



HAL
open science

MECANOTRANSDUCTION DE LA PRESSION ET DU DÉBIT DANS LA MICROCIRCULATION : RÔLE DE LA PULSATILITÉ

Frédéric Pinaud

► **To cite this version:**

Frédéric Pinaud. MECANOTRANSDUCTION DE LA PRESSION ET DU DÉBIT DANS LA MICROCIRCULATION : RÔLE DE LA PULSATILITÉ. Physiologie [q-bio.TO]. Université d'Angers, 2012. Français. NNT: . tel-00999425

HAL Id: tel-00999425

<https://theses.hal.science/tel-00999425>

Submitted on 3 Jun 2014

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.

MECANOTRANSDUCTION DE LA PRESSION ET DU DÉBIT DANS LA MICROCIRCULATION : RÔLE DE LA PULSATILITÉ

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Physiologie et Physiopathologie Humaine
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Présentée et soutenue publiquement

Le : 12 septembre 2012

À : Angers

Par : Frédéric PINAUD

Devant le jury ci-dessous :

Professeur Christophe BAUFRETON (examinateur), PU-PH, Université d'Angers
Docteur Olivier BLANC-BRUDE (rapporteur), Chargé de Recherche INSERM, Université Paris Descartes
Professeur Roland DEMARIA (rapporteur), PU-PH, Université de Montpellier I
Professeur Pierre-Yves LITZLER (examinateur), PU-PH, Université de Rouen
Docteur Laurent LOUFRANI (examinateur), Directeur de Recherche, CNRS, Université d'Angers

Directeur de thèse : Docteur Daniel HENRION

Laboratoire Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée
UMR-CNRS 6214, UMR-INSERM 1083
Faculté de Médecine, Rue Haute de Reculée 49045 ANGERS

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	6
1. Structure et fonction du système vasculaire	7
1.1. Généralités	7
1.2. Structure de la paroi vasculaire	9
1.2.1. Les artères élastiques ou de compliance	9
1.2.2. Les artères musculaires ou de résistance	11
2. Mécanotransduction	12
2.1. Généralités	12
2.2. Le tonus myogénique	14
2.2.1. Définition	14
2.2.2. Tonus myogénique et pathologies	15
2.3. La dilatation flux dépendante	16
3. Le Remodelage vasculaire	18
3.1. Généralités	18
3.2. Le remodelage dépendant de la pression	19
3.3. Le remodelage dépendant du débit	20
4. Le vieillissement vasculaire	21
5. Chirurgie Cardiaque, Circulation Extra-Corporelle et Pulsatilité	22
5.1. Généralités	22
5.2. Flux pulsé	23
5.2.1. Aspects hémodynamiques	23
5.2.2. Flux pulsés en CEC	24
5.2.3. Bénéfices cliniques de la CEC pulsée	25
5.3. Aspects microcirculatoires	26
5.3.1. Particularités anatomo-physiologiques de la microcirculation	26
5.3.2. Preuves de la pulsatilité dans la microcirculation	27
5.3.3. Impact de la pulsatilité	28
OBJECTIFS	31
RESULTATS	33
1. Article 1	34
2. Article 2	45
3. Article 3	53
DISCUSSION	64
ANNEXES ET COLLABORATIONS	72
REFERENCES	108
RESUME THESE	115

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS PRESENTEES DANS LA THESE :

1/ Dumont O, **Pinaud F**, Guihot AL, Baufreton C, Loufrani L, Henrion D. **Alteration in flow (shear stress)-induced remodelling in rat resistance arteries with aging: improvement by a treatment with hydralazine.** *Cardiovasc Res.* 2008 Feb 1;77(3):600-8. Epub 2007 Oct 30.

2/ Baufreton C, **Pinaud F**, Loufrani L, Henrion D. **Microcirculatory differences between pulsatile and non pulsatile cardiopulmonary bypass. Différences microcirculatoires entre CEC pulsée et non pulsée.** *ITBM-RBM* 28 (2007) S15–S20. French

3/ **Pinaud F**, Loufrani L, Toutain B, Lambert D, Vandekerckhove L, Henrion D, Baufreton C. **In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries.** *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Nov;142(5):1254-62. Epub 2011 Aug 16.

AUTRES PUBLICATIONS :

4/ Baufreton C, Corbeau JJ, **Pinaud F**. **Inflammatory response and haematological disorders in cardiac surgery: toward a more physiological cardiopulmonary bypass.** *Ann Fr Anesth Reanim.* 2006 May;25(5):510-20. Epub 2006 Feb 20. Review. French.

5/ **Pinaud F**, Bocquet A, Dumont O, Retailleau K, Baufreton C, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. **Paradoxical role of angiotensin II type 2 receptors in resistance arteries of old rats.** *Hypertension.* 2007 Jul;50(1):96-102. Epub 2007 May 7.

6/ Belin de Chantemèle EJ, Retailleau K, **Pinaud F**, Vessières E, Bocquet A, Guihot AL, Lemaire B, Domenga V, Baufreton C, Loufrani L, Joutel A, Henrion D. **Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Dec;28(12):2216-24. Epub 2008 Sep 25.

7/ Baufreton C, **Pinaud F**, Corbeau JJ, Chevailler A, Jolivot D, Ter Minassian A, Henrion D, de Brux JL. **Increased cerebral blood flow velocities assessed by transcranial Doppler examination is associated with complement activation after cardiopulmonary bypass.** *Perfusion.* 2011 Mar;26(2):91-8. Epub 2010 Dec 20.

LISTE DES ABREVIATIONS

CEC : Circulation Extra Corporelle

CML(s) : Cellule(s) Musculaire(s) Lisse(s)

DFD : Dilatation Flux Dépendante

DFD : Dilatation Flux Dépendante

EDRF endothelium-derived relaxing factor

EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

HF : Haut Flux

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1

NF : Normal Flux

NFkB nuclear factor-kappa B

NO : Monoxyde d'azote

ROS : Radicaux Oxygénés (Reactive Oxygen Species)

SNP : Nitroprussiate de Sodium

SOD : Superoxide dismutase

TEMPOL : SOD-mimetic 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl piperidinoxyl)

TGF : Transforming Growth Factor

TM : Tonus Myogénique

TM : Tonus Myogénique

TNF : Tumor Necrosis Factro

INTRODUCTION

1 - Structure et fonction du système vasculaire

1.1 Généralités

Le fonctionnement normal de l'organisme nécessite un apport en oxygène et en nutriments au niveau des tissus ainsi qu'une élimination des déchets (créatinine, CO₂, urée). C'est dans cette mission que le système cardiovasculaire joue son rôle le plus important en respectant une hiérarchie dans les distributions régionales : cerveau, rein, territoire splanchnique et membres. Le système cardiovasculaire est formé de différents acteurs : d'une pompe, le cœur et d'une tubulure, le système vasculaire. Le cœur se situe au début et à la fin de ce réseau hydraulique et permet la propulsion du sang, ce qui génère un débit sanguin pulsé

Le système vasculaire peut être divisé en deux parties : le **réseau artériel**, qui part du cœur vers les organes, et le **réseau veineux**, qui ramène le sang au cœur. La répartition du sang dans l'organisme impose une structure allant des plus gros vaisseaux (macrocirculation) aux plus fins (microcirculation).

Les artères se divisent en 2 types différents : les **artères élastiques** ou de conductance et les **artères musculaires** ou de résistance. Les artères élastiques comme aorte et carotide ont un rôle d'amortisseur de la pulsativité engendrée par l'activité cardiaque. Elles emmagasinent du sang pendant la systole qu'elles restituent pendant la diastole. Elles transforment le flot pulsatile discontinu du sang éjecté par le ventricule gauche en flot pulsé mais continu à la périphérie. Dans les grosses artères, la résistance à l'écoulement est très faible et la vitesse d'écoulement du sang est très élevée. A l'opposé, les artères musculaires (artères coronaires, mésentériques, ...) distribuent le sang en adaptant leur débit aux besoins des organes cibles. Dans ces artères, la résistance à l'écoulement est très élevée, ce qui induit une importante chute de pression, mais la vitesse d'écoulement du sang y reste élevée.

L'ensemble du réseau artériel systémique assure le transport du sang du ventricule gauche

vers capillaires tissulaires, ainsi que le réglage de la distribution sanguine via l'intervention de phénomènes actifs de vasomotricité. Ainsi, le débit ne varie pratiquement pas au niveau de certains organes, tels que le cerveau, alors que dans d'autres cas il peut être multiplié par 20 ou même 40 pour s'adapter à l'activité fonctionnelle (au niveau de la peau) ou métabolique de l'organe (cas du muscle).

En considérant le sang comme un liquide newtonien circulant avec une pression moyenne, le débit au niveau d'un organe se calcule selon le rapport : Pression efficace sur la Résistance à l'écoulement (Loi de Darcy). La pression efficace (pression artérielle moyenne et veineuse) ne variant pratiquement pas, le seul facteur de variation du débit au niveau d'un organe est donc la résistance à l'écoulement (R) du sang, or d'après la loi de Poiseuille : $R=8l\eta/\pi r^4$ (η : la viscosité ; l : la longueur du vaisseau ; r : rayon du vaisseau). Dans cette équation, seul « r » n'est pas constant.

C'est donc en faisant varier leur calibre que les vaisseaux contrôlent le débit au niveau des organes qu'ils irriguent. De plus, sachant que dans la loi de Poiseuille le rayon du vaisseau est élevé à la puissance 4, la moindre variation de ce dernier suffit à faire augmenter le débit significativement.

Ces changements actifs du calibre des vaisseaux constituent la vasomotricité. Les fibres musculaires lisses, qui constituent la paroi des artères, régissent leur calibre et peuvent répondre à des stimuli divers incluant des signaux d'ordre hémodynamique, tels que la pression et le flux. Ainsi, les variations de pression sanguine sont perçues par la paroi vasculaire comme des contraintes tensionnelles qui induisent à leur tour des variations du diamètre des artères.

Il en est de même pour le flux qui induit des forces de cisaillement à la surface des cellules endothéliales. Les forces de cisaillement provoquent ainsi une dilatation dite flux-dépendante. Dans les conditions physiologiques, ces deux mécanismes s'équilibrent permettant le maintien d'un tonus basal vasculaire. Ces réponses fonctionnelles à la pression et au flux

constituent la mécanotransduction.

1.2 - Structure de la paroi vasculaire

Les vaisseaux sanguins sont constitués de tuniques morphologiquement distinctes qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : **l'intima** avec la limitante élastique interne, **la média** avec la limitante élastique externe et **l'adventice** (Figure 1). Cette division est très nette dans les gros troncs artériels.

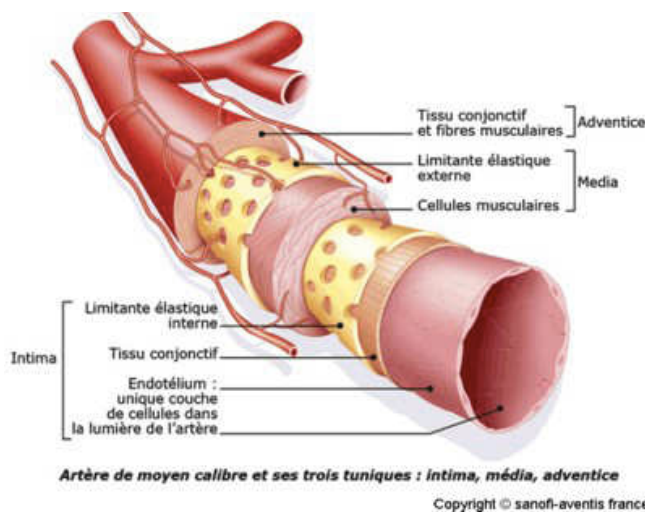


Figure 1 : Schéma de la structure pariétale d'une artère.

L'importance et la complexité de ces tuniques dépendent du vaisseau sanguin et peuvent être très grandes ou réduites à une simple monocouche. Ainsi les artères élastiques et les artères musculaires ont une structure différente.

1.2.1 - Les artères élastiques ou de compliance

Les artères élastiques sont essentiellement l'aorte, les carotides primitives, les artères pulmonaires, les artères iliaques, les artères sous-clavières et les artères brachio-céphaliques. Ces vaisseaux de gros calibre (de 1 à 2 cm de diamètre chez l'homme), intervenant dans le transport du sang, sont caractérisés par la présence dans leur paroi d'une importante charpente

élastique (environ 40% d'élastine).

L'intima est une couche vasculaire caractérisée par un endothélium constitué d'une monocouche de cellules plates ($2\mu\text{m}$), les cellules endothéliales, possédant un grand axe ($50\mu\text{m}$) parallèle à celui du vaisseau. Cette orientation est déterminée par les forces de cisaillement appliquées à leur surface par le flux sanguin¹. Ces cellules sont recouvertes d'un glycocalix (couche de mucopolysaccharides chargés négativement) dont le rôle essentiel est d'empêcher la thrombose sur la surface endothéliale et, plus récemment, on lui a découvert un rôle de mécanosenseur². Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées (*tight junctions*) et des jonctions communicantes (*gap junctions*) permettant les échanges d'ions, de métabolites et d'autres facteurs de régulation intercellulaire. La présence de filaments de myosine confère aux cellules endothéliales des propriétés contractiles. Cette contractilité permet un élargissement des espaces intercellulaires et par conséquent une augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, l'endothélium est un régulateur de la vasomotricité artérielle par la sécrétion de substances contractantes telles que l'endothéline ou le thromboxane A₂, ainsi que relaxantes comme la prostacycline ou le monoxyde d'azote agissant sur les cellules musculaires lisses (CMLs) de la média sous-jacente. L'endothélium repose sur une couche de tissu conjonctif constitué de microfibrilles de collagène (principalement de type IV) et de glycoprotéines : la lame basale. Elle sert de support lors de la régénération de l'endothélium. L'intima est délimitée par une limitante élastique interne, constituée de fibres élastiques transversales et ponctuée de fenestrations susceptibles de faciliter les communications entre les deux tuniques.

La média est une tunique formée de lames élastiques unies les unes aux autres par des fibres élastiques obliques et positionnées de manière concentrique. Leur nombre est très variable en fonction du diamètre de l'artère et peut atteindre par exemple 60 à 70 dans l'aorte chez

l'homme adulte. Entre les lames élastiques, se trouve un tissu conjonctif, constitué de fibres de collagène de type I. On y observe principalement des cellules musculaires, à disposition concentrique réunissant les lames élastiques les unes aux autres, des microfibrilles d'élastine et des glycosaminoglycanes de la substance fondamentale. Cet ensemble forme une unité lamellaire qui sera ensuite caractérisée plus précisément comme un « feuillet musculo-élastique ». Chaque feuillet correspond à un groupe de cellules enveloppées par une matrice, constitué d'une lame basale et d'un fin réseau de fibrille de collagène de type III et IV. Le tout est entouré d'un tapis de fibres élastiques dont l'orientation est identique à celle des grands axes des cellules. Cette organisation en structure lamellaire n'existe que dans les artères élastiques, les artères musculaires ne possédant pas cette architecture. Le nombre de feuillets est proportionnel au diamètre du vaisseau et augmente progressivement avec le poids et la taille chez les différentes espèces animales. La dernière lame élastique de la média constitue la limitante élastique externe.

L'adventice est une couche vasculaire peu développée dans les artères élastiques et formée d'un réseau de collagène prenant naissance à partir de la dernière lame élastique de la média. A ce niveau, on trouve des vaisseaux et des nerfs qui constituent respectivement les vasa vasorum et les nervi vasorum. Les vasa vasorum sont un réseau capillaire assurant la nutrition des cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau. Les apports en oxygène et en nutriments de l'intima et des deux tiers de la média se font directement par la diffusion des éléments du sang circulant. Les nervi vasorum, quant à eux, permettent une innervation des vaisseaux.

1.2.2 - Les artères musculaires ou de résistances

Ce type d'artères constitue une grande part de l'arbre vasculaire. On peut citer notamment les artères des membres (artères coronaires, spléniques, rénales, humérales), les artères

mésentériques et les artères cérébrales. Ces artères de petit calibre contiennent une grande proportion de cellules musculaires lisses par rapport aux artères élastiques, et jouent un rôle prépondérant dans la régulation systémique de la pression artérielle, pour une distribution optimale du sang au niveau de chaque tissu.

L'intima est assez semblable à celle des artères élastiques, elle comporte un endothélium qui repose sur une couche conjonctive sous-endothéliale. Elle est limitée à sa partie profonde par une limitante élastique interne, épaisse, réfringente, et bien visible.

La média est formée de fibres musculaires lisses, à disposition circulaire. Entre elles, s'intercalent quelques fibres de collagène ainsi qu'un fin réseau élastique se raccordant à la limitante élastique externe, formée de lamelles élastiques disposées en faisceaux irréguliers. L'adventice est formée de tissu conjonctif souvent bien développée au niveau des artères musculaires et se continue en dehors avec le tissu conjonctif environnant. Le réseau élastique se raccorde aux lamelles élastiques de la limitante élastique externe. Les éléments conjonctifs se groupent en de volumineux faisceaux de fibres de collagène souvent orientés longitudinalement.

L'adventice des artères de résistance contient de l'élastine, du collagène, des fibroblastes, des mastocytes, des macrophages, et parfois des cellules de Schwann associées à des terminaisons nerveuses. L'épaisseur de cette couche varie en fonction du lit vasculaire et de l'espèce. Elle est très développée au niveau des microvaisseaux. Le tissu conjonctif de l'adventice assure l'arrimage du vaisseau aux organes environnants.

2 – Mécanostransduction

2.1 – Généralités

Lorsque le coeur se contracte, il génère une énergie potentielle sous forme de pression

sanguine dans les artères. Celle-ci s'exprime en millimètres de mercure (mmHg). Elle dépend des résistances périphériques à l'écoulement sanguin généré par la contraction cardiaque. La pression sanguine résulte du produit du débit cardiaque par les résistances périphériques. Le débit cardiaque varie peu, ce sont les résistances périphériques qui modulent le niveau de pression sanguine. Les résistances périphériques dépendent du tonus vasomoteurs des CMLs qui va modifier les dimensions artériolaires et donc, selon la loi de Poiseuille, réguler le niveau de pression sanguine.

Les artères de conductance interviennent moins que les artères de résistance dans la régulation de la pression sanguine. Elles le font par le biais de la rigidité de leur paroi qui dépend, elle aussi, de la contraction des CMLs. Ainsi, la pression sanguine dépend essentiellement du tonus contractile des CMLs artérielles.

Les artères de petit diamètre (inférieur à 200 μ m), étant responsables d'une grande partie des résistances vasculaires périphériques, sont appelées artères de résistance. Ces artères possèdent un tonus vasoconstricteur permanent leur permettant de se contracter, de se dilater et donc de contrôler finement les flux sanguins locaux. Le tonus microvasculaire est contrôlé par le système nerveux, le système hormonal local et circulant, les besoins métaboliques des tissus environnants ainsi que par des facteurs mécaniques. Les principaux facteurs mécaniques influençant le tonus micro-vasculaire sont la pression et le flux. Lorsqu'une augmentation de pression est perçue par le vaisseau, celui-ci réagit sous la forme d'une contraction appelée le tonus myogénique (TM), alors qu'une augmentation du flux, entraînant une hausse des forces de cisaillement (shear stress), induira une vasodilatation plus communément appelée dilatation flux-dépendante. Ces deux mécanismes permettent une régulation rapide et efficace des débits sanguins locaux.

2.2 - Le tonus myogénique

2.2.1 - Définition

En 1902, W.M. Bayliss a mis en évidence pour la première fois l'existence d'une réponse vasculaire locale suite à une augmentation de la pression intraluminale, la réponse myogénique³. En 1949, Folkow a montré que ce tonus vasculaire est un mécanisme non neuronal puisqu'il persiste au niveau des vaisseaux dénervés⁴. Les acteurs de cette réponse myogénique sont les CMLs, et cela indépendamment des influences neuronales, métaboliques, ou hormonales.

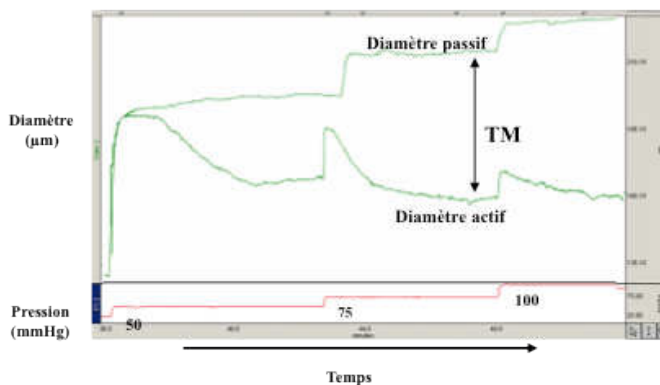


Figure 2 : Enregistrements typiques de la réponse d'un vaisseau méésentérique de résistance à une augmentation de pression. Pour des pressions >50 mmHg, les variations de pression successives entraînent une baisse de diamètre artériel (flux nul). Par exemple, le passage d'une pression de 50 mmHg à 75 mmHg, diminue le diamètre de 12 micromètres. Pour finir on soumet le même vaisseau aux mêmes paliers de pression, mais en présence d'une solution physiologique sans calcium + EGTA + SNP + papavérine, le diamètre ainsi mesuré est le "diamètre passif". Le tonus myogénique (TM) du vaisseau est quantifié comme étant la différence entre le diamètre actif et le diamètre passif. Les 2 tracés ont été obtenus en séquence et superposés ensuite.

Une relation inverse existe entre le diamètre des vaisseaux et l'intensité du TM. Plus les vaisseaux sont petits et plus le TM est élevé⁵, bien qu'il puisse y avoir une exception dans le cas des vaisseaux cérébraux⁶. Le développement d'un TM s'observe surtout dans des vaisseaux d'un diamètre inférieur à 300µm. In vitro, le TM peut être maintenu pendant plusieurs heures car les conditions de pression et de flux sont le plus souvent statiques, ce qui entraîne une désensibilisation. In vivo, en revanche, les variations de pression et de flux sont permanentes et les réponses myogéniques constamment stimulées.

Le TM se développe dans les secondes qui suivent l'augmentation de la pression intravasculaire (Figure 2). La réponse myogénique se caractérise par une distension initiale, passive, suivie de deux phases de contraction, l'une transitoire et l'autre soutenue. Ainsi dans le cas d'un changement de posture par exemple, où la pression artérielle varie, la réponse myogénique contribue au maintien de la pression hydrostatique au même titre que le tonus sympathique et le baroreflexe.

Au niveau tissulaire, les variations brusques de la pression artérielle entraînent des variations immédiates du débit sanguin. Or il existe un mécanisme d'autorégulation du débit sanguin permettant de maintenir un débit sanguin stable en dépit des importants changements de la pression artérielle. Cette régulation peut être métabolique et myogénique. Le TM permet ainsi une protection des capillaires contre les augmentations excessives de la pression sanguine. Autrement dit, si la pression dans les petites artères et artérioles s'élève de trop, ces vaisseaux permettront d'amortir cette augmentation de pression et empêcheront donc une transmission de la pression élevée aux capillaires. Cela permet d'éviter une éventuelle rupture de ces derniers car leur paroi, constituée exclusivement d'intima et dépourvue de cellules musculaires, ne leur permet pas de résister à des augmentations de pression.

2.2.2 - Le Tonus Myogénique et pathologies

Dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires ainsi que le vieillissement, la régulation du TM se voit modifiée entraînant ainsi une hyper ou une hypocontractilité en réponse à la pression. Par exemple, durant des chocs hémorragiques, une augmentation de l'expression des canaux BK_{Ca} et une hypersensibilité de ces canaux aux pics calciques provoquent une augmentation des influx potassiques, conduisant à une vasodilatation et une hypotension⁷. Alors que, dans le cas d'hémorragies sous-arachnoïdiennes, la diminution des flux sanguins cérébraux est induite par une augmentation du TM. Cette modification résulte d'une diminution de l'ouverture des canaux K_{Ca} sous l'effet d'une augmentation de la production de

20-HETE⁸, ainsi qu'à une sur-stimulation de Rho-kinase induisant une augmentation de la sensibilité au calcium de l'appareil contractile⁹. Dans des pathologies telles que le diabète¹⁰ et l'hypertension¹¹, les artères cérébrales possèdent un TM plus élevé. Une élévation du TM est aussi visible lors d'une perte d'estrogènes chez des rates ovariectomisées¹². Dans une pathologie telle que l'hypoxie pulmonaire, le TM est aussi plus élevé que la normale¹³.

Le TM apparaît donc (avec la dilatation en réponse au flux) comme un élément primordial dans l'adaptation des artères de résistance à une variation des paramètres hémodynamiques (flux et pression). Il permet le maintien d'une perfusion fine des différents organes et tissus du corps. Cependant, lorsque ces paramètres hémodynamiques sont modifiés de façon chronique, et que les capacités vasoactives des petits vaisseaux sont impuissantes à rétablir un équilibre, un autre mécanisme est mis en place : le remodelage vasculaire.

