmonaires est variable. La relation pression-débit peut être déterminée dans la circulation pulmonaire périphérique chez des chiens anesthésiés en partant d'un débit nul sans interférer avec la circulation pulmonaire globale ni avec la circulation systémique. Cette relation peut être exprimée par sa pente ou RVPP. L'hypoxie augmente la RVPP. L'angiographie du territoire, nécessaire pour préciser son volume et la direction de l'artère principale du territoire, doit être faite après avoir réalisé l'ensemble des courbes pression-débit du territoire étudié car le produit de contraste augmente la RVPP. Les inhibiteurs des canaux calciques, sans action en normoxie, diminuent les RVPP en hypoxie. Cette baisse est observée aussi après une augmentation des RVPP par l'almitrine en hypoxie. Les RVPP sont augmentées par un inhibiteur de la NOS en normoxie et en hypoxie et diminuées par le nitroprussiate de sodium en hypoxie. Les activateurs des canaux potassiques et l'urapidil, un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, ne modifient pas les RVPP. Ces résultats soulignent l'importance de la voie du NO, suggèrent l'absence de canaux potassiques dépendants de l'ATP et de récepteurs α_1 -adrénergiques fonctionnels dans la circulation pulmonaire périphérique et sont en faveur d'un rôle important des canaux calciques dépendants du voltage dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire en hypoxie. L'ensemble des résultats démontre que, *in vivo* et dans ce modèle, la vasoréactivité pulmonaire périphérique est peu importante vis à vis de différents stimuli vasodilatateurs.

Mots-clés: vasomotricité pulmonaire ; cirrhose ; circulation pulmonaire périphérique ; hypoxie ; NO ; peroxy-nitrite ; inhibiteurs des canaux calciques ; activateurs des canaux potassiques ; almitrine ; urapidil.