2.4 – Dilatation Flux Dépendante

Le flux sanguin exerce une contrainte tangentielle importante sur les cellules endothéliales, ce qui module la fonction et la structure vasculaires. Les principales fonctions de l'endothélium vasculaire sont d'empêcher la coagulation, de contrôler le diamètre du vaisseau et de réguler la perméabilité vasculaire. Les facteurs hémodynamiques influencent la biologie de l'endothélium par une action directe du flux sanguin (physique) ou par une action indirecte lors de modifications de la concentration locale de facteurs chimiques et neurohumoraux. Le flux sanguin induit à la surface des cellules endothéliales une contrainte de cisaillement, τ , agissant dans la direction longitudinale à l'interface sang-endothélium : $\tau = \nu \cdot \frac{dv}{dr}$ où ν est la viscosité sanguine (poise), v est la vitesse moyenne de l'écoulement sanguin (cm.s⁻¹), r le rayon vasculaire (cm) et dv/dr représente le taux de cisaillement. Dans le cas d'un écoulement laminaire : $\tau = \frac{4 \cdot \nu \cdot Q}{\pi \cdot r^3}$ où Q est le débit sanguin (cm³/min). On peut remarquer qu'une faible réduction du rayon du vaisseau entraîne une augmentation très importante des

contraintes de cisaillement, et ceci à débit volumique constant. Cette force de cisaillement, qui s'exerce sur l'endothélium, tend à déplacer les cellules endothéliales dans la direction de l'écoulement sanguin¹⁴. L'augmentation des contraintes de cisaillement entraîne une dilatation du vaisseau, appelée "dilatation-flux-dépendante" (DFD).

Elle est liée à la libération de facteurs endothéliaux "EDRF" qui engendrent une relaxation du muscle lisse; ce qui a pour résultat une augmentation du diamètre du vaisseau¹⁵. Les forces de cisaillement agissant sur la cellule endothéliale varient en fonction de la géométrie de la cellule endothéliale. Ainsi dans certaines configurations morphologiques, certaines cellules sont plus exposées que leurs voisines. Sur des cultures cellulaires, l'une des principales conséquences de l'alignement des cellules endothéliales par le flux est une augmentation de la résistance de la surface des cellules à la déformation¹⁶. De plus, durant une exposition aux forces de cisaillement, la position des organelles cellulaires peut aussi changer. Par exemple, sur des cellules endothéliales en culture, le flux engendre un réarrangement qui détermine la distribution spatio-temporel des éléments de la cellule comme l'appareil de Golgi et l'organisation du centre des microtubules^{17, 18}. Un tel réarrangement n'existe toutefois pas in situ, les cellules endothéliales vasculaires n'étant jamais en condition de « culture » avec une absence totale de flux. En revanche, la plupart des travaux menés à ce jour sur les effets biologiques du cisaillement l'ont été sur des cellules endothéliales en culture, dans des conditions de flux passant le plus souvent de zéro à un débit laminaire déterminé. Ces études, sur des cultures cellulaires, ont permis de bien comprendre des mécanismes biochimiques complexes, avant de pouvoir en venir à des études in vitro sur des vaisseaux entiers ou d'étudier des modèles in vivo.

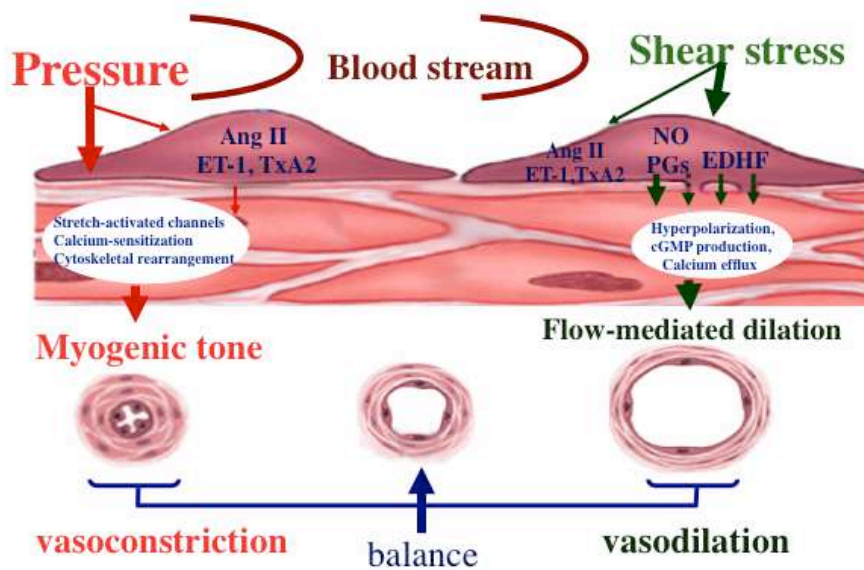


Figure 3 : Schéma de l'équilibre entre le tonus myogénique et la dilatation flux dépendante

3 - Le remodelage vasculaire

3.1 - Généralités

Le remodelage vasculaire est un processus présent durant la croissance et le développement des organes. Les cellules artérielles se différencient et s'associent pour former des vaisseaux de longueur, de diamètre, de structure et de composition précis en relation avec leur localisation et leur fonction. A l'âge adulte, le remodelage vasculaire correspond à toute modification durable de la taille et de la composition des vaisseaux leur permettant de s'adapter et/ou d'être réparés. Le remodelage physiologique est un mécanisme adaptatif sujet à un contrôle très précis répondant aux différents changements, à long terme, des conditions hémodynamiques. Cela implique la production de médiateurs qui influencent la structure et la fonction du vaisseau. Selon le calibre des artères, le type, l'intensité et la durée de la contrainte exercée, le remodelage artériel qui en résulte est différent. L'adaptation structurale du vaisseau se traduit par une modification du diamètre interne et/ou de l'épaisseur de paroi (Figure 4). Une diminution ou une augmentation du diamètre artériel reflète un remodelage

respectivement dit constrictif ou expansif. Selon l'épaisseur de la paroi, le remodelage est défini comme hypotrophique (diminution), eutrophique (maintien) ou hypertrophique (augmentation). Selon le paramètre hémodynamique l'engendrant, le remodelage vasculaire a été classé en deux parties : le remodelage pression-dépendant et le remodelage débit-dépendant.

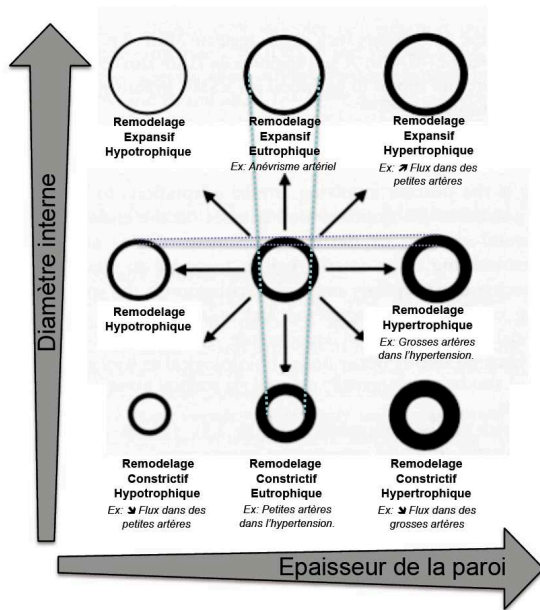


Figure 4 : Schéma simplifié du remodelage artériel en réponse à des modifications chroniques de pression ou de flux. (d'après Mulvany et al.¹⁹).

3.2 - Le remodelage dépendant de la pression

Les artères répondent à une augmentation chronique de pression sanguine par un remodelage permettant de supporter le changement de tension à long terme. Au niveau des cellules vasculaires, de nombreux récepteurs sont stimulés par des stimuli mécaniques engendrant diverses voies de signalisation, comme la cascade de MAPKinases et la voie TGF- α /NF- κ B. Cette dernière voie semble jouer un rôle important dans le processus de transformation, induit par une pression élevée, comme l'activation de nombreuses protéases extracellulaires responsables de la réorganisation de la matrice extracellulaire.

Ce remodelage est différent en fonction du type d'artère concerné. Dans le cas des artères de

conductance, une augmentation de pression induit une hypertrophie pariétale, alors qu'au niveau des artérioles elle induit un rétrécissement luminal. La vitesse de mise en place du remodelage varie en fonction du vaisseau. Les gros troncs possédant peu de tonus vasomoteur, leur capacité à répondre rapidement à une augmentation de pression est donc limitée à leurs propriétés de rigidité. En revanche, les artères de résistance et artérioles recourent en premier lieu à la réponse myogénique afin de normaliser le stress circonférentiel. Si le stimulus est maintenu et que tout ça ne suffit pas, le remodelage vasculaire s'amorce. Cette différence de propriété des vaisseaux explique que le remodelage survient plus précocement dans les artères de conductance que dans les petites artères.

3.3 - Le remodelage dépendant du débit

Les vaisseaux sanguins réagissent à des variations de débit par du remodelage et/ou de la croissance, leur permettant ainsi de maintenir un shear stress constant²⁰. Le remodelage artériel débit- ou flux-dépendant est impliqué dans les processus physiologiques, incluant la croissance des vaisseaux sanguins durant le développement²¹, l'exercice physique²² et la grossesse²³.

Deux mécanismes différents interviennent dans ce type de remodelage : l'angiogenèse et l'artériogénèse. L'angiogénèse est un mécanisme d'expansion du réseau vasculaire via le développement de nouveaux capillaires sur la base de capillaires préexistants, l'artériogénèse consiste en l'élargissement et la mise en fonction d'artérioles collatérales déjà existantes. Ce mécanisme est principalement déclenché par une augmentation du débit sanguin alors que le principal élément déclencheur de l'angiogénèse est l'ischémie.

Cette capacité d'adaptation vasculaire tente à maintenir une perfusion normale des organes lors de la modification du flux ou de la pression. Une perte de régulation de ce processus adaptatif résulte du développement des principales maladies cardiovasculaires, telles que l'hypertension artérielle, le diabète, les maladies ischémiques et les tumeurs^{24, 25}.

4 - Le vieillissement vasculaire

Une révolution démographique est en cours à l'échelle mondiale. A la classique pyramide des âges avec une large base de jeunes et une pointe effilée de personnes âgées, vont succéder, dans les prochaines années, de véritables "tours" des classes d'âge sensiblement égales en nombre et dont la base est parfois plus étroite que le sommet. Il y a aujourd'hui sur Terre 600 millions de personnes âgées de plus de 60 ans. Cette population s'accroît de 2 % chaque année et atteindra 2 milliards en 2050 selon les estimations de l'ONU. Ceci est dû à la baisse de la fécondité et de la mortalité, et à l'allongement de l'espérance de vie. Le vieillissement de la population est encore perçu à tort comme un phénomène propre aux pays industrialisés. Or, en 2050, 80 % des plus de 60 ans vivront dans les pays en développement. Ainsi, le vieillissement et son corollaire, la forte prévalence des pathologies cardiovasculaires, sont aujourd'hui une préoccupation sanitaire mondiale. A mesure que la population vieillit, le risque de pathologies cardiovasculaires augmente. Le vieillissement vasculaire contribue largement à l'apparition de l'hypertension artérielle, de l'athérosclérose, de l'insuffisance cardiaque ou rénale et de troubles cérébrovasculaires²⁶. L'essentiel du risque lié à l'âge provient des modifications de structure et de fonction des artères. Le vieillissement vasculaire est caractérisé par un épaississement et une rigidification de la paroi^{27, 28}. Ces changements structuraux sont associés à une dysfonction endothéliale^{29, 30} menant à une diminution de production des agents vasodilatateurs³¹ et une altération de la vasodilatation débit-dépendante³². Ces dysfonctionnements induisent une augmentation de la résistance vasculaire³³. Plusieurs études ont rapporté que la production de NO et l'expression de eNOS déclinait avec l'âge^{34, 35} alors que d'autres travaux ont montré que l'expression de eNOS augmentait afin de compenser la baisse de production de NO^{36, 37}.

Le stress oxydant représente un événement-clé du vieillissement vasculaire³⁸. En effet, il contribue à la dysfonction endothéliale³⁹ et la perte d'élasticité artérielle. Il a été rapporté que

la formation de O₂ était augmentée lors du vieillissement^{34, 40}. Ce radical, par association avec le NO, forme du peroxydite³⁷ qui induit l'oxydation de la tétrahydrobioptérine, le découplage de eNOS³⁴, et finalement l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante. Il a également été suggéré que les systèmes antioxydants, tels que la superoxyde dismutase, étaient altérés^{37, 41}.

5 – Chirurgie Cardiaque, Circulation Extra-Corporelle, Pulsatilité

5.1 - Généralités

La circulation extracorporelle (CEC) permet d'opérer sur un champ immobile et exsangue en suppléant temporairement les fonctions cardiaque et ventilatoire. Cette machine cœur-poumon doit donc en théorie reproduire autant que possible la physiologie et l'hémodynamique du patient. Mais depuis que la CEC existe, la pulsatilité du flux délivrée par la pompe reste une question récurrente et non résolue. L'impact de la pulsatilité sur la microcirculation avait fait l'objet de publications avant même la première application clinique de la CEC par Gibbon en 1953⁴²⁻⁴⁴. Pourtant, même si certaines pompes de CEC peuvent générer un flux pulsé, rares sont les équipes qui en routine utilisent des CEC pulsées pour leurs patients. L'intérêt de cette pulsatilité reste largement débattu, notamment à l'échelon microcirculatoire pour lequel la notion de flux pulsé physiologique est encore controversée. De nombreuses raisons permettent d'expliquer cette absence de consensus, en particulier le manque de connaissance sur la physiologie du flux pulsé et de l'énergie pulsatile délivrée par le cœur, le manque de définition consensuelle de la pulsatilité en CEC, le manque de pompes adéquates, et le succès des pompes conventionnelles. De plus, les progrès constants de la chirurgie cardiaque et de la CEC n'incitent pas les équipes à rediscuter incessamment des techniques qui leur donnent satisfaction. Cependant, l'analyse des résultats de la base de données de la *Society of Thoracic*

Surgeons (STS) montre que près de 20% des patients à faible risque opérés de pontages aorto-coronariens développent en postopératoire une complication liée au syndrome post-CEC⁴⁵, lui-même caractérisé par l'existence d'un syndrome inflammatoire généralisé associé à de profonds désordres hématologiques retentissant sur la microcirculation.

5.2 - Flux pulsé

5.2.1. Aspects hémodynamiques

La notion qu'une courbe de pression, pulsée ou non, suffit à évaluer précisément le niveau de pulsatilité d'une CEC est un mythe bien ancré dans les mentalités⁴⁶. En fait la génération d'un flux pulsé dépend plus du gradient d'énergie que du gradient de pression⁴⁷⁻⁵⁰. La formule de la pression énergétique (*EPP energy equivalent pressure*) de Shepard⁴⁷ est l'outil de référence pour quantifier la courbe pression-débit parce qu'elle prend en compte à la fois la courbe de pression et la courbe du flux fourni par la pompe. Elle représente le ratio entre l'aire sous la courbe d'énergie hémodynamique ($\int p dt$) et l'aire sous la courbe du flux délivré par la pompe ($\int f dt$) durant chaque cycle pulsé : $EEp = (\int p dt) / (\int f dt)$, où f représente le flux délivré par la pompe, p la pression artérielle et dt signifie que l'intégrale est calculée par rapport au temps t . Cette EEP est exprimée en mmHg. Un flux qui produit une pression pulsée de plus de 15 à 20 mmHg est considéré pulsatile tandis qu'un flux qui génère une pression pulsée de moins de 15 mmHg est considéré non pulsatile⁵⁰. Il est possible de comparer l'EEP avec la pression artérielle moyenne, la différence entre ces deux variables représentant le surplus d'énergie hémodynamique⁵¹. Cette composante pulsatile est responsable de la transmission latérale de l'énergie dans les tissus^{52, 53}. Le manque d'outil aisément disponible pour mesurer cette EEP en salle d'opération est certainement un frein à la quantification de la pulsatilité d'une CEC. D'autres méthodes ont été proposées comme l'index de puissance pulsatile⁵⁴ ou l'index de pulsatilité⁵⁵, ce dernier étant calculé à partir de mesures en Doppler transcrânien des vitesses sanguines au niveau de l'artère cérébrale moyenne. Le surplus d'énergie hémodynamique

n'existe que si un minimum de pulsatilité est contenu dans la pression ou le flux. À l'extrême, ce surplus d'énergie hémodynamique n'existe pas avec un flux totalement non pulsatile comme c'est le cas avec les pompes centrifuges⁵⁶. Ainsi, il a été très récemment démontré chez des patients bénéficiant d'assistance circulatoire, qu'un système pulsatile (Thoratec HeartMate XVE ou IVAD) restaurait un surplus d'énergie hémodynamique tandis qu'un système non pulsatile (Thoratec heartMate II ou MicroMed DeBakey) était associé à un effondrement (-95 %) du surplus d'énergie hémodynamique physiologique⁵⁷. La particularité cependant de l'assistance chronique par rapport à la CEC (assistance aigue de courte durée) est de laisser persister une activité de battement cardiaque au-delà de l'opération, même en l'absence d'éjection. Ce point important limite probablement l'extrapolation des connaissances issues de la CEC à l'assistance circulatoire prolongée.

5.2.2. Flux pulsés en CEC

Les pompes à galets permettent de réaliser un flux pulsé après réglages de la vitesse de rotation du rotor (variation possible du pourcentage du flux moyen en mode pulsé, de la durée de pulsation et de la fréquence de pulsatilité)⁵⁸. Cependant, comparativement aux pompes centrifuges totalement non pulsatiles, les pompes à galets en mode non pulsé sont malgré tout capables de fournir une pression pulsée de 10 à 15 mmHg⁵⁶ (figure 5). La notion qu'une pompe à galet génère en soi un flux pulsé a été rapportée il y a maintenant 20 ans⁵⁹.

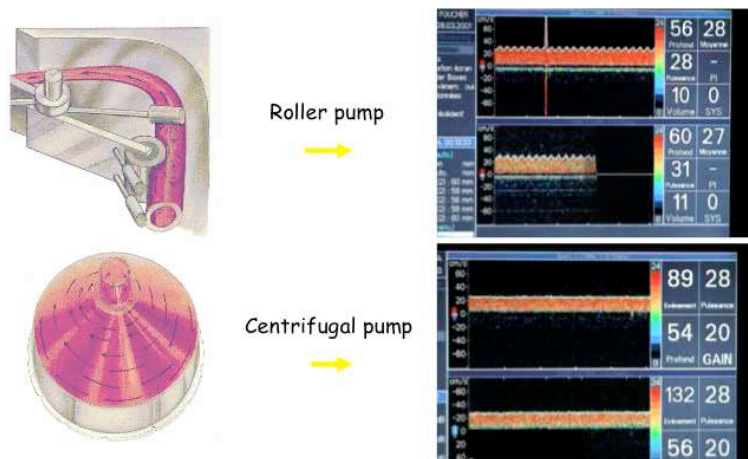


Figure 5 : Capture d'écran peropératoire montrant à l'oxymètre de pouls, l'onde pulsatile engendrée par l'utilisation d'une pompe à galets lors de la CEC (figure 5a), ou un flux laminaire lors de l'utilisation d'une pompe centrifuge (figure 5b).

Ceci n'est pas sans importance et doit être pris en considération à la lecture des différentes études qui sont publiées et qui le plus souvent postulent a priori qu'une pompe à galets est non pulsatile. En outre, il a été démontré que certaines pompes à galets a priori pulsatiles ne génèrent pas plus d'énergie hémodynamique que certaines pompes à galets non pulsatiles^{60, 61}, ce qui complique l'interprétation des résultats et la discussion. D'où l'importance de la quantification précise des courbes de pression-débit qui fait souvent défaut dans cette littérature. La géométrie des oxygénateurs et des canules n'est pas non plus sans impact sur l'amortissement de la pulsativité⁶².

5.2.3. Bénéfices cliniques de la CEC pulsée

De nombreuses et parfois anciennes études ont cherché à montrer les bénéfices cliniques de la CEC pulsée. L'utilisation d'une perfusion pulsatile a été associée à une meilleure régulation de la production en angiotensine, aldostérone, catécholamines⁶³⁻⁶⁵ et du métabolisme hormonal thyroïdien⁶⁶. Comparativement à une CEC pulsée qui maintient un flux lymphatique, une CEC non pulsée a pour conséquence une rétention hydrique, malgré une volémie normale, expliquant la formation d'œdèmes périphérique et pulmonaire altérant les échanges gazeux⁶⁷. Mais ces résultats sont controversés et ces effets bénéfiques n'ont pas été

retrouvés par tous les investigateurs⁶⁸⁻⁷². Néanmoins, peu d'études randomisées ont été réalisées et leur analyse, ainsi que celles des principales cohortes rétrospectives, a montré leurs faiblesses. Dans une revue de la littérature publiée par Alghamdi⁷³, le seul essai contrôlé et randomisé jugé de bonne qualité a permis de conclure qu'une perfusion pulsatile durant la CEC était associée à une réduction des infarctus myocardiques, de la mortalité et des complications majeures⁷⁴. Egalement en utilisant des critères de jugement robustes, Taylor a montré que la composante pulsatile de la CEC réduisait la mortalité et le recours à la contre pulsion intra-aortique ou aux inotropes⁷⁵. Mais même si la perfusion pulsée permet de minimiser la morbidité en chirurgie cardiaque, il ne faut certainement pas escompter une disparition complète des complications postopératoires par le simple fait de cette pulsatilité. De façon intéressante, la durée de la pulsatilité semble être un paramètre important avec un bénéfice qui semble plus évident au-delà de 45 minutes de clampage aortique⁴⁶. La durée de clampage aortique semble d'ailleurs être un paramètre plus pertinent que la durée de CEC elle-même vis-à-vis de la réaction inflammatoire⁷⁶.

5.3. Aspects microcirculatoires

5.3.1. Particularités anatomo-physiologiques de la microcirculation

Ce réseau est un élément essentiel de la régulation des pressions et des résistances vasculaires. La persistance de la pulsatilité de l'onde de pression dans la microcirculation est controversée ce qui peut s'expliquer par les difficultés de mesure expérimentale. Les vitesses d'écoulement du sang dans ce réseau sont très hétérogènes, en particulier du fait des modifications rhéologiques qui consistent en une déformation des érythrocytes, plus gros que les capillaires, et une accumulation co-axiale au sein d'un manchon plasmatique à la périphérie du capillaire. De plus, la viscosité augmente lorsque le diamètre du capillaire diminue. Cette viscosité est en partie liée à la présence des érythrocytes, très nombreux, mais aussi à celle des globules blancs, beaucoup moins nombreux, dont la viscosité interne est cependant beaucoup plus

élevée. Ajoutons que lors des processus inflammatoires déclenchés par l'intervention chirurgicale et la CEC, ces leucocytes s'associent et s'agrègent entre eux pour accentuer le risque d'hypoperfusion tissulaire.

5.3.2. Preuves de la pulsatilité dans la microcirculation

La disparition de la pulsatilité peut donc logiquement faire craindre un collapsus ou une sédimentation capillaire. Un shunt microcirculatoire interrompant l'apport nutritionnel cellulaire et un déplacement vers un métabolisme anaérobie en sont les conséquences redoutées. La microscopie intra vitale a apporté des preuves directes de l'effet de la pulsatilité sur la microcirculation. (figure 6)

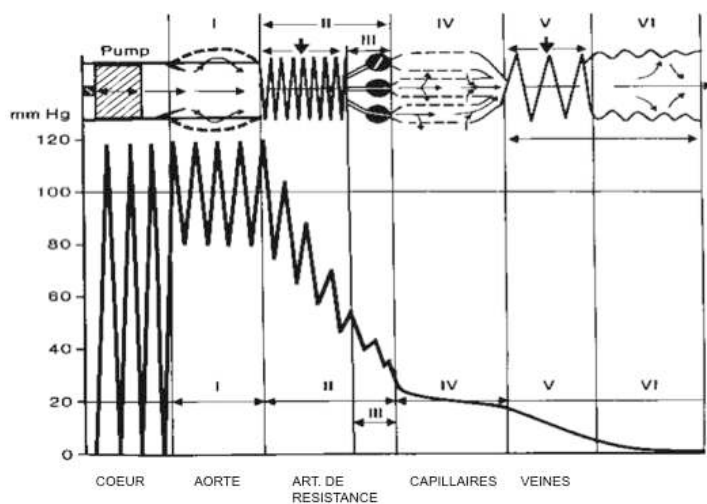


Figure 6 : Régime de pulsatilité en fonction du territoire vasculaire

En 1994, Lee a pu ainsi observer que la pulsatilité existe dans le lit capillaire de muscle squelettique de chèvre et que l'utilisation d'une perfusion non pulsatile de façon prolongée conduit à une détérioration de la microcirculation pouvant compromettre la fonction des organes⁷⁷. Konishi⁷⁸ et Baba^{79, 80} ont fait des observations similaires sur les microcirculations pulmonaire et de la conjonctive bulbaire. Dobsak a étudié différents niveaux de pulsatilité sur la perfusion microcirculatoire de conjonctive bulbaire de chèvre⁸¹ ; un flux continu a été associé à une vasoconstriction globale des veinules mais la morphologie de ces vaisseaux n'a

pas été affectée par une pulsatilité partielle comparativement à une pulsatilité complète. Le surplus énergétique ainsi créé par la perfusion pulsatile, même partiellement, force le flux sanguin dans la microcirculation et rend les échanges plasmatiques et cellulaires possibles. L'utilisation d'une perfusion pulsatile a été associée à une amélioration des flux microcirculatoires, de la perfusion myocardique, de l'oxygénation et des indices de contractilité⁷³. D'autres preuves indirectes du bénéfice d'une perfusion pulsatile ont été rapportées grâce à des mesures de perfusion tissulaire par laser Doppler par de nombreux investigateurs⁸²⁻⁸⁸. Ces mesures effectuées le plus souvent dans les territoires splanchniques ont toutes été favorables à l'utilisation d'une perfusion pulsatile. Cette technique de mesure indirecte de la perfusion digestive a permis également de démontrer la diminution significative de la perfusion tissulaire de la muqueuse gastrique au cours de CEC hypothermique non pulsée chez des patients opérés de pontages aorto-coronariens⁸⁹.

5.3.3. Syndrome inflammatoire, dommage endothélial et cellulaire : impact de la pulsatilité

Au-delà de ces preuves directes ou indirectes de la qualité de la perfusion dans la microcirculation, l'intérêt d'une perfusion pulsée peut s'apprécier par de nombreux autres marqueurs témoignant du métabolisme ou de la souffrance cellulaire. Shepard a utilisé la consommation d'oxygène comme indicateur de la perfusion tissulaire au cours de CEC expérimentales pulsées et non pulsées⁹⁰ ; une extraction plus importante d'oxygène et de lactate et moins de variations du pH ont été observées au cours des CEC pulsées. De nombreux marqueurs inflammatoires ont été également mesurés. Watarida a constaté qu'une CEC pulsée chez des patients opérés de pontages aorto-coronariens atténuait significativement la production d'endotoxine circulante comparativement aux patients ne bénéficiant pas d'une CEC pulsée⁷⁶. Cette augmentation a été notée durant le clampage aortique ce qui suggère que pendant cette période de non activité cardiaque native, la présence

d'une pulsatilité résiduelle fournie par la pompe de CEC dans l'appareil circulatoire a une importance clinique significative. Orime et Sezai ont comparé la CEC pulsée et non pulsée en terme de production de cytokines, catécholamines, endothéline et de fonction rénale et pulmonaire chez des patients admis pour revascularisation coronarienne chirurgicale^{58,91}. Les résultats ont démontré que la CEC pulsée réduit la production de catécholamines et la réponse inflammatoire (interleukine IL-8) pendant et après la CEC sans par ailleurs observer de préjudice significatif en terme d'hémolyse. Le dommage endothélial a été évalué par la production d'endothéline (ET-1) qui est un peptide notoirement vasoconstricteur largement présent dans tout l'organisme et dont la surproduction par les cellules endothéliales sous l'influence des cytokines, endotoxines, shear stress et hypoxie peut endommager la microcirculation⁹². La perfusion pulsatile a permis de limiter l'élévation d'ET-1 constatée au décours de l'intervention et en rapport avec la production d'IL-8. L'index respiratoire de ces patients a également été amélioré⁹¹ témoignant d'échanges gazeux alvéolaires plus performants. Cet effet bénéfique est probablement à rapporter à la moindre élévation d'IL-8 connue pour être impliqué dans la séquestration et l'activation des neutrophiles pulmonaires, avec comme conséquence clinique le syndrome de détresse respiratoire aiguë pour forme ultime de dysfonction pulmonaire⁹³. D'autres auteurs ont corrélé la préservation de paramètres fonctionnels pulmonaires (PaO₂/FiO₂) à la réduction de l'activation leucocytaire (élastase) grâce à l'utilisation d'une perfusion pulsatile en CEC⁹⁴. Il est intéressant de constater que deux études comparatives de la réponse inflammatoire après CEC avec pompes centrifuges ou à galets ont montré des résultats similaires en terme d'élévation d'élastase et cytokines avec les pompes centrifuges^{95, 96}, ce qui suggère que le « fond » de pulsatilité observée avec les pompes à galets^{56, 59} a possiblement une importance physiologique⁹⁴. L'impact endothélial de la composante pulsatile du flux, responsable de la transmission latérale de l'énergie dans les tissus, est moins connu. Néanmoins, les cellules endothéliales sont sensibles aux variations de forces mécaniques, tel le *shear stress* (contraintes de

cisaillement). Ces cellules sont, *in vivo*, normalement exposées et présumées adaptées à un niveau normal de *shear stress* de l'ordre de 5 à 20 dyn/cm². Des études évaluant la réponse de cellules endothéliales soumises à une chute brutale du *shear stress* ont mis en évidence des réactions de dépolarisation membranaire, d'augmentation du Ca²⁺ intra cellulaire et de radicaux libres oxygénés⁹⁷. L'élévation du Ca²⁺ intracellulaire déclenche la libération de médiateurs vasoactifs et de médiateurs impliqués dans l'hémostase et la thromolyse⁹⁸. Expérimentalement, Champsaur et Nakano ont rapporté que la pulsatilité, à la fois par sa fréquence et par son amplitude, stimule la production et la libération d'oxide nitrique (NO)⁹⁹.

100

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail d'abord été dans un premier temps de décrire les effets du vieillissement sur le remodelage dépendant du débit dans les artères de résistance sur un modèle in-vivo de rat âgé en testant également le bénéfice potentiel d'un traitement chronique par Hydralazine un vasodilatateur non spécifique. En effet, les patients nécessitant une chirurgie cardiaque sont pour la grande majorité des patients âgés avec une moyenne d'âge d'environ 70 ans. Il s'agit donc d'une population dont la microcirculation est souvent le siège d'un remodelage d'autant plus qu'ils présentent souvent d'autres pathologies associées comme le diabète et/ou l'hypertension artérielle.

Ensuite nous avons cherché à construire un modèle expérimental de pulsatilité in vitro le plus proche possible des conditions in-vivo afin de soumettre des artères mésentériques de rat à différents régimes de pression et débit avec ou sans pulsatilité, dans l'hypothèse que la mécanotransduction, à savoir le tonus myogénique et la dilatation flux dépendante sont susceptibles d'être modifiées par les changements de pulsatilité.

Nous avons également cherché à savoir l'implication de marqueurs inflammatoire et des radicaux oxygénés dans les changements du tonus vasculaire associés à la réduction de pulsatilité.

RESULTATS

ARTICLE 1

Alteration in flow (shear stress)-induced remodelling in rat resistance arteries with aging: improvement by a treatment with hydralazine.

Cardiovasc Res. 2008 Feb 1;77(3):600-8. Epub 2007 Oct 30.

Odile Dumont^{1,2,3}, **Frederic Pinaud**^{1,2,3,4,5}, Anne-Laure Guihot^{1,2,3}, Christophe Baufreton^{4,5},
Laurent Loufrani^{1,2,3}, and Daniel Henrion^{1,2,3}

1 – Faculté de Médecine, CNRS UMR 6214, Angers 49045, France;

2 – INSERM U771, Angers, France;

3 – University of Angers, Angers, France;

4 – UPRES-EA 3860, Angers, France; and

5 – CHU d'Angers, Angers, France

RESUME

Le lien entre le vieillissement et les maladies vasculaires restent non élucidées, particulièrement dans les artères de résistances. La diminution des capacités vasodilatatrices de l'endothélium est généralement décrite avec le vieillissement. Nous avons émis l'hypothèse que le remodelage artériolaire en réponse à un accroissement du flux sanguin pouvait être altéré avec le vieillissement. Ayant montré précédemment l'effet d'un traitement vasodilatateur par hydralazine sur le remodelage artériolaire, nous avons testé la capacité de l'hydralazine à restituer le remodelage dans le vieillissement.

Des artères de résistances mésentériques de rat (350 μm), provenant de rat âgés de 3 mois et 24 mois, ont été exposées à un haut flux (HF) et flux normal (NF) pendant 2 semaines par ligatures séquentielles des artères de seconds ordres, in vivo. Dans les artères HF, le diamètre a augmenté de 21% et la pression intraluminale était de 100 mmHg avec une augmentation de la production de radicaux oxygénés (ROS) chez les jeunes rats. Chez les vieux rats il n'y avait pas d'augmentation du diamètre ni des ROS. L'hydralazine a restauré le remodelage induit par le HF chez les vieux rats associés à une augmentation de la production de ROS et diminution de l'expression de la superoxide dismutase (SOD). Le TEMPOL (SOD-mimetic 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidinoxyl) a empêché les effets de l'hydralazine sur le diamètre artériolaire. Chez les vieux rats, l'hydralazine a augmenté le diamètre artériolaire dans les artéioles HF sans augmenter l'expression de eNOS. De plus, l'hydralazine a aussi restituée de remodelage HF chez les souris eNOS knockout.

Le remodelage des artères de résistances ne se produit pas dans le vieillissement mais peut être restauré par l'hydralazine via un mécanisme ROS dépendant. Ces résultats peuvent avoir des conséquences physiopathologiques importantes dans des situations nécessitant un remodelage flux-dépendant comme les maladies ischémiques et métaboliques plus fréquentes avec le vieillissement.



Alteration in flow (shear stress)-induced remodelling in rat resistance arteries with aging: improvement by a treatment with hydralazine

Odile Dumont^{1,2,3}, Frederic Pinaud^{1,2,3,4,5}, Anne-Laure Guihot^{1,2,3}, Christophe Baufreton^{4,5}, Laurent Loufrani^{1,2,3}, and Daniel Henrion^{1,2,3*}

¹Faculte de Medecine, CNRS UMR 6214, Angers 49045, France; ²INSERM U771, Angers, France; ³University of Angers, Angers, France; ⁴UPRES-EA 3860, Angers, France; and ⁵CHU d'Angers, Angers, France

Received 5 July 2007; revised 23 October 2007; accepted 24 October 2007

Time for primary review: 23 days

KEYWORDS

Microcirculation;
Remodelling;
Blood flow;
Aging;
Nitric oxide;
Reactive oxygen species

Aims The link between aging and vascular diseases remains unclear, especially in resistance arteries. As a decreased vasodilator capacity of the endothelium is usually described in aging, we hypothesized that arteriolar remodelling in response to a chronic increase in blood flow might be altered. In addition, we tested the capacity of a vasodilator treatment with hydralazine to restore remodelling, as we have previously shown that hydralazine has a potent effect on the process.

Methods and results Mesenteric resistance arteries (350 μ m diameter) from 3- and 24-month-old rats were exposed to high blood flow (HF) and normal blood flow (NF), for 2 weeks by sequential ligating second-order arteries *in vivo*. In HF arteries, diameter increased by 21% when intraluminal pressure was 100 mmHg, in association with a rise in superoxide production in young rats. On the other hand, both diameter and superoxide levels failed to increase in old rats. Hydralazine restored HF-induced remodelling in old rats in association with an increased superoxide production and a decreased superoxide dismutase (SOD) expression. The SOD-mimetic 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidinoxyl (TEMPOL) prevented the effect of hydralazine on the arterial diameter. In old rats, hydralazine increased the arterial diameter in HF arteries without increasing eNOS expression. Furthermore, hydralazine also restored HF remodelling in eNOS knockout mice.

Conclusion Thus, flow remodelling in resistance arteries failed to occur in aging but it could be restored by hydralazine via a reactive oxygen species-dependent mechanism. These findings may have serious pathophysiological consequences in situations requiring flow-dependent remodelling such as ischaemic and metabolic diseases, more frequent in the elderly.

1. Introduction

Age is a major risk factor for cardiovascular diseases. Age-related decline in cardiovascular functions is in part attributable to reduced cardiac output and heart rate. Aging is also associated with important changes in structure and function of large arteries, including diameter alteration, wall thickening, and stiffening, as well as endothelial dysfunction.¹

With advancing age, pathological situations such as hypertension and ischaemic diseases associated with diabetes or not are more frequent, thereby disturbing the flow-dependent arterial remodelling. Tissues perfusion is under the control of resistance arteries, which in contrast with large arteries do not develop calcification in old subjects,

but the vascular network density and organization change, and in some cases, become less efficient.² In a pathological context, improving microvascular remodelling and, consequently, blood flow supply to organs are thus key issues.

An enhanced metabolism induces a chronic increase in blood flow in the microcirculation triggering outward hypertrophic remodelling,³⁻⁶ in order to normalize shear stress.⁷ This arterial wall remodelling requires the activation of the nitric oxide (NO) pathway.⁸ Nevertheless, in aging such an effect may not take place as endothelium (NO)-dependent dilation is severely blunted.^{9,10} Thus, we aimed first at validating the assumption that flow-induced remodelling of resistance was affected by aging.

Increasing microvascular flow and thereby improving tissues perfusion is a vital concern in diseases, such as diabetes and hypertension, inducing ischaemic disorders. Whereas large arteries undergo outright wall thickening and calcification during aging,¹ structural and functional

* Corresponding author. Tel: +33 2 41 73 58 45; fax: +33 2 41 73 58 95.
E-mail address: daniel.henrion@univ-angers.fr

changes occurring in resistance arteries are much less pronounced, suggesting that microvascular alterations related to aging may be reversible. In previous studies, hydralazine, a non-specific vasodilator, has been shown to improve regional circulations¹¹ and particularly mesenteric blood flow.^{5,6} Thus, we hypothesized that microvascular remodelling in aged rats might be improved by hydralazine.

At the vascular level, advanced age is linked to greater superoxide production.¹² Nevertheless, reactive oxygen species (ROS) may have either deleterious or beneficial effects. Indeed, they are involved in the initiation and progression of a variety of vascular diseases,^{13,14} and also play a key role in the vascular enlargement of the carotid artery in a model of arterio-venous fistula inducing a large increase in blood flow.¹⁵ Thus, we also investigated the role of ROS in flow-dependent remodelling of resistance arteries in old rats in which basal oxidative stress is increased.¹⁶

We conducted a functional and a biochemical study using a model of chronic increase (60–70%)⁵ in blood flow in rat mesenteric resistance arteries. The first aim of our study was to evaluate the incidence of aging on microvascular flow-induced remodelling. Our second objective was to test the reversibility of a potential defect in remodelling using hydralazine and finally we tested the role of ROS in the process.

2. Methods

2.1 Arterial ligation in rat mesenteric arteries

Adult male young (age, 3 months, $n = 14$) and old (age, 24 months, $n = 21$) Wistar rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were anaesthetized (isoflurane) and blood flow in the mesenteric arteries were modified, as previously described.^{3,8,17} Briefly, two first-order feed arteries were alternatively ligated near their bifurcation into second-order arteries. The non-ligated middle artery was thus exposed to high blood flow (HF) in order to irrigate the tissue corresponding to the ligated arteries. The other arteries had normal blood flow (NF) (Figure 1A). The gut was then replaced in the abdominal cavity and the abdomen was sutured in two layers with 4-0 silk. After surgery, rats were left in the animal facility.

After 14 days, rats were anaesthetized and arterial blood pressure was measured in the femoral artery. They then were sacrificed in a CO₂ chamber. The mesentery was then quickly removed and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS) of the following composition (mM): 130, NaCl; 15, NaHCO₃; 3.7, KCl; 1.2 KH₂PO₄; 1.2, MgSO₄; 11, glucose; 1.6, CaCl₂; and 5, HEPES, pH 7.4, PO₂ 160 mmHg, PCO₂ 37 mmHg. HF and NF arteries were divided into two segments, proximal for the functional study and distal for histological and biochemical studies.

The investigation conforms to the European Community standards on the care and use of laboratory animals (authorization nb 00577) and to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.2 Animal treatment

Two groups of young and old rats were each divided into three groups ($n = 7$ per group):

- Group 1: young rats receiving tap water (control).
- Group 2: young rats receiving hydralazine (200 mg/L per day) in drinking water.
- Group 3: young rats receiving 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidinoxyl (TEMPOL, 20 mg/kg per day) by gavage.
- Group 4: old rats receiving tap water.

- Group 5: old rats receiving hydralazine (200 mg/L per day) in drinking water.
- Group 6: old rats receiving TEMPOL (20 mg/kg per day) by gavage-associated with hydralazine (200 mg/L per day) in drinking water.

Treatments started 24 h before surgery and were continued for 15 days. Hydralazine-supplemented water was changed every day.

2.3 Arterial diameter measurement in isolated arteries

Arterial segments were then cannulated at both ends in a video-monitored perfusion system (Living Systems Ins., Burlington, VT, USA) as described previously.¹⁸ Briefly, arteries were bathed and superfused with a Ca²⁺-free PSS containing EGTA (2 mmol/L) and sodium nitroprusside (10 μmol/L). Pressure was controlled by a servo-perfusion system and increased by steps from 10 to 150 mmHg. Internal diameter changes were measured and recorded continuously.

In a separate series of experiments, young mice (10–12 weeks) lacking the gene encoding for eNOS (–/–), treated or not with 200 mg/L hydralazine, and their littermate controls (+/+) ($n = 4$ per group) were submitted to arterial ligation. Arteries (HF and NF) were collected after 14 days as described above.

2.4 Histo-morphometric analysis

Arterial segments pressurized at 75 mmHg and fixed in a 4% buffered formaldehyde solution were cut using a cryostat. Transversal sections (7 μm thick) were stained with orcein solution. Then internal and external medial circumferences were assessed. From these values, medial cross-sectional area (CSA) was calculated, as described previously.³

2.5 Vascular reactivity in isolated arteries

Other segments of mesenteric arteries were dissected and mounted on a wire-myograph (DMT, Aarhus, Denmark) as described previously.¹⁹ Briefly, two tungsten wires (25 μm diameter) were inserted in the lumen of the arteries and fixed to a force transducer and a micrometer, respectively. Arteries were bathed in a PSS as described above. Arteries were set to the baseline circumference L_0 where $L_0 = 0.9L_{100}$ is the internal circumference the artery would have *in vivo* when relaxed and under a transmural pressure of 100 mmHg. The near-maximal active wall tension of the vessel is developed at this circumference.²⁰ Vessels were allowed to stabilize for 1 h. Artery viability was tested using a potassium-rich solution (80 mM).

Acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) cumulative concentration–response curves (1 nmol/L to 10 μmol/L) were then obtained after phenylephrine-induced precontraction (50% of maximal contraction). Two CRC to acetylcholine were performed, before and after incubation with an inhibitor of NO synthase inhibitor, L-NAME (100 μmol/L, 20 min).

2.6 Tissue extraction and protein expression

Segments of HF and NF arteries were collected and quickly frozen. Tissues were then pulverized in liquid nitrogen. The powders were resuspended in lysis buffer of the following composition: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1% sodium dodecyl sulfate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, and proteases inhibitors cocktail. Vessel extracts were incubated in this buffer on ice for 30 min and then centrifuged (14 000 rpm, 15 min, 10°C). The detergent soluble supernatant fractions were retained, and protein concentrations in samples were equalized by using a Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce).

Proteins expression was measured in HF and NF arteries. Proteins (15 μg total protein from each sample) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with the primary antibody (1:1000 for eNOS from

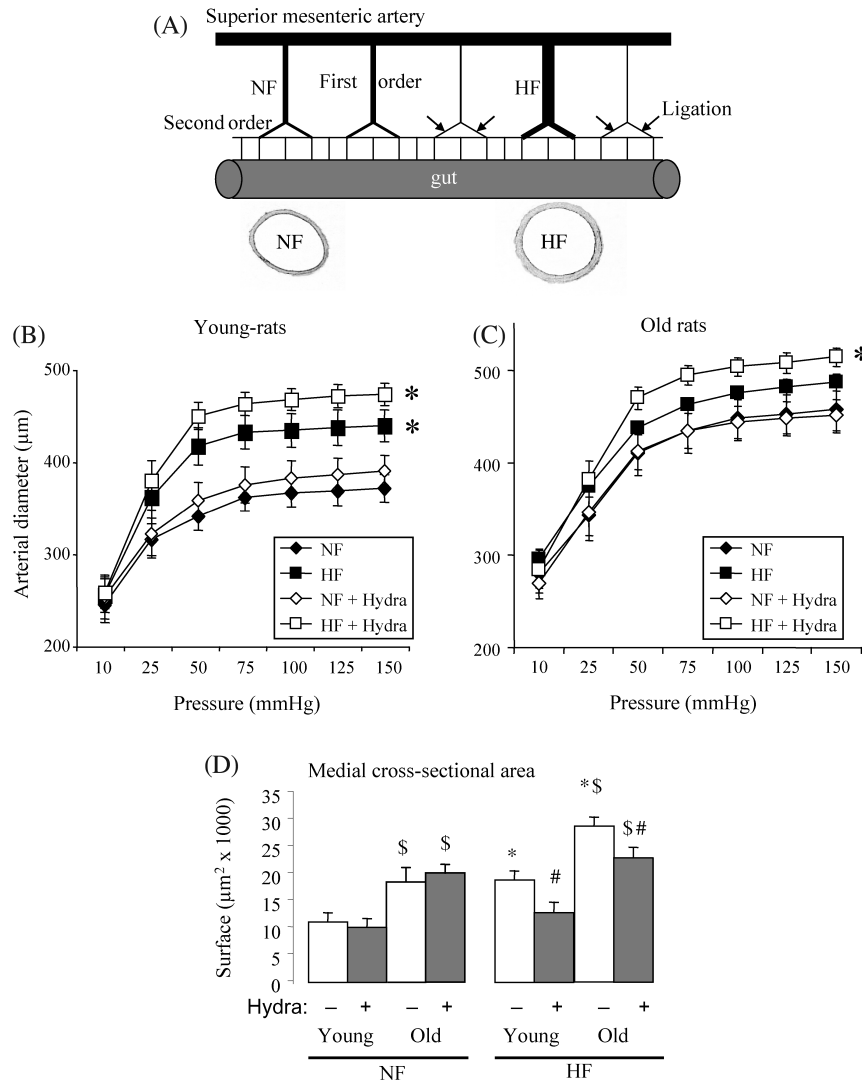


Figure 1 Schematic representation of the mesenteric circulation in rats (A). The location of the ligations of second-order mesenteric artery branches is indicated by arrows. The artery located between two ligated vessels was designated as a high flow (HF) artery. Equivalent arteries located at distance of the ligatures had a normal flow (NF). Pressure–diameter (passive arterial diameter) relationship determined in mesenteric arteries submitted to a chronic increase in blood flow for 2 weeks (HF arteries), compared to control (normal flow: NF) arteries. Arteries were isolated from young (B) and old rats (C) treated or not with hydralazine. Values are means \pm SEM ($n = 7$ per group). Media surface (D) of isolated mesenteric arteries a chronic increase in blood flow for 2 weeks. Arteries were isolated from young and old rats treated or not with hydralazine. Values are means \pm SEM ($n = 7$ per group). * $P < 0.05$, HF arteries compared with the corresponding NF arteries. $^{\$}P < 0.05$, old rats compared with young rats (within HF or NF groups). $^{\#}P < 0.05$, effect of hydralazine (within HF or NF groups).

Transduction Laboratories; 1:1000 for extracellular superoxide dismutase (ecSOD), 1:5000 for manganese SOD (MnSOD) and 1:1000 for copper/zinc SOD (Cu/ZnSOD) from Stressgen, washed (three times for 15 min), and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham) 90 min at room temperature. Proteins were visualized using the SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (Pierce Biotechnology). A polyclonal anti-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used to reprobe blots to confirm equal loading in lanes.

2.7 Superoxide detection and confocal microscopy

As previously described,²¹ dihydroethidium staining (DHE, Sigma-Aldrich) was used to evaluate the *in situ* levels of superoxide anions ($O_2^{\cdot -}$). DHE is permeable to cells and is oxidized by superoxide ($O_2^{\cdot -}$) to fluorescent products that are trapped by intercalation into the DNA. Sections were incubated with DHE (1 μ mol/L) in phosphate-buffered solution (PBS) at 37°C for 30 min in a humidified chamber protected from light. Fluorescent images of ethidium bromide were obtained using a confocal microscope (Solamere Technology, UT,

USA). Sections incubated with PBS alone served as negative controls and sections from animals treated with lipopolysaccharides served as positive controls.

2.8 Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard error (SEM). Significance of the differences between groups was determined by analysis of variance (ANOVA for repeated measurements for pressure-diameter curves and one-way ANOVA followed by Bonferroni for protein expression). In the other set of experiments, means were compared by unpaired *t*-test.

P-values less than 0.05 were considered to be significant.

3. Results

3.1 Animals

Rat body weight was not significantly affected by hydralazine in young (308 ± 11 g in the presence of hydralazine,

vs. 314 ± 10 g) and old rats (683 ± 7 vs. 696 ± 12 g) or by hydralazine + TEMPOL in old rats (704 ± 17 g in the presence of TEMPOL + hydralazine, vs. 696 ± 12 g).

Mean arterial blood pressure was not significantly different between control old rats (104 ± 6 mmHg, $n = 6$), hydralazine-treated old rats (97 ± 9 mmHg) and hydralazine + TEMPOL-treated old rats (97 ± 4 mmHg). Similarly, in young rats, hydralazine did not significantly alter mean arterial blood pressure (101 ± 5 mmHg in the presence of hydralazine, vs. 107 ± 6 mmHg).

3.2 Structural remodelling during aging and effect of hydralazine

Arteries submitted to high or normal blood flow were designated as HF and NF arteries, respectively.

3.2.1 Arterial diameter

In isolated mesenteric resistance arteries, stepwise increases in pressure induced a significant diameter enlargement (Figure 1).

In old control rats, passive arterial diameter, measured 14 days after arterial ligation, was similar in HF and in NF arteries (Figure 1C), whereas it was higher in HF than in NF arteries in young rats (Figure 1B).

In hydralazine-treated young (Figure 1B) and old rats (Figure 1C), passive arterial diameter was significantly higher in HF arteries than in NF arteries.

Hydralazine had no significant effect on arterial diameter in NF arteries in young (Figure 1B) or old rats (Figure 1C).

3.2.2 Cross-sectional area (Figure 1D)

In young and old control rats, medial CSA was significantly increased in HF arteries compared with that in the corresponding NF arteries.

In both NF and HF arteries, medial CSA was higher in old than in young rats, irrespective of the treatment.

In HF arteries, medial CSA was lower in hydralazine-treated rats (either young or old) than in non-treated rats.

3.3 NO pathway

3.3.1 Dilation to acetylcholine (Figure 2A)

Acetylcholine induced a significant dilation in mesenteric resistance arteries.

In both young and old control rats, the dilation induced by acetylcholine in HF arteries was equivalent to that in NF arteries.

In old rats, treated or not with hydralazine, acetylcholine-induced dilation was lower than in corresponding young rats, in either NF or HF.

NO synthesis blockade with L-NAME reduced acetylcholine-dependent dilation in all groups.

3.3.2 Dilation to sodium nitroprusside (Figure 2B)

Sodium nitroprusside induced a significant dilation in mesenteric resistance arteries, which was not affected by the chronic increase in blood flow, aging or hydralazine.

3.3.3 eNOS expression 14 days after ligation (Figure 3A)

The expression of eNOS was equivalent in all groups, irrespective of the type of artery (NF or HF), age or treatment.

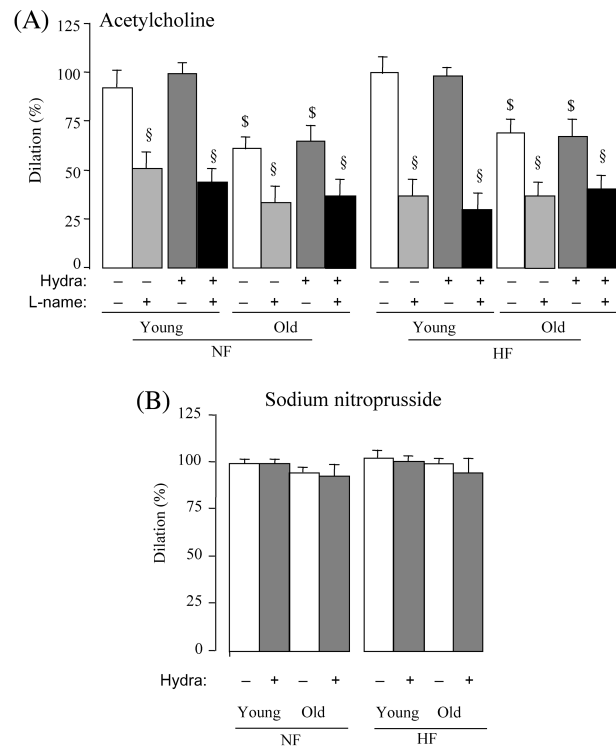


Figure 2 Dilation induced by acetylcholine ($10 \mu\text{mol/L}$, A) in presence or absence of L-NAME, or dilation induced by sodium nitroprusside ($10 \mu\text{mol/L}$, B) obtained in mesenteric resistance arteries submitted to a chronic increase in blood flow (HF) compared to control arteries exposed to normal flow (NF). Arteries were isolated from old or young rats, treated or not with hydralazine (hydra). Dilation is expressed as percentage of phenylephrine-induced precontraction (% dilation). Values are means \pm SEM ($n = 7$ per group). $^{\S}P < 0.05$, old rats compared with young rats (within HF or NF groups). $^{\$}P < 0.05$, L-NAME-treated arteries compared with non-treated arteries (within HF or NF groups, young or old rats).

3.3.4 Arterial remodelling in eNOS $-/-$ mice arteries (Figure 3B)

In untreated eNOS $-/-$ mice, passive arterial diameter in HF arteries was equivalent to that in NF arteries whereas in eNOS $+/+$ mice and in hydralazine-treated eNOS $-/-$ mice, passive arterial diameter was higher in HF arteries than in NF arteries.

3.4 Reactive oxygen species

3.4.1 Superoxide detection

In young control rats, the level of superoxide was increased in HF compared with NF arteries, whereas in the old control rats, the level of superoxide was equivalent in NF and HF arteries.

In NF arteries, the level of superoxide was increased in old rats compared with young rats (Figure 4).

Moreover, in young rats treated with TEMPOL alone, the level of superoxide was equivalent in NF and HF arteries (1.07 ± 0.16 vs. 0.89 ± 0.38). The inhibition of superoxide level increase in HF arteries was associated with an absence of diameter enlargement ($426 \pm 26.3 \mu\text{m}$ in NF arteries vs. $450 \pm 15.3 \mu\text{m}$ diameter in HF arteries when intraluminal pressure was 100 mmHg).

In HF arteries in old hydralazine-treated rats, the level of superoxide was increased compared with corresponding NF arteries and compared with HF arteries in old untreated

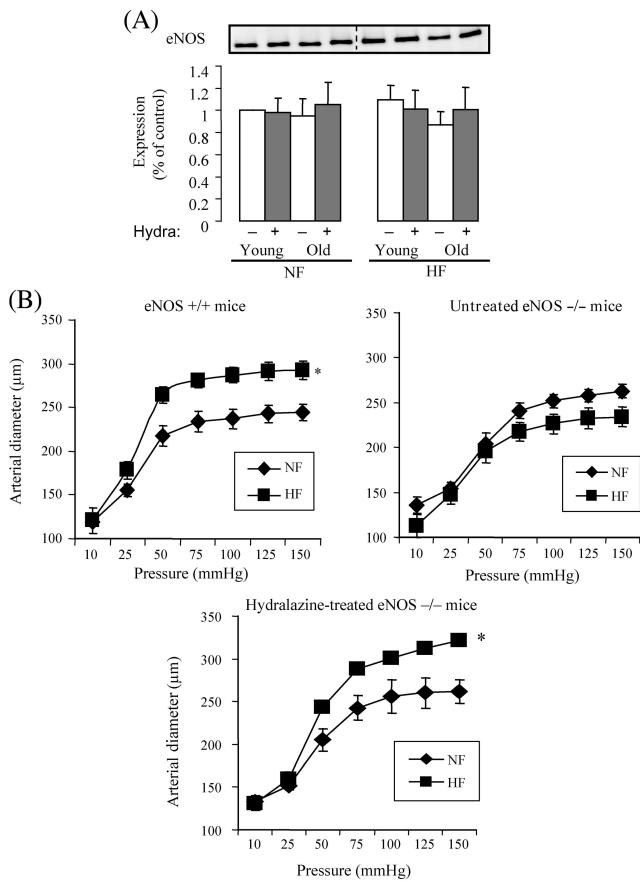


Figure 3 Endothelial nitric oxide synthase (eNOS, A) protein expression in mesenteric resistance arteries submitted to a chronic increase in blood flow (HF) compared to control arteries exposed to normal flow (NF). Arteries were isolated from old or young rats, treated or not with hydralazine (hydra). Protein expression is given as % of control. Values are means \pm SEM ($n = 7$ per group). Pressure-diameter relationship determined in mesenteric arteries isolated from young eNOS +/+ mice, untreated eNOS -/- mice and hydralazine-treated eNOS -/- mice submitted to arterial ligation for 14 days (B). * $P < 0.05$, HF arteries compared with NF arteries in control, eNOS-knockout or hydralazine-treated eNOS-knockout mice. Values are means \pm SEM ($n = 4$ per group).

rats. This increase in superoxide observed in HF arteries in old hydralazine-treated rats was abolished in old hydralazine + TEMPOL-treated rats (Figure 5A).

3.4.2 Arterial remodelling in old rats treated with hydralazine + TEMPOL (Figure 5B)

In old rats treated with hydralazine + TEMPOL, no significant remodelling was observed in HF arteries compared with NF arteries. Arterial diameter in NF arteries was not significantly affected by the combination of hydralazine and TEMPOL (Figure 5B compared to Figure 1C).

3.4.3 Superoxide dismutases expression (Figure 6)

In NF arteries, the expression of CuZnSOD, MnSOD, and ecSOD was increased in old control rats compared with the corresponding young group.

In HF arteries, the expression of CuZnSOD and ecSOD was decreased in hydralazine-treated old rats compared with control old rats (Figure 6B).

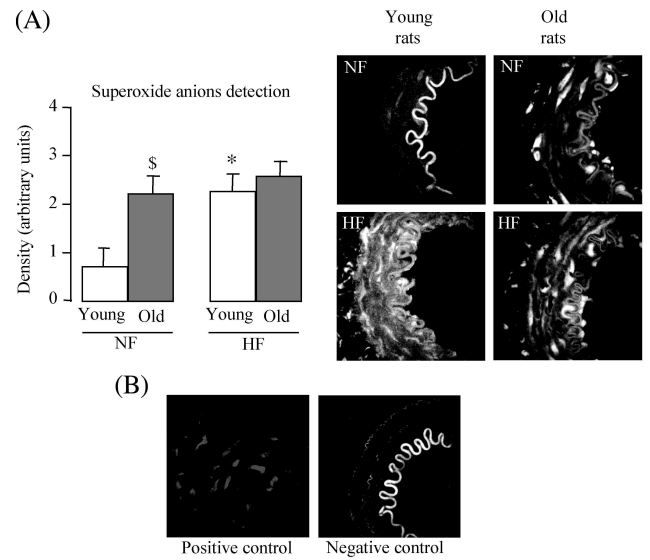


Figure 4 (A) ROS density measured by confocal microscopy in mesenteric resistance arteries chronically submitted to a chronic increase in blood flow (HF) compared with control arteries exposed to normal flow (NF). Arteries were isolated from young and old rats. Bargraphs show the quantification of ROS. Typical examples of ROS staining in each group are shown. A positive control and a negative control are shown in (B). Values are means \pm SEM ($n = 7$ per group). * $P < 0.05$, HF arteries compared with the corresponding NF arteries. [#] $P < 0.05$, old rats compared with young rats (within HF or NF groups).

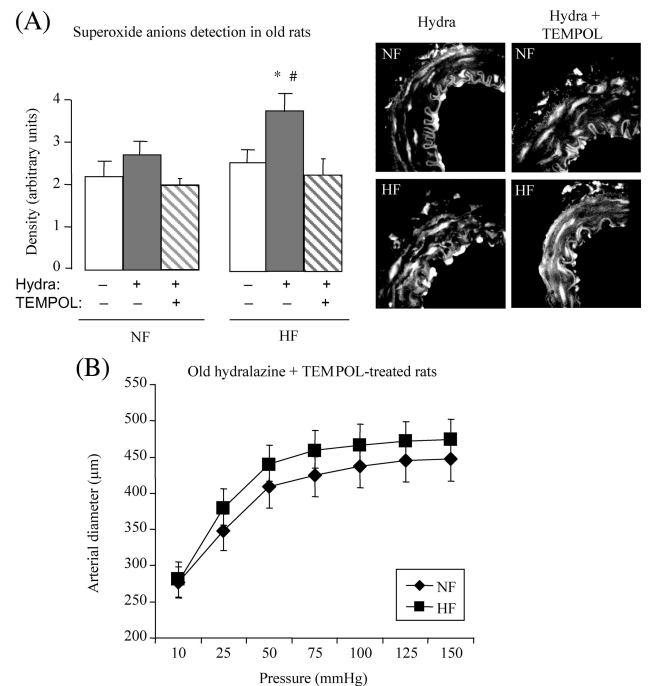


Figure 5 ROS density measured by confocal microscopy in mesenteric resistance arteries chronically submitted to a chronic increase in blood flow (HF) compared with control arteries exposed to normal flow (NF). Arteries were isolated from old rats treated or not with hydralazine associated or not with TEMPOL. Bargraphs show the quantification of ROS. Typical examples of ROS staining in each group are shown (A). Pressure-diameter (passive arterial diameter) relationship determined in mesenteric arteries submitted to a chronic increase in blood flow for 2 weeks (HF arteries), compared with control (normal flow: NF) arteries. Arteries were isolated from old hydralazine-treated rats (B). Values are means \pm SEM ($n = 7$ per group). * $P < 0.05$, HF arteries compared with the corresponding NF arteries. [#] $P < 0.05$, effect of hydralazine (within HF or NF groups).

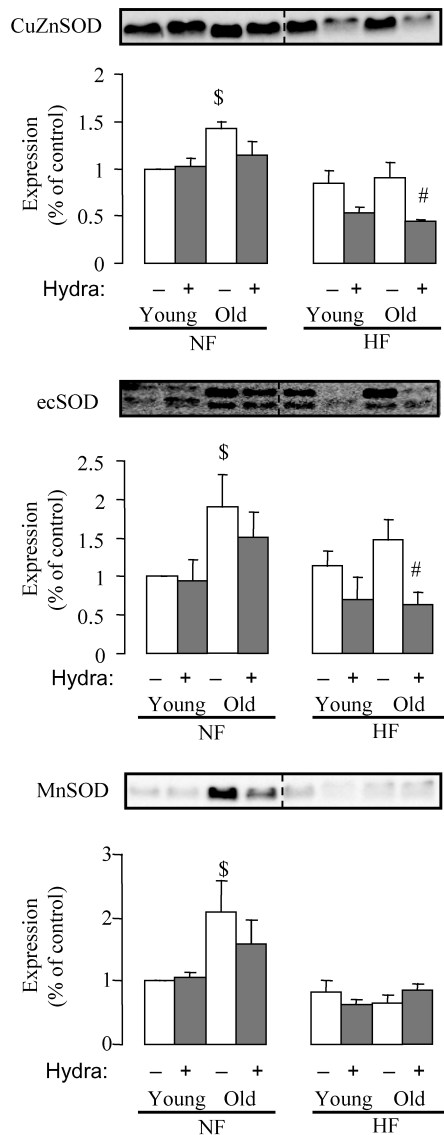


Figure 6 CuZnSOD, MnSOD, and ecSOD protein expression in mesenteric resistance arteries submitted to a chronic increase in blood flow (HF) compared with control arteries exposed to normal flow (NF). Arteries were isolated from old or young rats, treated or not with hydralazine (hydra). Protein expression is given as % of control. Values are means \pm SEM ($n = 7$ per group). ^{\$} $P < 0.05$, old rats compared with young rats (within HF or NF groups). [#] $P < 0.05$, effect of hydralazine (within HF or NF groups).

4. Discussion

We found that in old rats' resistance arteries, a chronic increase in flow (shear stress) triggered a wall thickening but failed to induce luminal expansion. Nevertheless, in old rats treated with hydralazine high flow-induced remodelling was restored without change in endothelial function or eNOS expression but with an increased ROS production.

We used a model previously described in rats^{3,21,22} and mice,²³ allowing comparison of resistance arteries exposed to different blood flow levels in the same physiological conditions *in vivo*. In these arteries, chronic increases in blood flow induce outward hypertrophic arterial remodelling,^{3,23} allowing normalization of wall shear stress.

4.1 Impairment of microvascular flow-induced remodelling in old rats

A key result of the present study is that increasing blood flow in old rats failed to increase arterial diameter in resistance arteries whereas a wall thickening (hypertrophy) occurred.

Using a similar model, a previous report has shown that high flow-induced diameter enlargement in mature (8-month-old) was blunted compared with young rats (2-month-old).²⁴ Our findings, obtained in rats three-time older, are in agreement with this study and with another work showing that high flow-induced remodelling was reduced in the uterine artery during pregnancy in 10-month-old compared with 3-month-old mice.²⁵ In addition, we found that wall hypertrophy occurred in response to the chronic increase in blood flow in old rats, despite the absence of diameter enlargement. Thus, in aging the absence of increase in arterial diameter in response to high flow was associated with a further deleterious effect. Indeed, an increased intima and media thickness is directly associated with an increased risk of myocardial infarction and stroke in aged people.²⁶

In addition in old rats, we found reduced endothelial responsiveness to acetylcholine without, however, change in eNOS expression level. This is in accordance with previous reports showing that endothelium-dependent dilation is blunted in resistance coronary arteries with age.^{27,28} The influence of age on eNOS expression is more controversial and varies depending on the location of the studied arteries.^{29–31} The heterogenic role of NO is probably attributable to the variability of its interaction with the autonomic nervous system. Indeed the NO-dependent modulation of vascular tone diminishes with both aging³² and vessel size.^{33,34} However, two studies performed in resistance vasculature support our results, showing no influence of age on eNOS expression in rat mesenteric arteries.^{28,35} That endothelium-dependent dilation was affected without impairment in eNOS expression suggests that the activity of the protein may be reduced without change in expression level, as previously shown.^{36,37} This defect in NO bioavailability might explain the absence of remodelling in old rats. This is supported by the lack of arterial diameter enlargement in eNOS knockout.³⁸

In addition, a recent study has shown that in young rats, the remodelling following an increase in shear stress in the carotid artery depended on both NO and ROS production¹⁵ supporting the hypothesis of a mechanosensitive generation of ROS.^{39–41} In agreement with these findings obtained in conductance arteries, our results showed that a treatment with TEMPOL, a membrane-permeable SOD mimetic,⁴² abolished the diameter enlargement in association with an absence of increase in ROS in young rats. This suggests that microvascular remodelling depends on ROS production in young animals. In non-treated old rats, we observed an increased ROS production in NF arteries, in agreement with previous studies showing a rise in oxidative stress in aging.^{12,16} On the other hand, no rise in ROS was found in the HF arteries isolated from old rats. Thus, in old rats, the lack of increase in ROS, combined with the defect in eNOS-NO pathway, might emphasize the deficiency in flow-induced remodelling.

Our study was focused on the interaction between the endothelium and the smooth muscle in response to a chronic rise in blood flow. Although the present study did not take into account, the possible role of the autonomic nervous system in the remodelling, its role cannot be excluded. Indeed, its role is central in the control of vascular tone and further investigations are needed to elucidate its role in flow-remodelling.

4.2 Restoration of microvascular flow-remodelling by hydralazine in old rats

The second key finding of the present work is that hydralazine, an antihypertensive drug,⁴³ which we have previously shown to improve mesenteric blood flow and arterial remodeling,^{5,6} restored high flow-induced remodelling in old rats in association with a reduction in wall mass. This represents a dual beneficial effect; an increase in diameter without hypertrophy. We also found in young rats that hydralazine reduced the hypertrophy associated with the diameter enlargement due to high flow, in agreement with our previous report.⁵

We used hydralazine, a well-known antihypertensive drug. Nevertheless, changes in pressure inducing remodelling *per se*,⁴⁴ we chose a low dose not decreasing arterial blood pressure and thus not interfering with flow-induced remodelling. In this study, mean arterial pressure was effectively not significantly affected by hydralazine. Nevertheless, we cannot exclude that the decrease in blood pressure observed (6–7 mmHg) could however contribute to the recovery of luminal expansion by reducing vasoconstrictive influences and also take part in the decrease in wall thickness as previously shown.⁴⁵ It was the unique drug to our knowledge that, when used at a low dose, afforded the double advantage of improving blood flow without significantly influencing arterial pressure.⁴⁶ It is noteworthy that a high dose of hydralazine would have induced a decrease in both arterial pressure and blood flow.⁴⁶

As detailed above, the high flow-induced remodelling depended both on NO production and on the production of ROS. Thus, we explored these two pathways in order to explain the restoration of high flow-remodelling in old rats treated with hydralazine.

In the present study, a chronic treatment with hydralazine improved the defective remodelling in mesenteric resistance arteries in old rats without increasing eNOS expression. Similarly, it has been shown that hydralazine does not affect eNOS protein expression and mRNA level in the kidney.⁴⁷ In order to confirm that an enhancement in eNOS activity could not contribute to the restoration of remodelling, we treated eNOS-KO mice with hydralazine. Although eNOS-KO mice HF-arteries did not remodel (no diameter increase), a significant diameter enlargement occurred in hydralazine-treated eNOS-deficient mice. This latter remodelling was equivalent to that found in wild-type animals. This observation suggests that the restoration of flow-remodelling by hydralazine is independent of the eNOS-NO pathway. Nevertheless, we cannot dismiss the eventuality that the deficiency in flow-induced NO production, in the presence of hydralazine, could be compensated by an upregulation in iNOS,⁴⁸ nNOS or vasodilator prostaglandins production. Indeed, such an effect contributing to the maintenance of flow-induced dilation in non-treated eNOS-KO mice has been reported in coronary arteries⁴⁹ and

in gracilis muscle arterioles.⁵⁰ Nevertheless, in the present study, the remodelling was totally abolished in eNOS-KO mice thereby excluding a role for these adaptive mechanisms in high flow-remodelling. In addition, in rats, hydralazine did not affect endothelium-dependent dilation, as previously shown in mice arteries.^{5,6} This also suggests that no compensatory mechanism was stimulated by hydralazine in old rats.

We found that in old rats treated with hydralazine, the recovery of flow-remodelling was associated with a higher superoxide anions level. This finding suggests that hydralazine improved flow-induced remodelling in old rats via a ROS-dependent mechanism.

In order to determine the origin of the increase in superoxide anions, we measured the expression levels of SOD, enzyme having superoxide-scavenging activity and whose alteration might induce an increase in superoxide anions level. We found that the expressions in cytoplasmic SOD (Cu/ZnSOD) and ecSOD, but not mitochondrial SOD (MnSOD), were reduced in this group. Therefore, the high level of superoxide observed in hydralazine-treated old rats HF arteries might result from a lower ROS scavenging by SOD. This is in agreement with a previous study showing that in the presence of hydralazine SOD is partially decomposed, thus inducing an increase in ROS concentration.⁵¹ Moreover, ROS generation was observed during oxidation of hydralazine.⁵² These observations might explain that hydralazine, usually described as antioxidant, can exert pro-oxidant effects as seen in the present study, in a situation involving high oxidative stress such as aged resistance arteries. Similarly, blood flow might also be responsible for oxidation of hydralazine, as increases in blood flow trigger vascular free radical generation.⁵³ Therefore, the enhancement of superoxide production observed in HF arteries from hydralazine treated old rats could come from the combined influence of shear stress and aging.

Finally, that hydralazine induced a rise in ROS through SOD decomposition, resulting in a recovery of structural remodelling in old rats, was confirmed by the use of TEMPOL which totally suppressed the positive effect of hydralazine on HF-remodelling in old rats.

These observations suggest that O₂⁻ take part in the improvement of flow-remodelling by hydralazine, strengthening the innovating hypothesis of a beneficial role of ROS in the process as previous described in carotid arteries,⁵⁴ although the increase in superoxide anions found in the present study was attributable to a reduced SOD expression.

In conclusion, these findings show that, in resistance arteries, diameter enlargement induced by a chronic increase in blood flow was absent in old rats. Nevertheless, a chronic treatment with hydralazine restored this remodelling in old rats by increasing arterial diameter via an enhanced formation of reactive oxygen species. This defect in resistance arteries remodelling in response to a chronic increase in blood flow in aging should be taken into account in the understanding of the various diseases occurring more frequently in aging (cardiovascular, metabolic or ischaemic diseases). Nevertheless, that hydralazine was able to restore remodelling in old rats resistance arteries opens important perspectives as this finding shows that it remains possible to improve blood flow supply, often blunted with aging and the associated diseases.

Acknowledgements

We thank the local Animal Care Unit of the University of Angers and Jérôme Roux, Pierre Legras, Dominique Gilbert for their kind help in treating the rats.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported in part by the Foundation for Medical Research (FRM: Fondation pour la Recherche Médicale), Paris, France. Odile Dumont is a fellow of the Pays de la Loire Region, France. Daniel Henrion was supported by an Interface grant (Contrat d'interface INSERM–CHU d'Angers).

References

- Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension* 2005;46:454–462.
- Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation* 2005;12:33–45.
- Pourageaud F, De Mey JG. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. *Am J Physiol* 1997;273:H1699–H1706.
- Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, Condict KW, Connors BA, Herring BP *et al.* Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1380–H1389.
- Gomy D, Loufrani L, Kubis N, Levy BI, Henrion D. Chronic hydralazine improves flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation in mouse mesenteric resistance arteries in vitro. *Microvasc Res* 2002;64:127–134.
- Loufrani L, Henrion D. Vasodilator treatment with hydralazine increases blood flow in mdx mice resistance arteries without vascular wall remodeling or endothelium function improvement. *J Hypertens* 2005;23:1855–1860.
- Langille BL. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:834–841.
- Leiro JM, Alvarez E, Arranz JA, Cano E, Orallo F. Antioxidant activity and inhibitory effects of hydralazine on inducible NOS/COX-2 gene and protein expression in rat peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol* 2004;4:163–177.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005;144:449–458.
- Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 2005;66:286–294.
- Schmidt R, Baechle T, Hoetzel A, Loop T, Humar M, Roeslein M *et al.* Dihydralazine treatment limits liver injury after hemorrhagic shock in rats. *Crit Care Med* 2006;34:815–822.
- Oudot A, Martin C, Busseuil D, Vergely C, Demaison L, Rochette L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2214–2222.
- Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, Higa N, Matsuzaki T, Noguchi K *et al.* Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology* 2007;148:160–165.
- Miyagawa K, Ohashi M, Yamashita S, Kojima M, Sato K, Ueda R *et al.* Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2007;25:415–421.
- Castier Y, Brandes RP, Leseche G, Tedgui A, Lehoux S. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* 2005;97:533–540.
- Sohal RS. Oxidative stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med* 2002;33:573–574.
- Tulis DA, Unthank JL, Prewitt RL. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. *Am J Physiol* 1998;274:H874–H882.
- Henrion D, Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger GM, Colucci-Guyon E *et al.* Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest* 1997;100:2909–2914.
- Loufrani L, Matrougui K, Li Z, Levy BI, Lacolley P, Paulin D *et al.* Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. *FASEB J* 2002;16:117–119.
- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977;41:19–26.
- Bouvet C, de Chantemele EB, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O *et al.* Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension* 2007;50:248–254.
- Unthank JL, Fath SW, Burkhardt HM, Miller SC, Dalsing MC. Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. *Circ Res* 1996;79:1015–1023.
- Loufrani L, Levy BI, Henrion D. Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res* 2002;91:1183–1189.
- Tuttle JL, Hahn TL, Sanders BM, Witzmann FA, Miller SJ, Dalsing MC *et al.* Impaired collateral development in mature rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H146–H155.
- van der Heijden OW, Essers YP, Simkens LH, Teunissen QG, Peeters LL, De Mey JG *et al.* Aging blunts remodeling of the uterine artery during murine pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:304–310.
- O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:14–22.
- Ishida S, Hamasaki S, Kamekou M, Yoshitama T, Nakano F, Yoshikawa A *et al.* Advancing age is associated with diminished vascular remodeling and impaired vasodilation in resistance coronary arteries. *Coron Artery Dis* 2003;14:443–449.
- Sun D, Huang A, Yan EH, Wu Z, Yan C, Kaminski PM *et al.* Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H2249–H2256.
- Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A *et al.* Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 2002;90:1159–1166.
- van der Loo B, Bachschmid M, Labugger R, Schildknecht S, Kilo J, Hahn R *et al.* Expression and activity patterns of nitric oxide synthases and antioxidant enzymes reveal a substantial heterogeneity between cardiac and vascular aging in the rat. *Biogerontology* 2005;6:325–334.
- Newaz MA, Yousefipour Z, Oyekan A. Oxidative stress-associated vascular aging is xanthine oxidase-dependent but not NAD(P)H oxidase-dependent. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:88–94.
- White M, Courtemanche M, Stewart DJ, Talajic M, Mikes E, Cernacek P *et al.* Age- and gender-related changes in endothelin and catecholamine release, and in autonomic balance in response to head-up tilt. *Clin Sci (Lond)* 1997;93:309–316.
- Quail AW, Cottee DB, Porges WL, White SW. Recent views on integrated coronary control: significance of non-uniform regional control of coronary flow conductance. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:1039–1044.
- Smith KM, Macmillan JB, McCulloch KM, McGrath JC. NOS inhibition potentiates norepinephrine but not sympathetic nerve-mediated co-transmission in resistance arteries. *Cardiovasc Res* 1999;43:762–771.
- Briones AM, Salasces M, Vila E. Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1beta exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech Ageing Dev* 2005;126:710–721.
- Smith AR, Visioli F, Frei B, Hagen TM. Age-related changes in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and nitric oxide dependent vasodilation: evidence for a novel mechanism involving sphingomyelinase and ceramide-activated phosphatase 2A. *Ageing Cell* 2006;5:391–400.
- Soucy KG, Ryoo S, Benjo A, Lim HK, Gupta G, Sohi JS *et al.* Impaired shear stress-induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness. *J Appl Physiol* 2006;101:1751–1759.
- Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:317–324.
- Hsieh HJ, Cheng CC, Wu ST, Chiu JJ, Wung BS, Wang DL. Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J Cell Physiol* 1998;175:156–162.
- Chiu JJ, Wung BS, Shyy JY, Hsieh HJ, Wang DL. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3570–3577.

41. Ungvari Z, Wolin MS, Csiszar A. Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling? *Antioxid Redox Signal* 2006;**8**:1121–1129.
42. Khattab MM. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *Eur J Pharmacol* 2006;**548**:167–173.
43. Bennett MA, Hillier C, Thurston H. Endothelium-dependent relaxation in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats: effect of long-term treatment with perindopril, quinapril, hydralazine or amlodipine. *J Hypertens* 1996;**14**:389–397.
44. Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002;**4**:49–55.
45. Ikeda F, Azuma K, Ogihara T, Toyofuku Y, Otsuka A, Mita T *et al.* Angiotensin II type 1 Receptor Blocker Reduces Monocyte Adhesion to Endothelial Cells in Spontaneously Hypertensive Rats. *Endocr J* 2007;**54**:605–612.
46. Horsman MR, Christensen KL, Overgaard J. Relationship between the hydralazine-induced changes in murine tumor blood supply and mouse blood pressure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;**22**:455–458.
47. Sato K, Kihara M, Hashimoto T, Matsushita K, Koide Y, Tamura K *et al.* Alterations in renal endothelial nitric oxide synthase expression by salt diet in angiotensin type-1a receptor gene knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2004;**15**:1756–1763.
48. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd *et al.* Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2000;**101**:2742–2748.
49. Huang A, Sun D, Shesely EG, Levee EM, Koller A, Kaley G. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**282**:H429–H436.
50. Sun D, Liu H, Yan C, Jacobson A, Ojaimi C, Huang A *et al.* COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**291**:H1429–H1435.
51. Maliszewska M, Jezierski A, Micera G, Gasiorowski K, Kozłowski H. Influence of dihydralazine on the generation of hydroxyl radicals by human granulocytes. *Biomed Biochim Acta* 1990;**49**:347–351.
52. Yamamoto K, Kawanishi S. Free radical production and site-specific DNA damage induced by hydralazine in the presence of metal ions or peroxidase/hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 1991;**41**:905–914.
53. Laurindo FR, Pedro Mde A, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O *et al.* Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res* 1994;**74**:700–709.
54. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;**160**:1–40.

ARTICLE 2

Microcirculatory differences between pulsatile and non pulsatile cardiopulmonary bypass. (Différences microcirculatoires entre CEC pulsée et non pulsée)

ITBM-RBM 28 (2007) S15–S20

Christophe Baufreton^{1,2}, **Frédéric Pinaud**^{1,3}, Laurent Loufrani³, Daniel Henrion³.

1 – Service de Chirurgie Cardiaque, Université d'Angers, CHU d'Angers, France

2 – UPRES-EA 3860, Université d'Angers, Faculté de Médecine d'Angers, Angers, France

3 – UMR CNRS 6214 – INSERM 771, Université d'Angers, Faculté de Médecine d'Angers, France.

RESUME

Le bénéfice de la perfusion pulsée en circulation extra-corporelle (CEC) reste encore débattu. Au-delà de la difficulté à quantifier la pulsatilité en CEC, l'absence de preuve d'un flux pulsé dans la microcirculation a longtemps contribué à cette controverse. Les techniques de microscopie intra vitale ont permis dans les années 90 de démontrer la réalité de la pulsatilité dans la microcirculation. La perfusion pulsée permet la transmission d'une puissance énergétique latérale aux tissus assurant la perméabilité capillaire et les échanges entre les milieux vasculaire et extra-vasculaire. Le métabolisme cellulaire s'en trouve ainsi amélioré comme en témoignent de nombreux marqueurs physiologiques et biochimiques.

Microcirculation et CEC

Différences microcirculatoires entre CEC pulsée et non pulsée

Microcirculatory differences between pulsatile and non pulsatile cardiopulmonary bypass

C. Baufreton^{1,2*}, F. Pinaud^{1,3}, L. Loufrani³, D. Henrion³.

¹Université d'Angers, CHU d'Angers, Hôpital Larrey, Service de Chirurgie Cardiaque, Pôle Cardiovasculaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France

²Université d'Angers, faculté de médecine d'Angers, UPRES-EA 3860 « Préconditionnement et Remodelage du Myocarde », Angers, France

³Université d'Angers, Faculté de médecine d'Angers, UMR CNRS 6214 – INSERM 771 « Laboratoire de Biologie Neurovasculaire Intégrée », France.

Résumé

Le bénéfice de la perfusion pulsée en circulation extra-corporelle (CEC) reste encore débattu. Au-delà de la difficulté à quantifier la pulsatilité en CEC, l'absence de preuve d'un flux pulsé dans la microcirculation a longtemps contribué à cette controverse. Les techniques de microscopie intra vitale ont permis dans les années 90 de démontrer la réalité de la pulsatilité dans la microcirculation. La perfusion pulsée permet la transmission d'une puissance énergétique latérale aux tissus assurant la perméabilité capillaire et les échanges entre les milieux vasculaire et extra-vasculaire. Le métabolisme cellulaire s'en trouve ainsi amélioré comme en témoignent de nombreux marqueurs physiologiques et biochimiques.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The benefit of pulsatile cardiopulmonary bypass (CPB) is still open for debate. Beyond the difficulties to quantify pulsatility during CPB, the lack of evidence of the pulsatile effect on the microcirculation has widely contributed to this controversy. Intravital microscopy has demonstrated in the 90's that pulsatility exists in the capillary bed. Pulsatile perfusion provides energy equivalent pressure and transmission of surplus hemodynamic energy to the tissues ensuring exchanges between vascular and extra-vascular compartments. Thus cellular metabolism is improved as reflected by numerous physiologic and biochemical markers.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Circulation extracorporelle ; Flux pulsé ; Microcirculation ; Pompe artérielle

Keywords: Cardiopulmonary bypass; Pulsatile flow; Microcirculation; Arterial pump

* Auteur correspondant

Adresse e-mail : ChBaufreton@chu-angers.fr

C.B. et D.H. sont supportés par un Contrat d'Interface INSERM-CHU

1. Introduction

La circulation extracorporelle (CEC) permet d'opérer sur un champ immobile et exsangue en suppléant temporairement les fonctions cardiaque et ventilatoire. Cette machine cœur-poumon doit donc en théorie reproduire autant que possible la physiologie et l'hémodynamique du patient. Mais depuis que la CEC existe, la pulsativité du flux délivré par la pompe reste une question récurrente et non résolue.

L'impact de la pulsativité sur la microcirculation avait fait l'objet de publications avant même la première application clinique de la CEC par Gibbon en 1953 [1-3]. Pourtant, même si certaines pompes de CEC peuvent générer un flux pulsé, rares sont les équipes qui en routine utilisent des CEC pulsées pour leurs patients. L'intérêt de cette pulsativité reste largement débattu, notamment à l'échelon microcirculatoire pour lequel la notion de flux pulsé physiologique est encore controversée. De nombreuses raisons permettent d'expliquer cette absence de consensus, en particulier le manque de connaissance sur la physiologie du flux pulsé et de l'énergie pulsatile délivrée par le cœur, le manque de définition consensuelle de la pulsativité en CEC, le manque de pompes adéquates, et le succès des pompes conventionnelles. De plus, les progrès constants de la chirurgie cardiaque et de la CEC n'incitent pas les équipes à rediscuter incessamment des techniques qui leur donnent satisfaction. Cependant, l'analyse des résultats de la base de données de la *Society of Thoracic Surgeons* (STS) montre que près de 20 % des patients à faible risque opérés de pontages aorto-coronariens développent en postopératoire une complication liée au syndrome post-CEC [4], lui-même caractérisé par l'existence d'un syndrome inflammatoire généralisé associé à de profonds désordres hématologiques retentissant sur la microcirculation.

2. Flux pulsé : de quoi parle-t-on ?

2.1. Aspects hémodynamiques

La notion qu'une courbe de pression, pulsée ou non, suffit à évaluer précisément le niveau de pulsativité d'une CEC est un mythe bien ancré dans les mentalités [5]. En fait la génération d'un flux pulsé dépend plus du gradient d'énergie que du gradient de pression [6-9]. La formule de la pression énergétique (*EPP energy equivalent pressure*) de Shepard [6] est l'outil de référence pour quantifier la courbe pression-débit parce qu'elle prend en compte à la fois la courbe de pression et la courbe du flux fourni par la pompe. Elle représente le ratio entre l'aire sous la courbe d'énergie hémodynamique ($\int fp dt$) et l'aire sous la courbe du flux délivré par la pompe ($\int f dt$) durant chaque cycle pulsé :

$$EEP = (\int fp dt) / (\int f dt)$$

Où f représente le flux délivré par la pompe, p la pression artérielle et dt signifie que l'intégrale est calculée par rapport au temps t . Cette EEP est exprimée en mm Hg. Un flux

qui produit une pression pulsée de plus de 15 à 20 mmHg est considéré pulsatile tandis qu'un flux qui génère une pression pulsée de moins de 15 mmHg est considéré non pulsatile [9]. Il est possible de comparer l'EEP avec la pression artérielle moyenne, la différence entre ces deux variables représentant le surplus d'énergie hémodynamique [10]. Cette composante pulsatile est responsable de la transmission latérale de l'énergie dans les tissus [11,12]. Le manque d'outil aisément disponible pour mesurer cette EEP en salle d'opération est certainement un frein à la quantification de la pulsativité d'une CEC. D'autres méthodes ont été proposées comme l'index de puissance pulsatile [13] ou l'index de pulsativité [14], ce dernier étant calculé à partir de mesures en Doppler transcrânien des vitesses sanguines au niveau de l'artère cérébrale moyenne.

Le surplus d'énergie hémodynamique n'existe que si un minimum de pulsativité est contenu dans la pression ou le flux. À l'extrême, ce surplus d'énergie hémodynamique n'existe pas avec un flux totalement non pulsatile comme c'est le cas avec les pompes centrifuges [15]. Ainsi, il a été très récemment démontré chez des patients bénéficiant d'assistance circulatoire, qu'un système pulsatile (Thoratec HeartMate XVE ou IVAD) restaurait un surplus d'énergie hémodynamique tandis qu'un système non pulsatile (Thoratec heartMate II ou MicroMed DeBakey) était associé à un effondrement (-95 %) du surplus d'énergie hémodynamique physiologique [16]. La particularité cependant de l'assistance chronique par rapport à la CEC (assistance aigue de courte durée) est de laisser persister une activité de battement cardiaque au-delà de l'opération, même en l'absence d'éjection. Ce point important limite probablement l'extrapolation des connaissances issues de la CEC à l'assistance circulatoire prolongée.

2.2. Quelques faits établis sur les flux pulsés en CEC

Les pompes à galets permettent de réaliser un flux pulsé après réglages de la vitesse de rotation du rotor (variation possible du pourcentage du flux moyen en mode pulsé, de la durée de pulsation et de la fréquence de pulsativité) [17]. Cependant, comparativement aux pompes centrifuges totalement non pulsatiles, les pompes à galets en mode non pulsé sont malgré tout capables de fournir une pression pulsée de 10 à 15 mmHg [15]. La notion qu'une pompe à galet génère en soi un flux pulsé a été rapportée il y a maintenant 20 ans [18]. Ceci n'est pas sans importance et doit être pris en considération à la lecture des différentes études qui sont publiées et qui le plus souvent postulent a priori qu'une pompe à galets est non pulsatile. En outre, il a été démontré que certaines pompes à galets a priori pulsatiles ne génèrent pas plus d'énergie hémodynamique que certaines pompes à galets non pulsatiles [19,20], ce qui complique l'interprétation des résultats et la discussion. D'où l'importance de la quantification précise des courbes de pression-débit qui fait souvent défaut dans cette littérature. La géométrie des oxy-

générateurs et des canules n'est pas non plus sans impact sur l'amortissement de la pulsativité [21].

2.3. Bénéfices cliniques de la CEC pulsée

De nombreuses et parfois anciennes études ont cherché à montrer les bénéfices cliniques de la CEC pulsée. L'utilisation d'une perfusion pulsatile a été associée à une meilleure régulation de la production en angiotensine, aldostérone, catécholamines [22-24] et du métabolisme hormonal thyroïdien [25]. Comparativement à une CEC pulsée qui maintient un flux lymphatique, une CEC non pulsée a pour conséquence une rétention hydrique, malgré une volémie normale, expliquant la formation d'œdèmes périphérique et pulmonaire altérant les échanges gazeux [26]. Mais ces résultats sont controversés et ces effets bénéfiques n'ont pas été retrouvés par tous les investigateurs [27-31]. Néanmoins, peu d'études randomisées ont été réalisées et leur analyse, ainsi que celles des principales cohortes rétrospectives, a montré leurs faiblesses. Dans une revue de la littérature publiée par Alghamdi [32], le seul essai contrôlé et randomisé jugé de bonne qualité a permis de conclure qu'une perfusion pulsatile durant la CEC était associée à une réduction des infarctus myocardiques, de la mortalité et des complications majeures [33]. Également en utilisant des critères de jugement robustes, Taylor a montré que la composante pulsatile de la CEC réduisait la mortalité et le recours à la contre pulsion intra-aortique ou aux inotropes [34]. Mais même si la perfusion pulsée permet de minimiser la morbi-mortalité en chirurgie cardiaque, il ne faut certainement pas escompter une disparition complète des complications postopératoires par le simple fait de cette pulsativité. De façon intéressante, la durée de la pulsativité semble être un paramètre important avec un bénéfice qui semble plus évident au-delà de 45 minutes de clampage aortique [5]. La durée de clampage aortique semble d'ailleurs être un paramètre plus pertinent que la durée de CEC elle-même vis-à-vis de la réaction inflammatoire [35].

3. Aspects microcirculatoires

3.1. Particularités anatomo-physiologiques de la microcirculation

La microcirculation concerne les artérioles de moins de 150 μm et les capillaires qui les suivent après leurs divisions successives. Le diamètre des capillaires, lieu où se produisent les échanges, est d'environ 5 μm . Ce réseau est un élément essentiel de la régulation des pressions et des résistances vasculaires. La persistance de la pulsativité de l'onde de pression dans la microcirculation est controversée ce qui peut s'expliquer par les difficultés de mesure expérimentale. Les vitesses d'écoulement du sang dans ce réseau

sont très hétérogènes, en particulier du fait des modifications rhéologiques qui consistent en une déformation des érythrocytes, plus gros que les capillaires, et une accumulation co-axiale au sein d'un manchon plasmatique à la périphérie du capillaire. De plus, la viscosité augmente lorsque le diamètre du capillaire diminue. Cette viscosité est en partie liée à la présence des érythrocytes, très nombreux, mais aussi à celle des globules blancs, beaucoup moins nombreux, dont la viscosité interne est cependant beaucoup plus élevée. Ajoutons que lors des processus inflammatoires déclenchés par l'intervention chirurgicale et la CEC, ces leucocytes s'associent et s'agrègent entre eux pour accentuer le risque d'hypoperfusion tissulaire.

3.2. Preuves de la pulsativité dans la microcirculation

La disparition de la pulsativité peut donc logiquement faire craindre un collapsus ou une sédimentation capillaire. Un shunt microcirculatoire interrompant l'apport nutritionnel cellulaire et un déplacement vers un métabolisme anaérobie en sont les conséquences redoutées. La microscopie *intra vitale* a apporté des preuves directes de l'effet de la pulsativité sur la microcirculation. En 1994, Lee a pu ainsi observer que la pulsativité existe dans le lit capillaire de muscle squelettique de chèvre et que l'utilisation d'une perfusion non pulsatile de façon prolongée conduit à une détérioration de la microcirculation pouvant compromettre la fonction des organes [36]. Konishi [37] et Baba [38,39] ont fait des observations similaires sur les microcirculations pulmonaire et de la conjonctive bulbaire. Dobsak a étudié différents niveaux de pulsativité sur la perfusion microcirculatoire de conjonctive bulbaire de chèvre [40] ; un flux continu a été associé à une vasoconstriction globale des veinules mais la morphologie de ces vaisseaux n'a pas été affectée par une pulsativité partielle comparativement à une pulsativité complète. Le surplus énergétique ainsi créé par la perfusion pulsatile, même partiellement, force le flux sanguin dans la microcirculation et rend les échanges plasmatiques et cellulaires possibles. L'utilisation d'une perfusion pulsatile a été associée à une amélioration des flux microcirculatoires, de la perfusion myocardique, de l'oxygénation et des indices de contractilité [32].

D'autres preuves indirectes du bénéfice d'une perfusion pulsatile ont été rapportées grâce à des mesures de perfusion tissulaire par laser Doppler par de nombreux investigateurs [41-47]. Ces mesures effectuées le plus souvent dans les territoires splanchniques ont toutes été favorables à l'utilisation d'une perfusion pulsatile. Cette technique de mesure indirecte de la perfusion digestive a permis également de démontrer la diminution significative de la perfusion tissulaire de la muqueuse gastrique au cours de CEC hypothermique non pulsée chez des patients opérés de pontages aortocoronariens [48].

générateurs et des canules n'est pas non plus sans impact sur l'amortissement de la pulsativité [21].

2.3. Bénéfices cliniques de la CEC pulsée

De nombreuses et parfois anciennes études ont cherché à montrer les bénéfices cliniques de la CEC pulsée. L'utilisation d'une perfusion pulsatile a été associée à une meilleure régulation de la production en angiotensine, aldostérone, catécholamines [22-24] et du métabolisme hormonal thyroïdien [25]. Comparativement à une CEC pulsée qui maintient un flux lymphatique, une CEC non pulsée a pour conséquence une rétention hydrique, malgré une volémie normale, expliquant la formation d'œdèmes périphérique et pulmonaire altérant les échanges gazeux [26]. Mais ces résultats sont controversés et ces effets bénéfiques n'ont pas été retrouvés par tous les investigateurs [27-31]. Néanmoins, peu d'études randomisées ont été réalisées et leur analyse, ainsi que celles des principales cohortes rétrospectives, a montré leurs faiblesses. Dans une revue de la littérature publiée par Alghamdi [32], le seul essai contrôlé et randomisé jugé de bonne qualité a permis de conclure qu'une perfusion pulsatile durant la CEC était associée à une réduction des infarctus myocardiques, de la mortalité et des complications majeures [33]. Également en utilisant des critères de jugement robustes, Taylor a montré que la composante pulsatile de la CEC réduisait la mortalité et le recours à la contre pulsion intra-aortique ou aux inotropes [34]. Mais même si la perfusion pulsée permet de minimiser la morbi-mortalité en chirurgie cardiaque, il ne faut certainement pas escompter une disparition complète des complications postopératoires par le simple fait de cette pulsativité. De façon intéressante, la durée de la pulsativité semble être un paramètre important avec un bénéfice qui semble plus évident au-delà de 45 minutes de clampage aortique [5]. La durée de clampage aortique semble d'ailleurs être un paramètre plus pertinent que la durée de CEC elle-même vis-à-vis de la réaction inflammatoire [35].

3. Aspects microcirculatoires

3.1. Particularités anatomo-physiologiques de la microcirculation

La microcirculation concerne les artérioles de moins de 150 µm et les capillaires qui les suivent après leurs divisions successives. Le diamètre des capillaires, lieu où se produisent les échanges, est d'environ 5 µm. Ce réseau est un élément essentiel de la régulation des pressions et des résistances vasculaires. La persistance de la pulsativité de l'onde de pression dans la microcirculation est controversée ce qui peut s'expliquer par les difficultés de mesure expérimentale. Les vitesses d'écoulement du sang dans ce réseau

sont très hétérogènes, en particulier du fait des modifications rhéologiques qui consistent en une déformation des érythrocytes, plus gros que les capillaires, et une accumulation co-axiale au sein d'un manchon plasmatique à la périphérie du capillaire. De plus, la viscosité augmente lorsque le diamètre du capillaire diminue. Cette viscosité est en partie liée à la présence des érythrocytes, très nombreux, mais aussi à celle des globules blancs, beaucoup moins nombreux, dont la viscosité interne est cependant beaucoup plus élevée. Ajoutons que lors des processus inflammatoires déclenchés par l'intervention chirurgicale et la CEC, ces leucocytes s'associent et s'agrègent entre eux pour accentuer le risque d'hypoperfusion tissulaire.

3.2. Preuves de la pulsativité dans la microcirculation

La disparition de la pulsativité peut donc logiquement faire craindre un collapsus ou une sédimentation capillaire. Un shunt microcirculatoire interrompant l'apport nutritionnel cellulaire et un déplacement vers un métabolisme anaérobie en sont les conséquences redoutées. La microscopie *intra vitale* a apporté des preuves directes de l'effet de la pulsativité sur la microcirculation. En 1994, Lee a pu ainsi observer que la pulsativité existe dans le lit capillaire de muscle squelettique de chèvre et que l'utilisation d'une perfusion non pulsatile de façon prolongée conduit à une détérioration de la microcirculation pouvant compromettre la fonction des organes [36]. Konishi [37] et Baba [38,39] ont fait des observations similaires sur les microcirculations pulmonaire et de la conjonctive bulbaire. Dobsak a étudié différents niveaux de pulsativité sur la perfusion microcirculatoire de conjonctive bulbaire de chèvre [40] ; un flux continu a été associé à une vasoconstriction globale des veinules mais la morphologie de ces vaisseaux n'a pas été affectée par une pulsativité partielle comparativement à une pulsativité complète. Le surplus énergétique ainsi créé par la perfusion pulsatile, même partiellement, force le flux sanguin dans la microcirculation et rend les échanges plasmatiques et cellulaires possibles. L'utilisation d'une perfusion pulsatile a été associée à une amélioration des flux microcirculatoires, de la perfusion myocardique, de l'oxygénation et des indices de contractilité [32].

D'autres preuves indirectes du bénéfice d'une perfusion pulsatile ont été rapportées grâce à des mesures de perfusion tissulaire par laser Doppler par de nombreux investigateurs [41-47]. Ces mesures effectuées le plus souvent dans les territoires splanchniques ont toutes été favorables à l'utilisation d'une perfusion pulsatile. Cette technique de mesure indirecte de la perfusion digestive a permis également de démontrer la diminution significative de la perfusion tissulaire de la muqueuse gastrique au cours de CEC hypothermique non pulsée chez des patients opérés de pontages aortocoronariens [48].

3.3. Syndrome inflammatoire, dommage endothélial et cellulaire : impact de la pulsatilité

Au-delà de ces preuves directes ou indirectes de la qualité de la perfusion dans la microcirculation, l'intérêt d'une perfusion pulsée peut s'apprécier par de nombreux autres marqueurs témoignant du métabolisme ou de la souffrance cellulaire. Shepard a utilisé la consommation d'oxygène comme indicateur de la perfusion tissulaire au cours de CEC expérimentales pulsées et non pulsées [49] ; une extraction plus importante d'oxygène et de lactate et moins de variations du pH ont été observées au cours des CEC pulsées.

De nombreux marqueurs inflammatoires ont été également mesurés. Watarida a constaté qu'une CEC pulsée chez des patients opérés de pontages aortocoronariens atténuait significativement la production d'endotoxine circulante comparativement aux patients ne bénéficiant pas d'une CEC pulsée [35]. Cette augmentation a été notée durant le clampage aortique ce qui suggère que pendant cette période de non activité cardiaque native, la présence d'une pulsatilité résiduelle fournie par la pompe de CEC dans l'appareil circulatoire, a une importance clinique significative. Orime et Sezai ont comparé la CEC pulsée et non pulsée en terme de production de cytokines, catécholamines, endothéline et de fonction rénale et pulmonaire chez des patients admis pour revascularisation coronarienne chirurgicale [17,50]. Les résultats ont démontré que la CEC pulsée réduit la production de catécholamines et la réponse inflammatoire (interleukine IL-8) pendant et après la CEC sans par ailleurs observer de préjudice significatif en terme d'hémolyse. Le dommage endothélial a été évalué par la production d'endothéline (ET-1) qui est un peptide notoirement vasoconstricteur largement présent dans tout l'organisme et dont la surproduction par les cellules endothéliales sous l'influence des cytokines, endotoxines, shear stress et hypoxie peut endommager la microcirculation [51]. La perfusion pulsatile a permis de limiter l'élévation d'ET-1 constatée au décours de l'intervention et en rapport avec la production d'IL-8. L'index respiratoire de ces patients a également été amélioré [50] témoignant d'échanges gazeux alvéolaires plus performants. Cet effet bénéfique est probablement à rapporter à la moindre élévation d'IL-8 connue pour être impliqué dans la séquestration et l'activation des neutrophiles pulmonaires, avec comme conséquence clinique le syndrome de détresse respiratoire aiguë pour forme ultime de dysfonction pulmonaire [52]. D'autres auteurs ont corrélé la préservation de paramètres fonctionnels pulmonaires ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) à la réduction de l'activation leucocytaire (élastase) grâce à l'utilisation d'une perfusion pulsatile en CEC [53]. Il est intéressant de constater que deux études comparatives de la réponse inflammatoire après CEC avec pompes centrifuges ou à galets ont montré des résultats similaires en terme d'élévation d'élastase et cytokines avec les pompes centrifuges [54,55], ce qui suggère que le « fond » de pulsatilité observée avec les pompes à galets [15,18] a possiblement

une importance physiologique [53]. L'impact endothélial de la composante pulsatile du flux, responsable de la transmission latérale de l'énergie dans les tissus, est moins connu. Néanmoins, les cellules endothéliales sont sensibles aux variations de forces mécaniques, tel le *shear stress* (contraintes de cisaillement). Ces cellules sont, in vivo, normalement exposées et présumées adaptées à un niveau normal de *shear stress* de l'ordre de 5 à 20 dyn/cm². Des études évaluant la réponse de cellules endothéliales soumises à une chute brutale du *shear stress* ont mis en évidence des réactions de dépolarisation membranaire, d'augmentation du Ca^{2+} intra cellulaire et de radicaux libres oxygénés [56]. L'élévation du Ca^{2+} intra cellulaire déclenche la libération de médiateurs vasoactifs et de médiateurs impliqués dans l'hémostase et la thromolyse [57]. Expérimentalement, Champsaur et Nakano ont rapporté que la pulsatilité, à la fois par sa fréquence et par son amplitude, stimule la production et la libération d'oxide nitrique (NO) [58,59].

4. Conclusion

Le débat sur l'intérêt de la pulsatilité en CEC n'est pas clos et son application clinique en routine n'est pas encore d'actualité. Les insuffisances de la littérature et le manque de données notamment sur l'aspect microcirculatoire entretiennent la controverse. Mais absence de preuve n'est pas preuve d'absence. Comprendre pourquoi la circulation sanguine est naturellement pulsée et quel est l'intérêt de reproduire ce chaos constitue une entreprise fascinante qui justifie toute la recherche dans ce domaine.

Références

- [1] Hooker DR. The influence of pulse pressure upon renal function. *Am J Physiol* 1910;27:24-44.
- [2] Parsons RJ, McMaster PD. The effect of the pulse upon the formation and flow of lymph. *J Exp Med* 1938;68:353-76.
- [3] McMaster PD, Parsons RJ. The effect of the pulse on the spread of substances through tissues. *J Exp Med* 1938;68:377-400.
- [4] Grover FL. The Society of Thoracic Surgeons National Database: current status and future directions. *Ann Thorac Surg* 1999;68:367-73; discussion 74-6.
- [5] Undar A. Myths and truths of pulsatile and nonpulsatile perfusion during acute and chronic cardiac support. *Artif Organs* 2004;28:439-43.
- [6] Shepard RB, Simpson DC, Sharp JF. Energy equivalent pressure. *Arch Surg* 1966;93:730-40.
- [7] Wright G. Mechanical simulation of cardiac function by means of pulsatile blood pumps. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:299-309.
- [8] Wright G. Hemodynamic analysis could resolve the pulsatile blood flow controversy. *Ann Thorac Surg* 1994;58:1199-204.
- [9] Undar A. The ABCs of research on pulsatile versus nonpulsatile perfusion during cardiopulmonary bypass. *Med Sci Monit* 2002;8:ED21-4.
- [10] Ji B, Undar A. Comparison of perfusion modes on microcirculation during acute and chronic cardiac support: is there a difference? *Perfusion* 2007;22:115-9.

- tissue oxygenation and blood flow. *Ann Thorac Surg* 1997;64:163-70.
- [49] Shepard RB, Kirklin JW. Relation of pulsatile flow to oxygen consumption and other variables during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969;58:694-702 *passim*.
- [50] Sezai A, Shiono M, Nakata K, Hata M, Iida M, Saito A, et al. Effects of pulsatile CPB on interleukin-8 and endothelin-1 levels. *Artif Organs* 2005;29:708-13.
- [51] te Velthuis H, Jansen PG, Hack CE, Eijssman L, Wildevuur CR. Circulating endothelin in cardiac operations: influence of blood pressure and endotoxin. *Ann Thorac Surg* 1996;61:904-8.
- [52] Fujishima S, Sasaki J, Shinozawa Y, Takuma K, Hori S, Aikawa N. Interleukin 8 in ARDS. *Lancet* 1993;342:237-8.
- [53] Driessen JJ, Dhaese H, Fransen G et al. Pulsatile compared with nonpulsatile perfusion using a centrifugal pump for cardiopulmonary bypass during coronary artery bypass grafting. Effects on systemic haemodynamics, oxygenation, and inflammatory response parameters. *Perfusion* 1995;10:3-12.
- [54] Ashraf S, Butler J, Tian Y, Cowan D, Lintin S, Saunders NR, et al. Inflammatory mediators in adults undergoing cardiopulmonary bypass: comparison of centrifugal and roller pumps. *Ann Thorac Surg* 1998;65:480-4.
- [55] Baufreton C, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, Vonk A, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *Ann Thorac Surg* 1999;67:972-7.
- [56] Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L529-33.
- [57] Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 2001;81:1415-59.
- [58] Nakano T, Tominaga R, Morita S, Masuda M, Nagano I, Imasaka K, et al. Impacts of pulsatile systemic circulation on endothelium-derived nitric oxide release in anesthetized dogs. *Ann Thorac Surg* 2001;72:156-62.
- [59] Champsaur G, Vedrinne C, Martinot S, Tronc F, Robin J, Ninet J, et al. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor during pulsatile bypass: experimental study in the fetal lamb. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:738-44;discussion 44-5.

ARTICLE 3

In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2011 Nov;142(5):1254-62. Epub 2011 Aug 16.

Frederic Pinaud^a, Laurent Loufrani^b, Bertrand Toutain^b, Diane Lambert^b,
Lionel Vandekerckhove^b, Daniel Henrion^b and Christophe Baufreton^{a,c,d}

a – Service de Chirurgie Cardiaque, CHU d'Angers, Angers, France;

b – UMR CNRS 6214 – INSERM 771, Université d'Angers, Faculté de Médecine d'Angers, France.

c – Université d'Angers Angers, France

d – Université Nantes Angers Le Mans (UNAM), Nantes, France.

RESUME

La pulsatilité est un puissant régulateur du tonus et de la structure des artères élastiques. Cependant, les artères de résistances restent soumises à un régime pulsatile sans que son effet soit encore bien compris. La circulation extracorporelle utilisée en chirurgie cardiaque est souvent associée à une absence de pulsatilité ce qui peut altérer le tonus myogénique. Afin de définir le rôle de la paroi vasculaire dans le processus inflammatoire résultant de la présence ou l'absence de pulsatilité, nous avons étudié ex-vivo, des artères de résistance en présence ou l'absence de pulsatilité, en mesurant la réactivité vasculaire, le stress oxydatif et l'inflammation dans la paroi vasculaire.

Des artères de résistances mésentériques de rat ont été isolées et montées sur un artériographe et soumises in-vitro à un régime pulsatile ou non. Les artères étaient perfusées avec un soluté salé physiologique sans cellules circulantes. Après 180 minutes, la dilatation au flux était augmentée et le tonus myogénique était diminué sur les artères soumises à une pulsatilité. En l'absence de pulsatilité, les radicaux oxygénés et les marqueurs de l'inflammation (MCP-1 and TNF-alpha) étaient plus élevés par rapport au niveau de référence. Sur les lits mésentériques perfusés dans des conditions similaires, TNF-alpha était plus élevé après 180 minutes en l'absence de pulsatilité (5.7 ± 1.6 pg/ml vs. 1.1 ± 0.4 pg/ml avec pulsatilité; $p < 0.01$). Sur les artères traitées avec l'antioxydant TEMPOL, la dilatation au flux et le tonus myogénique étaient similaires sur les artères pulsées et non pulsées ; les niveaux d'expression de MCP-1 et NFkb n'étaient pas augmentés dans les artères non pulsées traitées par TEMPOL.

L'absence de pulsatilité dans les artères de résistances augmente le stress oxydatif, produisant un phénomène inflammatoire avec altération du tonus myogénique et dilatation flux dépendante qui ont un rôle majeur dans le contrôle du flux sanguin local.

In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries

Frédéric Pinaud, MD,^a Laurent Loufrani, PhD,^b Bertrand Toutain, MS,^c Diane Lambert, PhD,^a Lionel Vandekerckhove, BSc,^c Daniel Henrion, PharmD, PhD,^{a,d} and Christophe Baufreton, MD, PhD, FETCS^{a,c,e}

Objective: Resistance arteries remain subject to pulsatility, a potent regulator of large elastic artery tone and structure, but the effect is incompletely understood. Extracorporeal circulation during cardiac surgery is often associated with absence of pulsatility, which may affect vascular tone. To define the role of the vascular wall in the inflammatory process that may occur with or without pulsatility, we studied resistance arteries functions *ex vivo*. We measured vascular reactivity, oxidative stress, and inflammation in the arterial wall.

Methods: Isolated rat mesenteric resistance arteries were mounted in an arteriograph and subjected to pulsatility or not *in vitro*. Arteries were perfused with a physiologic salt solution without circulating cells.

Results: After 180 minutes, flow-mediated dilation was higher and pressure-induced myogenic tone lower in arteries subjected to pulsatility. Without pulsatility, reactive oxygen species and markers of inflammation (monocyte chemoattractant protein 1 and tumor necrosis factor α) were higher than baseline. In perfused mesenteric beds under similar conditions, tumor necrosis factor α was higher in perfusate after 180 minutes of nonpulsatility (5.7 ± 1.6 pg/mL vs 1.1 ± 0.4 pg/mL; $P < .01$). In arteries treated with the antioxidant 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (tempol), flow-mediated dilation and myogenic tone were similar in nonpulsatile and pulsatile arteries; monocyte chemoattractant protein 1 and nuclear factor κ B expression levels were not increased in tempol-treated nonpulsatile arteries.

Conclusions: Absence of pulsatility in resistance arteries increased oxidative stress, which in turn induced inflammation and preferentially altered pressure and flow-dependent tone, which play a key role in control of local blood flow. (J Thorac Cardiovasc Surg 2011;142:1254-62)

Cardiopulmonary bypass (CPB) is used in cardiac surgery to allow interventions to proceed in a bloodless and non-beating operative field. Although this surgical procedure these days is well standardized, the potential benefit and the precise role of pulsatile flow in CPB remain a matter of debate. It is difficult to assess the clinical impact of pulsatile CPB because of the lack of a precise definition and techniques. Observational studies have reported some benefits of pulsatile CPB with respect to hormonal metabolism and postoperative outcome. Prospective randomized trials are still needed, however, for better definition of the effects

of pulsatile flow during CPB and aortic crossclamping.¹ We previously compared the inflammatory responses of patients undergoing coronary artery bypass grafting with either a roller pump or a centrifugal pump delivering nonpulsatile flow.² We found that the terminal complement complex activation and elastase circulating blood level were both increased with use of the centrifugal pump as opposed to the conventional roller pump.³ Such results have been observed by other researchers but to this date remain unexplained.⁴ A recent study has shown that the continuous-flow left ventricular assist device (LVAD) improves end-organ renal and hepatic function in patients with advanced heart failure⁵; however, controversy exists because a higher gastrointestinal bleeding rate has been reported among recipients of nonpulsatile LVADs than among those receiving pulsatile LVADs.⁶

Quantification of pulsatility during CPB is a key issue, especially because the arterial pressure tracing does not necessarily reflect the energy transmitted to the vascular wall.⁷ Although quantification of pulsatility remains controversial, it is now well established that pulsatile flow remains present in even the smallest arterioles.⁸ Indeed, pulsatile perfusion allows efficient exchange between the vascular and extravascular compartments, thus improving cellular metabolism. Although pulsatility is important for proper blood perfusion, excessive pulsatility is associated with an

From the Centre Hospitalier Universitaire d'Angers,^a Angers, France; Centre National de la Recherche Scientifique,^b Paris, France; Université d'Angers,^c Angers, France; INSERM,^d Angers, France; and Université Nantes Angers Le Mans (UNAM),^e Nantes, France.

Supported in part by a grant from the French Foundation for Medical Research (FRM, Fondation pour la Recherche Médicale, Paris, France). F.P. was supported by a grant from the French Federation of Cardiology (FFC, Fédération Française de Cardiologie, Paris, France).

Disclosures: C.B. has received invitations to be a contributor for Medtronic, Inc, Minneapolis, Minn.

Received for publication Dec 3, 2010; revisions received April 23, 2011; accepted for publication July 11, 2011; available ahead of print Aug 16, 2011.

Address for reprints: Christophe Baufreton, MD, PhD, FETCS, Department of Cardiac Surgery, University Hospital of Angers, 49933 Angers Cedex, France (E-mail: chbaufreton@chu-angers.fr).

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2011 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2011.07.007

Abbreviations and Acronyms

CPB	= cardiopulmonary bypass
FMD	= flow-mediated dilation
LVAD	= left ventricular assist device
MCP-1	= monocyte chemotactic protein 1
MRA	= mesenteric resistance artery
NF κ B	= nuclear factor κ B
PSS	= physiologic salt solution
ROS	= reactive oxygen species
TBST	= Tris-buffered saline solution with Tween
TNF α	= tumor necrosis factor α

increased risk of cardiovascular events.⁹ On the other hand, a beneficial effect of pulsatile pressure or flow relative to steady flow has been suggested by *in vitro* studies, mainly in cultured cells. Shear stress alone stimulates release of vasorelaxing mediators and enhances endothelial survival. Endothelial cell stretch also stimulates nitric oxide release.¹⁰ Although pulsatile flow may exert a protective effect, no experiments have yet been conducted in small (resistance) arteries involved in the local control of blood flow. In resistance arteries, myogenic tone plays a key role in determining sustained vasoconstrictor tone.¹¹ Myogenic tone is a vasoconstriction induced by pressure in arterioles. It relies on stretch-dependent calcium entry followed by *Ras* homolog gene family, member A–dependent sensitization of the contractile apparatus to calcium. In the kidney, the level of contraction obtained in response to a rise in pulsed pressure in preglomerular arterioles is determined by the systolic pressure, not by the mean pressure; this finding reinforces the assumption that pulsatility is essential in the control of microvascular tone.¹¹ The second key issue in the control of local blood perfusion is dilation mediated by flow (shear stress) involving the production of vasoactive agents by the endothelium. Flow-mediated dilation (FMD) in resistance arteries opposes myogenic tone, thus determining a sustained basal tone.¹¹ Unlike myogenic tone, arterial responses to flow are sensitive to mechanical forces.¹² We therefore hypothesized that pressure-induced myogenic tone and FMD are both most probably sensitive to changes in pulsatility. We also aimed to investigate the involvement of inflammatory factors and reactive oxygen species (ROS) in the changes in vascular tone that are associated with reduced pulsatility.

MATERIALS AND METHODS**Arteries and Study Groups**

Four-month-old adult Wistar male rats were anesthetized with isoflurane (5%) and humanely killed with inhaled carbon dioxide. The mesentery was then removed to isolate the mesenteric resistance arteries (MRAs). A

segment of MRA approximately 200 μ m in external diameter was cannulated at both ends and mounted in a video-monitored perfusion system as previously described.¹³ Briefly, cannulated arterial segments were bathed in a 5-mL organ bath containing a physiologic salt solution (PSS) of the following composition: 135.0-mmol/L sodium chloride, 15.0-mmol/L sodium hydrogen carbonate, 4.6-mmol/L potassium chloride, 1.5-mmol/L calcium chloride, 1.2-mmol/L magnesium sulfate, 11.0-mmol/L glucose, and 10.0-mmol/L, N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N-2'-ethylsulfonic acid. The pH was maintained at 7.4, the P O_2 at 160 mm Hg, and the P CO_2 at 37 mm Hg. Arteries were subjected to a pressure of 50 mm Hg. Arterial diameter was measured and recorded continuously with a video monitoring system (Living System Instrumentation Inc, Burlington, Vt). Pressure and flow rate could be changed independently. A rolling pump was connected to the tubing upstream of the artery to generate pulsatility (300 beats/min; Figure 1). *In vivo* carotid artery pulsatility (Figure 1, A) was compared with the pulsatility measured *in vitro* in the rat model (Figure 1, B). Arteries were subjected to pulsatile or nonpulsatile conditions (nonpulsatile control) for 30 to 180 minutes. Endothelial and smooth muscle cells functions were then studied, as were biochemical and immunohistochemical factors.

Arterial Tone

Pressure-mediated myogenic tone and FMD were determined as previously described elsewhere.¹⁴ In brief, diameter changes at equilibrium were measured when intraluminal pressures were set at 10, 25, 50, 75, 100, 125, and 150 mm Hg. Arteries were then subjected to 50 mm Hg of pressure and further contracted with phenylephrine (1 μ mol/L). Intraluminal flow was then increased by steps (from 0 to 100 μ L/min), and the diameter was measured to determine FMD.¹⁴ At the end of each experiment, arteries were perfused and superfused with a calcium-free PSS containing ethylene glycol tetraacetic acid (2 mmol/L) and sodium nitroprusside (100 μ mol/L). Pressure steps (from 10 to 150 mm Hg) were then repeated to determine the passive diameter of the vessel in the absence of smooth muscle tone. Diameter measurements made in normal PSS were considered to represent the diameter under active tone, or the active diameter. Pressure and diameter measurements were collected with a Biopac data-acquisition system (Biopac MP 100; BIOPAC Systems, Inc, Goleta, Calif) and analyzed (Acqknowledge software; BIOPAC Systems). Myogenic tone was calculated as the percentage of passive diameter, and FMD was expressed as the percentage dilation of active tone.¹⁴

Perfused Whole Mesenteric Bed and Measurement of Tumor Necrosis Factor α in Perfusate

Rats were anesthetized with isoflurane (5%). The abdomen was opened, and the superior mesenteric artery was cannulated with polyethylene 90 tubing. Heparinized saline solution was flushed through the mesenteric vascular bed. The vascular bed was then dissected free from the intestine along the intestinal wall and placed in an organ bath maintained at 37°C; it was then perfused and superfused with the PSS described previously at a rate of 2 mL/min. Pulsatility was generated with the rolling pump as described previously in the perfused arteries. The preparation was allowed to equilibrate for 45 minutes before experimentation began. The PSS was then collected after 30, 90, or 180 minutes of perfusion with or without pulsatility. Perfusate tumor necrosis factor α (TNF α) concentration was measured with a commercially available kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Mich).

Western Blot Analyses of Monocyte Chemotactic Protein 1 and Nuclear Factor κ B

Western blot analyses of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1, an endothelial activation marker) and nuclear factor κ B (NF κ B) were performed in MRAs as previously described elsewhere.¹² The MRAs (8 rats per group) were homogenized with a lysis buffer (1% sodium dodecyl sulfate, 10-mmol/L tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride at pH

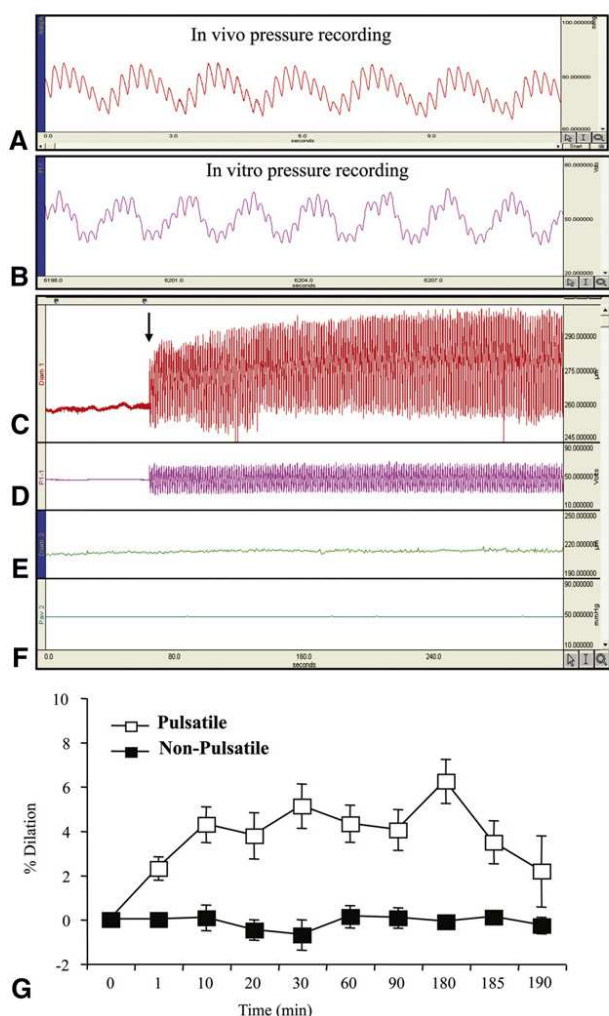


FIGURE 1. Typical recording showing blood pressure measurements obtained in vivo in the carotid artery (A) and those obtained in a mesenteric resistance artery perfused in vitro in an arteriograph and subjected to pulsatility (B). When pulsatility was started (arrow, C), pulsatility was detectable both on the diameter recording (C) and on the pressure recording (D). Corresponding control recordings (artery without pulsatility) are shown for diameter (E) and pressure (F). The lower panel (G) shows diameter changes in response to pulsatility (red trace) relative to nonpulsatile arteries. Pulsatility was maintained for 180 minutes. Data are presented as mean \pm SEM (n = 10 rats per group).

7.4, 1-mmol/L sodium orthovanadate, 2.5-mg/L leupeptin, and 5-mg/L aprotinin). Extracts were incubated at 25°C for 30 minutes and then centrifuged (1000 g, 15 minutes, 14°C). Protein concentration was determined with the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce; Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, Ill). After denaturation at 100°C for 5 minutes, equal amounts of proteins (15 μ g) were loaded on a 9% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes for 12 hours (40 V, 4°C). Membranes were blocked with 10% bovine serum albumin in Tris-buffered saline solution with Tween (TBST, 20-mmol/L tris[hydroxymethyl]aminomethane at pH 8.0, 150-mmol/L sodium chloride, and 0.1% polysorbate 20) for 1 hour and were then incubated with anti-MCP-1 (1/100; BD Pharmingen.) and anti-NF κ B (1/100 BD Pharmingen; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) antibodies for 1 hour at room temperature. After 3 washes with TBST, immunocomplexes were

detected by chemiluminescent reaction (ECL-kit; GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) with a computer-based imaging system (Fuji LAS 1000 plus; FUJIFILM Medical Systems USA, Inc, Stamford, Conn). Quantification was performed by densitometric analysis.

Detection of ROS by Confocal Microscopy in MRAs

ROS detection was performed on transverse cross sections 7- μ m thick with dihydroethyidine and microfluorescopy, as previously described elsewhere.¹⁵ Eight different arteries from 8 different rats were used in each group. Fluorescence of the wall after incubation with dihydroethyidine was measured with confocal microscopy to allow quantification with QED image software (Solamere Technology Group Inc, Salt Lake City, Utah). At least 5 measurements were performed per slice and averaged, and at least 5 slices were analyzed per artery.

Immunofluorescence Analysis

Segments of MRAs (n = 6 rats per group) were mounted in embedding medium (Sakura Finetek USA, Inc, Torrance, Calif), frozen in isopentane that had been cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C in 7- μ m thick cross sections. Sections were incubated with anti-TNF α antibodies (1/100 sc1351; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, Calif) or anti-MCP-1 antibodies (1/100 554444 BD Pharmingen; Becton Dickinson). Control experiments were performed after incubation without the first antibody, and positive experiments were performed with arterial sections from rats treated with lipopolysaccharide.¹⁵ Fluorescence staining was then visualized with confocal microscopy (Solamere Technology), followed by pixel quantification as previously described elsewhere.¹⁵ At least 5 measurements were performed per slice and averaged, and at least 5 slices were analyzed per artery.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Significance of differences between groups was determined by analysis of variance (1-factor analysis of variance or analysis of variance for consecutive measurements as appropriate).

Animal Care

The procedures followed in the care and humane killing of the study animals were all in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Agriculture, France, authorization 6422).

RESULTS

In isolated rat MRAs, pulsatile pressure (Figure 1, D) induced significant dilation (Figure 1, C). In the time control experiment, no significant change in diameter was observed throughout the duration of the experiment (Figure 1, E-F). When pulsatility was stopped after 180 minutes, arterial diameter returned to baseline (Figure 1, G). Stepwise increases in flow (shear stress) induced progressive dilation (Figure 2, A), and stepwise increases in pressure induced contraction or myogenic tone (Figure 2, B). FMD was significantly lower (P < .01) under nonpulsatile conditions than in arteries subjected to pulsatility for 180 minutes. No difference was observed between pulsatile and nonpulsatile conditions after 30 minutes (Figure 2, A). In contrast, myogenic tone was significantly higher in the absence of pulsatility after 180 minutes but not after 30 minutes (P < .05; Figure 2, B). In the absence of pulsatility,

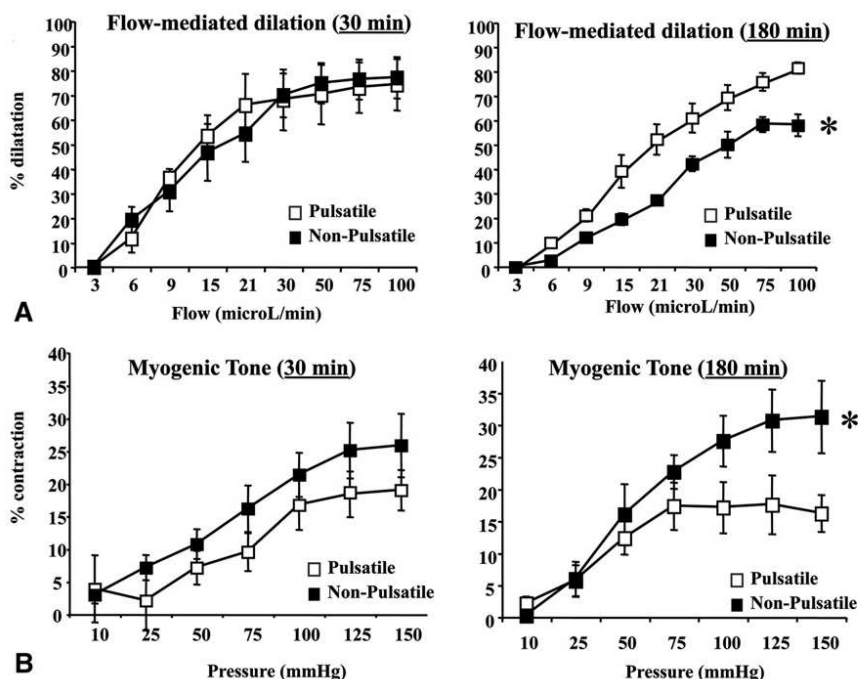


FIGURE 2. Flow-mediated dilation (A) and myogenic tone (B) in mesenteric resistance arteries subjected to pulsatile (P) or nonpulsatile (NP) conditions for 30 (left panel) or 180 (right panel) minutes. Data are presented as mean ± SEM (n = 10 rats per group). Asterisk indicates P < .01 for pulsatile versus nonpulsatile conditions.

a significant ROS level (which was higher after 180 minutes than after 30 minutes) was found in the arterial wall ($P < .05$). No significant amounts of ROS were detected in arteries subjected to pulsatility (Figure 3). With immunohistochemical methods, we found that MCP-1 (Figure 4, A) and TNF α (Figure 4, B) productions were significant in arteries subjected to nonpulsatile conditions after 180 minutes but not after 30 minutes. Under nonpulsatile conditions for 90 and 180 minutes, the quantity of TNF α in the perfusate of whole mesenteric arterial beds was significantly increased ($P < .05$) relative to that seen under pulsatile conditions (Figure 4, C). In arteries treated in advance with the antioxidant 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (tempol), pulsatility induced dilation (Figure 5, A). After incubation in the presence of tempol for either 30 or 180 minutes, FMD and myogenic tone were similar between arteries subjected to pulsatile and nonpulsatile conditions (Figure 5, B and C). In the presence of tempol, the increases in MCP-1 and NF κ B protein levels otherwise associated with the absence of pulsatility were not observed (Figure 5, D and E).

DISCUSSION

This is the first time that a study has identified a mechanism for the alteration in vascular reactivity induced by the absence of pulsatility in isolated resistance arteries. We found that the oxidative stress that was induced initially was followed by inflammation and changes in vascular

tone, with increased myogenic tone and reduced FMD, thus favoring alteration in blood flow. The experimental setup we used allowed the arteries to be subjected to pulsatile or nonpulsatile conditions while controlling pressure and flow and also eliminating any influences of circulating cells and surrounding tissues. Under these conditions, changes occurring in the absence of pulsatility could be attributable only to a response in the vascular wall. This provides new insights into the systemic inflammatory response seen after cardiac surgery, which has generally been believed to be a process generated by blood cell activation.¹⁶

Controversial findings have been described in clinical trials.¹⁷ Some authors have reported that pulsatile CPB improves postoperative outcome, whereas others consider that linear flow might be well tolerated in clinical practice. In particular, clinical experiences with patients in whom pulseless LVADs (which provide totally linear flow) have been implanted support this belief.⁵ There are marked differences, however, between the clinical and surgical settings of patients with LVADs and those of patients undergoing routine CPB for cardiac surgery.¹⁸ It is important to isolate the effects of the absence of pulsatility in the surgical contexts in which various protocols and devices (pumps, oxygenators, filter, etc) may be used.¹⁹ This persistent controversy led us to study the effect of pulsatility alone in isolated arteries in vitro.

First, we found that FMD was selectively reduced and that myogenic tone was higher in arteries exposed to



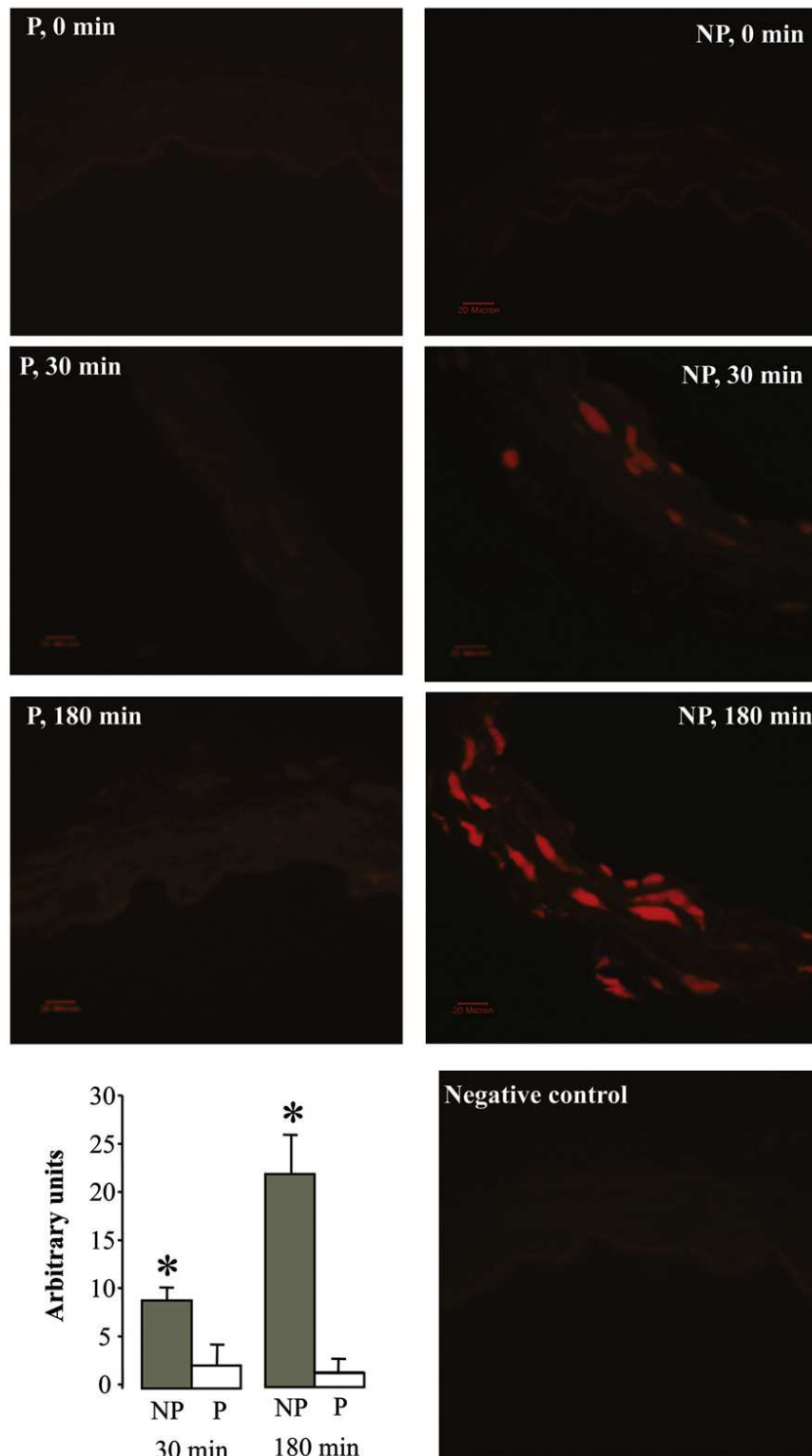


FIGURE 3. Reactive oxygen species (ROS) detection with dihydroethyidine (DHE). Reactive oxygen species level was determined in mesenteric resistance arteries subjected to pulsatile (P) or nonpulsatile (NP) conditions for 0, 30, or 180 minutes. Data are presented as mean \pm SEM (n = 10 rats per group). Asterisk indicates $P < .01$ for pulsatile versus nonpulsatile conditions.

nonpulsatile conditions for 3 hours. These changes in vascular reactivity argue in favor of a vasospastic phenotype. Because myogenic tone and FMD are sensitive to ROS

production, we measured ROS concentrations in the arteries subjected to pulsatile or nonpulsatile conditions. Indeed, a rise in ROS production in both endothelial and

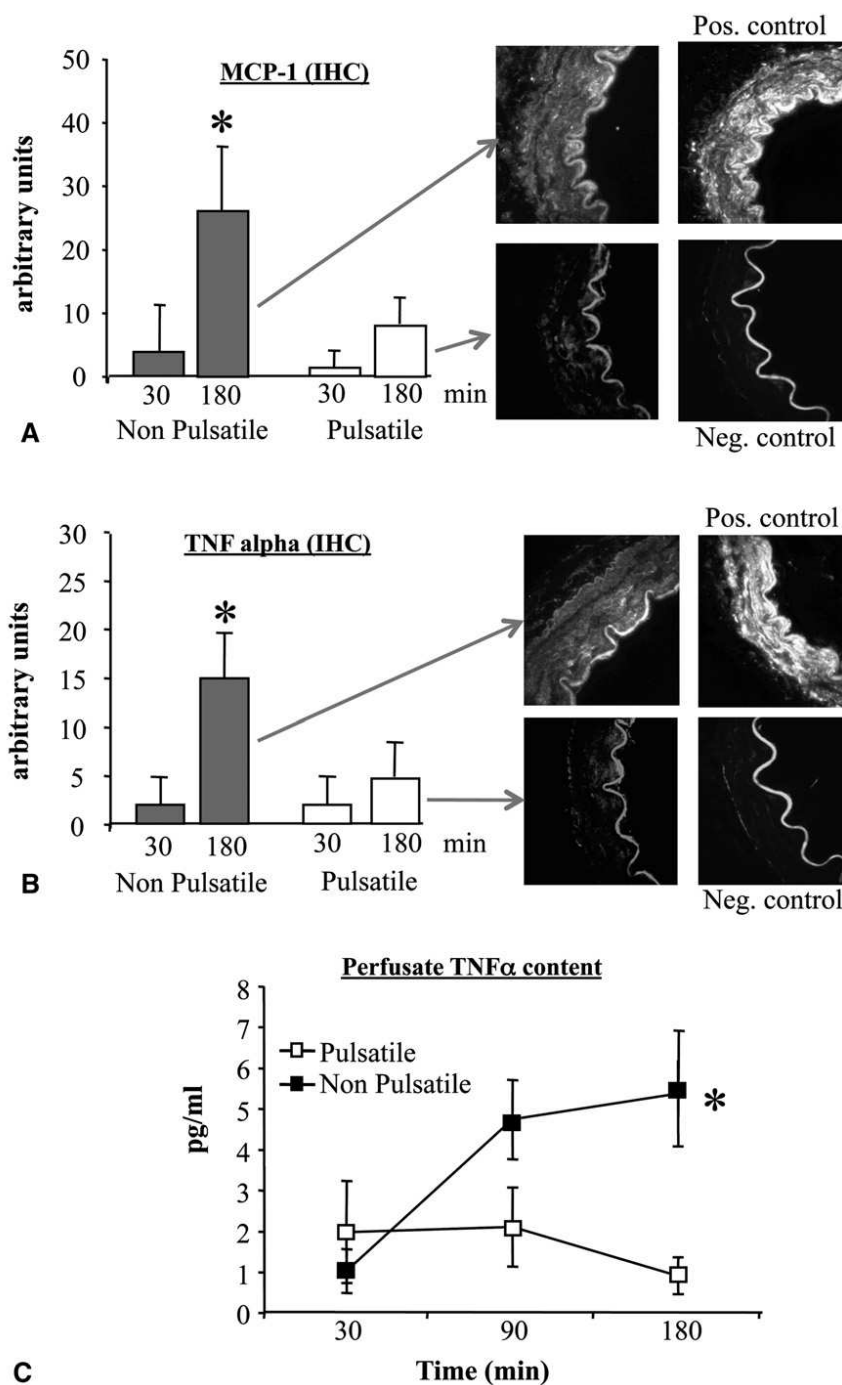


FIGURE 4. Monocyte chemotactic protein 1 (*MCP-1*, A) and tumor necrosis factor α (*TNF α* , B) levels were determined with immunohistochemical methods (*IHC*) in mesenteric resistance arteries subjected to pulsatile or nonpulsatile conditions for 30 or 180 minutes. Typical images are shown on the left side. Positive (*Pos.*) and negative (*Neg.*) controls are shown for each protein. Tumor necrosis factor α level was then measured in the perfusate of whole mesenteric arterial beds perfused under pulsatile or nonpulsatile conditions (C). Perfusate was collected after 30, 90, and 180 minutes. Data are presented as mean \pm SEM (n = 10 rats per group). Asterisk indicates $P < .01$ for pulsatile versus nonpulsatile conditions.

smooth muscle cells might be the cause of the vasospasticity observed in nonpulsatile arteries. Myogenic tone and FMD both play key roles in the control of local blood flow, especially in organs with tightly controlled blood flow autoregulation. In the cerebral circulation, for

example, myogenic tone and FMD closely interact to control blood flow.²⁰ We have shown that myogenic tone and FMD were affected (increased and reduced, respectively) at a very early stage in CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and



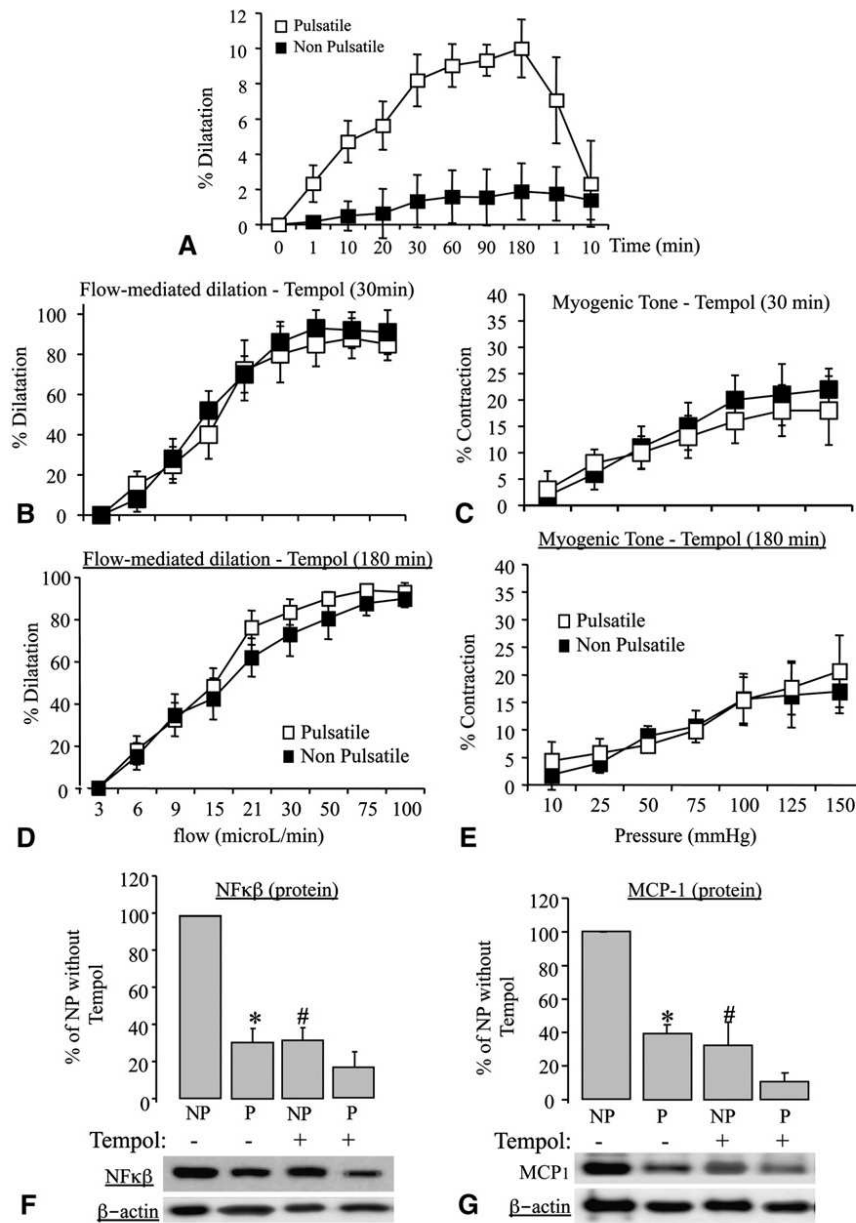


FIGURE 5. Effect of treatment with the antioxidant tempol on pulsatility-induced dilation (A), on flow-mediated dilation (B and D), and on myogenic tone (C and E). Nuclear factor κ B (*NFκB*, F) and monocyte chemoattractant protein 1 (*MCP-1*, G) protein levels were measured in arterial walls subjected to pulsatile (P) or nonpulsatile (NP) conditions in the presence or absence of tempol. Flow-mediated dilation and myogenic tone were determined after 30 (B and C) or 180 (D and E) minutes. Protein level was determined with Western blot analysis. Data are presented as mean \pm SEM (n = 10 rats per group). Asterisk indicates $P < .01$ for pulsatile versus nonpulsatile conditions. Hash mark indicates $P < .01$ for the effect of tempol.

leukoencephalopathy) syndromes, which are characterized by reduced blood flow to the brain and eventually by irreversible dementia.²¹ Similarly, FMD is the hallmark of endothelial disorders with a reduced dilatory response, occurring at an early stage in most cardiovascular and metabolic diseases that are associated with vascular dysfunction.²² The hypothesis that an excessive production of ROS might increase myogenic tone and reduce FMD is strongly supported by our data, which show that treating arteries with the antioxidant tempol could prevent the

changes in vascular reactivity induced by different pulsatile conditions. We also found inflammatory factors (*MCP-1*, *TNFα*, and *NFκB*) in arteries subjected to nonpulsatile conditions. To confirm this inflammation, we measured the production of *TNFα* in the perfusate of a whole mesenteric bed and found it to be significantly elevated in the absence of pulsatility. These findings are in agreement with those of a previous study conducted in patients undergoing coronary artery bypass grafting, which showed that endotoxemia (caused by bacterial

translocation from splanchnic hypoperfusion and injury) was increased in patients undergoing nonpulsatile CPB.²³ It is interesting that this elevation was more pronounced during aortic crossclamping than throughout the duration of CPB itself, because the native pulsatility from the beating heart was completely abolished by cardioplegic arrest. The residual pulsatile flow in this condition was provided only by the arterial pump used for CPB. This is a condition that is not encountered during long-term circulatory support,¹⁸ because the heart does not need to be arrested as it is during heart surgery. This may explain the fairly good results with respect to end-organ function, such as those recently published by Russell and colleagues,⁵ when native pulsatile oscillatory activity generated by the beating (although not working) heart is still present in recipients of nonpulsatile LVAD. Onorati and colleagues²⁴ have reported on a series of clinical studies maintaining the use of an intra-aortic balloon pump during aortic crossclamping in CPB in critically ill patients. They found that some intra-aortic balloon pump-induced pulsatile perfusion during this critical period was associated with a reduction in inflammatory response (particularly MCP-1) relative to that observed after nonphysiologic linear perfusion.²⁴ The oscillatory energy provided by pulsatile flow may protect the endothelial cells, which are normally exposed and presumably adapted to a normal level of shear stress in the range of 5 to 20 dyn/cm².²⁵ Following this reasoning, the inflammatory response would be generated at the endothelial level, which is consistent with our results reported here. Until now, the surgical literature has considered the inflammatory response to be a blood cell and plasma activation process, with subsequent microcirculatory injury. We found that pulsatility in itself was protective. In the absence of flow, the residual pulsatility imposed by the roller pump was sufficient to prevent the changes in myogenic tone and FMD that were seen in the absence of pulsatility. Similarly, in no-flow conditions but with pulsatility, ROS, MCP-1, TNF α , and NF κ B were not found in arteries even after 3 hours. Steady shear stress activates phosphoinositide-3 kinase, leading to phosphorylation and activation of Akt in isolated cells.²⁶ Activated Akt in turn phosphorylates nitric oxide synthase, contributing to sustained nitric oxide release and stimulating kinases and transcription factors to increase cytoprotection.²⁶ Cyclic stretch also enhances Akt activity,²⁷ and when both stimuli are combined, as with pulsatile perfusion in a compliant conduit, Akt and nitric oxide synthase phosphorylation are further increased.²⁸

Finally, we found that inflammation could be detected after 3 hours in the arterial wall or after 90 minutes in the perfusate, whereas ROS levels were significantly elevated after 30 minutes in the absence of pulsatility. This finding suggests that ROS production might precede and possibly even induce inflammation. This speculation is confirmed

by our data showing that the treatment of the arteries with an antioxidant prevented the rise in ROS level and inflammation within the mesenteric arteries. Thus ROS production induced by the absence of pulsatility in turn induced both inflammation and a change in vascular reactivity in favor of vasospasm. Nevertheless, our study does not allow involvement of the inflammatory response in the change in vascular reactivity. Indeed, inflammation is rather known to induce vasodilatation.

References

- Alghamdi AA, Latter DA. Pulsatile versus nonpulsatile cardiopulmonary bypass flow: an evidence-based approach. *J Card Surg.* 2006;21:347-54.
- Baufreton C, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, Vonk A, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:972-7.
- James SA, Peters J, Maresca L, Kalush SL, Trigueros EA. The roller pump does produce pulsatile flow. *J Extra Corpor Technol.* 1987;19:376-83.
- Ashraf S, Butler J, Tian Y, Cowan D, Lintin S, Saunders NR, et al. Inflammatory mediators in adults undergoing cardiopulmonary bypass: comparison of centrifugal and roller pumps. *Ann Thorac Surg.* 1998;65:480-4.
- Russell SD, Rogers JG, Milano CA, Dyke DB, Pagani FD, Aranda JM, et al. Renal and hepatic function improve in advanced heart failure patients during continuous-flow support with the HeartMate II left ventricular assist device. *Circulation.* 2009;120:2352-7.
- Crow S, John R, Boyle A, Shumway S, Liao K, Colvin-Adams M, et al. Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137:208-15.
- Undar A. Myths and truths of pulsatile and nonpulsatile perfusion during acute and chronic cardiac support. *Artif Organs.* 2004;28:439-43.
- Verdant C, De Backer D. How monitoring of the microcirculation may help us at the bedside. *Curr Opin Crit Care.* 2005;11:240-4.
- Laurent S, Boutouyrie P. Arterial stiffness: a new surrogate end point for cardiovascular disease? *J Nephrol.* 2007;20(Suppl. 12):S45-50.
- Wang DS, Proffit D, Tsao PS. Mechanotransduction of endothelial oxidative stress induced by cyclic strain. *Endothelium.* 2001;8:283-91.
- Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005;98:913-21.
- Loufrani L, Henrion D. Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Med Biol Eng Comput.* 2008;46:451-60.
- Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane-induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res.* 2002;39:353-60.
- Loufrani L, Levy BI, Henrion D. Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res.* 2002;91:1183-9.
- Belin de Chantemele EJ, Vessières E, Dumont O, Guihot AL, Toutain B, Loufrani L, et al. Reactive oxygen species are necessary for high flow (shear stress)-induced diameter enlargement of rat resistance arteries. *Microcirculation.* 2009;16:391-402.
- Baufreton C, Moczar M, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using two different types of heparin-coated extracorporeal circuits. *Perfusion.* 1998;13:419-27.
- Miller LW. Is pulsatile blood flow no longer essential? *Circulation.* 2009;120:2313-4.
- Baufreton C, Kirsch M, Loisanse DY. Measures to control blood activation during assisted circulation. *Ann Thorac Surg.* 1998;66:1837-44.
- Undar A, Lodge AJ, Daggett CW, Runge TM, Ungerleider RM, Calhoun JH. The type of aortic cannula and membrane oxygenator affect the pulsatile waveform morphology produced by a neonate-infant cardiopulmonary bypass system in vivo. *Artif Organs.* 1998;22:681-6.
- Panerai RB. Cerebral autoregulation: from models to clinical applications. *Cardiovasc Eng.* 2008;8:42-59.
- Dubroca C, Lacombe P, Domenga V, Maciazek J, Levy B, Tournier-Lasserre E, et al. Impaired vascular mechanotransduction in a transgenic mouse model of CADASIL arteriopathy. *Stroke.* 2005;36:113-7.

22. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium*. 2008;15:157-63.

23. Watarida S, Mori A, Onoe M, Tabata R, Shiraishi S, Sugita T, et al. A clinical study on the effects of pulsatile cardiopulmonary bypass on the blood endotoxin levels. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;108:620-5.

24. Onorati F, Santarpino G, Tangredi G, Palmieri G, Rubino AS, Foti D, et al. Intra-aortic balloon pump induced pulsatile perfusion reduces endothelial activation and inflammatory response following cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009;35:1012-9.

25. Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281:L529-33.

26. Stegemann JP, Nerem RM. Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture. *Exp Cell Res*. 2003;283:146-55.

27. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999;71:435-78.

28. Lehoux S, Esposito B, Merval R, Tedgui A. Differential regulation of vascular focal adhesion kinase by steady stretch and pulsatility. *Circulation*. 2005;111:643-9.

DISCUSSION

Le premier travail a montré que le remodelage vasculaire dans les artères de résistances de la microcirculation est altéré par le vieillissement. Un accroissement du flux (shear stress) provoque un remodelage hypertrophique (épaississement pariétal) mais pas de remodelage expansif (dilatation de l'artère). Dans le vieillissement la réponse (dilatation) à l'acétylcholine est diminuée sans changement de l'expression de eNOS, c'est la biodisponibilité du NO qui est impliquée. Nous avons montré que chez les jeunes rats le remodelage vasculaire dépend du NO mais aussi de la production de radicaux oxygénés. Ainsi chez les vieux rats l'absence d'augmentation des ROS, combiné au déficit de la voie eNOS-NO pourrait expliquer l'absence de remodelage flux-dépendant.

Par ailleurs, l'hydralazine, traitement antihypertenseur, ayant montré dans différentes études sa capacité à améliorer le flux mésentérique et l'amélioration du remodelage artériel, a restauré un remodelage flux-dépendant chez les vieux rats ainsi qu'une diminution de la masse pariétale, avec donc un double effet d'augmentation du diamètre et régression de l'hypertrophie. A noter que l'hydralazine à faible dose permet d'améliorer le flux sans modification de la pression artérielle. De plus la restauration du remodelage flux-dépendante par l'hydralazine est indépendante de la voie eNOS mais est associée chez les vieux rats à une voie ROS-dépendante. Le vieillissement entraîne une production de radicaux oxygénés qui peuvent avoir un effet bénéfique ou délétère et sont impliqués dans l'initiation et la progression de pathologies vasculaires.

Avec le vieillissement, l'absence de remodelage expansif alors que la paroi s'épaissit, implique un risque de mauvaise perfusion microcirculatoire. Contrairement aux artères de conductances dont l'évolution se fait vers un épaississement et calcifications irréversibles, le remodelage des artères de résistances est réversible.

Le second travail a montré pour la première fois d'identification d'un mécanisme expliquant l'altération de la réactivité vasculaire provoquée par l'absence de pulsatilité dans des artères de résistance isolées. Nous avons montré qu'un stress oxydatif est d'abord provoqué puis suivi par un phénomène inflammatoire et une modification du tonus vasculaire. Il existe une augmentation du tonus myogénique et une diminution de la dilatation flux dépendante favorisant l'altération du flux sanguin.

Le modèle expérimental que nous avons décrit nous a permis de soumettre des artères de résistance mésentérique de rat dans des conditions de pulsatilité ou non, tout en contrôlant la pression et le flux indépendamment, in vivo éliminant ainsi toutes les influences des cellules sanguines circulantes et des tissus environnants comme cela existe in-vivo dans les conditions physiologiques.

Dans ces conditions, les changements survenant en l'absence de pulsatilité ont pu être attribué uniquement à la réponse de la paroi vasculaire des artères isolées. Ceci a donc permis une vision nouvelle de la réponse inflammatoire systémique rencontrée après chirurgie cardiaque, qui est habituellement montrée attribuée à un processus engendré par l'activation des cellules sanguines circulantes.¹⁰¹

Des données controversées ont été décrites dans des essais cliniques.¹⁰² Certains auteurs ont rapportés qu'une CEC pulsée améliore les résultats postopératoires, alors que d'autres considèrent qu'un flux linéaire peut être très bien toléré en pratique clinique quotidienne, en particulier chez les patients avec une assistance ventriculaire gauche de longue durée qui fournissent un flux parfaitement laminaire.¹⁰³ Cependant il existe des différences notoires entre les pratiques cliniques et chirurgicales des patients ayant une assistance ventriculaire gauche longue durée avec une activité cardiaque persistante et les patients opérés d'une chirurgie cardiaque de façon routinière pour lesquels une CEC est mise en place pour quelques minutes à quelques heures seulement avec un cœur arrêté sous clampage aortique.¹⁰⁴

C'est pour cette raison qu'il est important de séparer et isoler les effets de l'absence de pulsatilité du contexte chirurgical où des protocoles nombreux et variés (pompes, oxygénateurs, tubing, filtres, ...) peuvent être utilisés et modifier les résultats constatés.⁶² Nous avons donc pour cela voulu étudié les effets de la pulsatilité seule sur des artères isolés in-vitro.

Premièrement nous avons trouvé que la dilatation flux-dépendante était sélectivement diminuée et que le tonus myogénique était plus important chez les artères exposées pendant 3 heures à des conditions non pulsatile. Ces changements de la réactivité vasculaire sont un argument en faveur d'un phénomène de vasospasme.

Comme le tonus myogénique et la dilatation flux-dépendante sont sensibles à la production de radicaux oxygénés, nous avons mesuré la concentration de radicaux oxygénés dans la paroi vasculaire des artères soumises à une pulsatilité ou non. En effet, une augmentation de la production de radicaux oxygénés à la fois dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses pourrait être à l'origine des phénomènes de vasospasme observés dans les artères soumises à l'absence de pulsatilité. Le tonus myogénique et la dilatation flux-dépendante ont tout les deux un rôle essentiel dans le contrôle du flux sanguin local, particulièrement dans les organes nécessitant une autorégulation rigoureuse du flux sanguin. Dans la circulation cérébrale par exemple, le tonus myogénique et la dilatation flux-dépendante interviennent ensemble de façon précise pour réguler le flux sanguin.¹⁰⁵ Il a été montré que le tonus myogénique et la dilatation flux-dépendante étaient affectés (respectivement augmenté et diminuée) à un stade très précoce de la maladie CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) qui est caractérisée par une réduction du flux sanguin cérébral et potentiellement une démence irréversible.¹⁰⁶ De façon similaire la dilatation flux-dépendante est la caractéristique des perturbations endothéliales, survenant à un stade précoce de la plupart des maladies

cardiovasculaires et métaboliques qui sont associées à une dysfonction vasculaire avec une réduction de la réponse dilatatrice.¹⁰⁷

L'hypothèse qu'une production excessive de radicaux oxygénés pourrait être à l'origine de l'accroissement du tonus myogénique et de la réduction de la dilatation flux-dépendante est fortement appuyée par nos résultats qui montrent qu'un traitement par l'antioxydant TEMPOL, pouvait prévenir les changements de la réactivité vasculaire induite par les différentes conditions de pulsatilité.

Nous avons également montrés la présence de facteurs inflammatoires (MCP-1, TNFalpha, NFkB) dans la paroi des artères soumissent à des conditions non pulsatiles. Afin de confirmer ce phénomène inflammatoire, nous avons mesuré la production de TNFalpha dans le perfusa de lits mésentériques complets et nous avons trouvé qu'elle était significativement élevée en l'absence de pulsatilité. Ces constatations sont en accord avec celles, montrées précédemment dans des études menées chez des patients ayant eut une chirurgie de pontage aorto-coronarien, montrant que l'endotoxémie (provoquée par une translocation bactérienne par hypoperfusion et lésions splanchniques) était augmentée chez les patients ayant eut une CEC non pulsée.⁷⁶ Il est à noter que cette élévation était plus importante pendant le clampage aortique que pendant toute la durée de la CEC en elle même, car la pulsatilité native fournie par le cœur était complètement abolie par l'arrêt cardioplégique.

La pulsatilité résiduelle dans les conditions de clampage aortique était fourni seulement par la pompe artérielle utilisée pour la CEC. C'est une condition qui n'est pas rencontrée pendant les assistances circulatoires longues durées¹⁰⁴ car le cœur n'a pas besoin d'être arrêté comme il l'est durant les interventions de chirurgie cardiaques. Ceci peut expliquer les relativement bons résultats avec le respect de la fonction de l'organe, publiés par Russell and collègues¹⁰³ où l'activité oscillatoire pulsatile générée par les battements cardiaques (bien que non en charge) est conservée dans les assistances circulatoires longues durées non pulsées.

Onorati et collègues¹⁰⁸ ont rapportés des séries d'études cliniques maintenant l'utilisation d'un ballon de contre-pulsion intra-aortique pendant le clampage aortique pendant des CEC de patients à l'état préopératoire critique. Ils ont trouvé que la perfusion pulsée du ballon de contre-pulsion intra-aortique durant la période critique était associée à une réduction de la réponse inflammatoire, en particulier MCP-1, en comparaison à celle observée après une perfusion laminaire non physiologique.¹⁰⁸ L'énergie oscillatoire fournie par le flux pulsé pourrait préserver les cellules endothéliales, qui sont normalement exposées et adaptées à un niveau « normal » de shear stress de l'ordre de 5 à 20 dyn/cm².⁹⁷ Suivant ce raisonnement, la réponse inflammatoire serait générée au niveau endothélial, ce qui est cohérent avec nos résultats montrés dans ce travail. Jusqu'à présent la littérature chirurgicale a considérée la réponse inflammatoire comme étant une activation du plasma et des cellules sanguines, avec des lésions microcirculatoires. Nous avons montré que la pulsatilité en elle même était protectrice. En l'absence de flux, la pulsatilité résiduelle imposée par la pompe à galet était suffisante pour prévenir les modifications du tonus myogénique et la dilatation flux-dépendante constatées en l'absence de pulsatilité. De même, dans des conditions pulsatile, et sans flux, les radicaux oxygénés, MCP-1, TNF a, et NFkB n'étaient pas retrouvés dans les artères après 3 heures d'exposition. Un puissant shear stress active la phosphoinositide-3 kinase, entraînant la phosphorylation et l'activation de Akt dans les cellules isolées.¹⁰⁹ L'activation de Akt phosphoryle à son tour la nitric oxide synthase, contribuant au relargage de NO et stimulant les kinases et la transcription de facteurs augmentant la cytoprotection.¹⁰⁹ L'étirement cyclique améliore aussi l'activité Akt,¹¹⁰ et lorsque les deux stimuli sont associés, dans une perfusion pulsatile dans un vaisseau compliant, la phosphorylation de Akt et eNOS augmente encore plus.¹¹¹

Enfin nous avons montré que l'inflammation pouvait être détecté avec 180 min dans la paroi

artérielle ou après 90 min dans le perfusa de mésentères complets, alors que les radicaux oxygénés étaient significativement élevés après 30 min en l'absence de pulsatilité. Ces données suggères que la production de ROS pourrait précédée et possiblement induire le processus inflammatoire. Ceci semble confirmer par nos résultats montrant qu'un traitement des artères par un antioxydant a prévenu l'accroissement du niveau de radicaux oxygénés et l'inflammation dans les artères mésentériques. Ainsi la production de radicaux oxygénés induite par l'absence de pulsatilité induit à son tour un phénomène inflammatoire et un changement de la réactivité vasculaire dans le sens d'une vasospasme.

Ces travaux ont donc permis de montrer que le vieillissement induit un déficit de remodelage flux-dépendant des artères de résistances de la microcirculation provoquant donc une altération de la perfusion distale, mais que l'effet peut être réversible sous certaines conditions et traitements vasodilatateurs. Ces résultats sont importants à prendre en considération puisque la population concernée par les interventions de chirurgie cardiaque sont des patients âgés et donc ayant déjà avant l'intervention des altérations de la perfusion microcirculatoire.

Par ailleurs, la pulsatilité qui est un phénomène physiologique, est essentielle au maintien d'une bonne perfusion à l'échelle de la microcirculation. Son absence induit rapidement en moins de 3 heures des phénomènes inflammatoires intravasculaires avec altérations de la réactivité vasculaire. L'utilisation lors d'intervention de chirurgie cardiaque en routine, de pompes à galets pour la CEC, semble donc importante afin d'améliorer la perfusion tissulaire peropératoire et par conséquent suites opératoires. La population qui peut bénéficier le plus d'un maintien de la pulsatilité peropératoire sont les patients âgés et ce d'autant plus qu'ils présentent des pathologies associées tels le diabète ou l'hypertension artérielle comme c'est le cas la plupart du temps. Pour ces patients fragiles tous les éléments sont à prendre en compte pour la réussite d'une intervention, et l'utilisation anodine d'une pompe à galets pour la CEC doit en faire partie puisqu'elle fournit une réelle pulsatilité et donc une perfusion plus physiologique et bénéfique.

ANNEXES ET COLLABORATIONS



Mise au point

Réponse inflammatoire et perturbations hématologiques en chirurgie cardiaque : vers une circulation extracorporelle plus physiologique

Inflammatory response and haematological disorders in cardiac surgery: toward a more physiological cardiopulmonary bypass

C. Baufreton *, J.-J. Corbeau, F. Pinaud

Service de chirurgie cardiaque et département d'anesthésie-réanimation, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex 09, France

Reçu le 18 août 2005 ; accepté le 23 décembre 2005

Disponible sur internet le 20 février 2006

Résumé

La réponse inflammatoire en chirurgie cardiaque, étroitement liée aux perturbations de l'hémostase, est responsable d'une morbidité significative qui initialement avait été mise sur le compte de la circulation extracorporelle (CEC). Il apparaît aujourd'hui clairement opportun de distinguer les facteurs dépendants des matériaux de ceux qui en sont indépendants. À cet égard, la chirurgie sans CEC a permis de mieux cerner la responsabilité de chaque élément susceptible de participer à la réponse inflammatoire observée. De multiples cascades d'activation cellulaires et plasmiques sont initiées, impliquant le système du complément, les plaquettes, les neutrophiles et les monocytes. La voie tissulaire de la coagulation, par le biais du facteur tissulaire, est prépondérante et doit être prise en considération par des adaptations de la technique chirurgicale afin de diminuer le syndrome post-CEC. La qualité de la perfusion extracorporelle par son retentissement sur la microcirculation, en particulier au niveau du tube digestif, participe également à l'ensemble de ces processus physiopathologiques. Malgré les progrès technologiques proposés par l'industrie, en particulier la récente apparition de la mini-CEC dans la mouvance de la chirurgie à cœur battant, la qualité de la prise en charge chirurgicale reste fondamentale dans l'importance de cette réponse inflammatoire et ne doit plus être sous-estimée actuellement. © 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The systemic inflammatory response in cardiac surgery is closely related to the haemostasis disturbances. It is responsible of a significant morbidity and mortality that was previously suspected to be caused by cardiopulmonary bypass alone. However, it is time now to clearly identify the factors that are material-dependent from that material-independent. From this point of view, off-pump surgery allowed for better comprehension of the multiple sources of the inflammatory response. Numerous pathways are activated, involving complement, platelets, neutrophils and monocytes. The tissue pathway of the coagulation system, through tissue factor, is of major importance and has to be surgically considered in order to reduce the whole body inflammatory response postoperatively. The quality of the extracorporeal perfusion through its consequences on organ perfusion, particularly in the splanchnic area, also participates to this pathophysiological process. Beyond the progress of technology provided by the industry, particularly the minimally extracorporeal circulation derived from off-pump surgery evolution, the surgical approach is of major importance in the control of the systemic inflammatory response and must not be ignored yet. © 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Chirurgie cardiaque ; Circulation extracorporelle ; Réponse inflammatoire ; Perturbations hématologiques ; Biocompatibilité

Keywords : Cardiac surgery; Cardiopulmonary bypass; Inflammatory response; Haematological disorders; Biocompatibility

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : ChBaufreton@chu-angers.fr (C. Baufreton).

1. Introduction

La réponse inflammatoire en circulation extracorporelle (CEC) est une réalité dont la prise de conscience date d'une vingtaine d'années. La réponse inflammatoire, associée aux troubles postopératoires de l'hémostase, est responsable d'une morbidité significative en chirurgie cardiaque. Ces processus physiopathologiques sont intimement reliés, de sorte qu'il est possible de définir un syndrome biologique « post-CEC » lié à la « bio-incompatibilité » de la CEC, et que les anglo-saxons faute d'y trouver un terme précis et synthétique, ont dénommé « *Blood Activation* ». En réalité, cette expression utilisée en chirurgie cardiaque ne veut strictement rien dire, en particulier aux yeux des biologistes, probablement parce qu'elle veut en dire trop. Cette « activation sanguine », regroupe l'activation de nombreuses et différents cascades physiopathologiques humorales et cellulaires (fibrinolyse, coagulation, complément, leucocytes, plaquettes, etc.). Il n'est plus possible conceptuellement aujourd'hui de séparer l'inflammation des troubles de l'hémostase dans l'apparition des perturbations biologiques ou cliniques observées après CEC.

Assez paradoxalement cette entité clinicobiologique est de mieux en mieux cernée depuis que la chirurgie cardiaque sans CEC, c'est-à-dire la chirurgie coronaire à cœur battant, a pris une importance significative pour certaines équipes. Une récente mise au point a permis de conclure à l'absence de bénéfice majeur de cette approche chirurgicale chez les patients ayant a priori un faible risque opératoire et opérés de pontages aortocoronariens [1]. Chez les patients à risque opératoire majoré, les études randomisées ont constaté une amélioration des suites postopératoires mais avec un risque simultané de revascularisation incomplète [1]. À vrai dire le débat n'est pas clos, ne serait-ce que sur le plan de la comparaison de l'inflammation, de l'hémostase et du stress oxydatif entre ces deux approches chirurgicales [2,3]. Mais surtout, bon nombre de ces essais cliniques ont permis de mettre en évidence les carences et les pratiques inadéquates de la CEC. En effet, que penser d'une étude rapportant au sein d'un groupe de patients opérés à cœur battant un saignement peropératoire moyen de 400 ml (s'échelonnant de 50 à 1500 ml) considéré comme étant significativement plus faible ($p < 0,0001$) que celui de 400 ml (s'échelonnant de 100 à 3500 ml) observé dans un groupe de patients opérés sous CEC [4] ? La signification du p statistique devrait-elle occulter les valeurs extrêmes du saignement chirurgical chez ces coronariens, opérés sous CEC, dont 65 % furent transfusés durant l'hospitalisation ? En réalité, cette publication prise parmi d'autres reflète assez bien l'état d'esprit de la chirurgie cardiaque à la fin des années 1990.

L'information majeure qui peut être retenue de toutes ces expériences et publications depuis une dizaine d'années est que la réponse inflammatoire en chirurgie cardiaque n'est pas abolie par l'absence de surfaces artificielles, et qu'il conviendrait mieux de parler du retentissement de la chirurgie cardiaque en général, plutôt que du retentissement de la CEC, dans la mesure où les causes de l'activation du sang sont multifactorielles. La répartition entre réponse inflammatoire dépendante

des matériaux et réponse inflammatoire indépendante des matériaux apparaît donc aujourd'hui plus que pertinente.

Deux stratégies, pharmacologique et technique, peuvent être envisagées seules ou en association pour répondre à ces problèmes. La première, très en vogue dans les années 1990 tend à vouloir corriger par des substances (corticostéroïdes et aprotinine essentiellement) les perturbations biologiques importantes observées au cours de la CEC. La seconde, qui sera l'unique objet de ce propos, consiste à essayer de mieux comprendre la physiopathologie de ces complications pour en éviter l'apparition ou tout au moins pour les limiter au maximum en modifiant les techniques médicochirurgicales et en améliorant la technologie mise à la disposition des équipes.

2. Bio-incompatibilité dépendante des matériaux

Elle est sous la dépendance de phénomènes liés au contact du sang avec toute surface artificielle synthétique d'une part et avec les caractéristiques spécifiques du circuit de CEC d'autre part.

2.1. Le contact sang-matériaux

Le processus d'activation cellulaire et plasmatique dépendante des matériaux débute avec l'immobilisation de protéines telle l'albumine, le fibrinogène et l'antithrombine sur les surfaces artificielles des circuits de CEC [5–7]. Simultanément, le facteur XII du système contact (facteur Hageman) et le fragment C3 du système du complément sont activés après leur déposition à la surface du circuit. Par la suite, les plaquettes changent de forme, adhèrent au fibrinogène adsorbé à la surface du circuit de CEC, et finalement s'agrègent en quelques minutes [5,6]. L'adhésion plaquettaire est capable de déclencher l'adhésion des polynucléaires neutrophiles. La fixation initiale puis l'activation du facteur XII et du fragment C3 du complément à la surface du circuit apparaissent d'importance majeure pour initier l'activation cellulaire et plasmatique dépendante des matériaux.

Le système du complément est un mécanisme précoce dans le déclenchement et l'amplification de la réponse inflammatoire à une agression subite et comporte plus de 20 protéines. Ce système est soigneusement contrôlé par des protéines régulatrices et discerne entre le « soi » du « non-soi ». Le système du complément est activé par deux voies majeures : la voie classique est initiée par les complexes antigènes-anticorps et par les complexes héparine-protamine après la CEC, pendant que la voie alterne est déclenchée par le contact du sang sur les surfaces chargées négativement [5–7]. Ces deux voies stimulent la voie commune ou terminale qui conduit à la formation de complexes d'attaque membranaire C5b-9. Ces deux voies mènent aussi à la production d'anaphylatoxines C3a et C5a, qui ont été associées aux défaillances postopératoires cardiaque, pulmonaire et rénale [5].

Le complément peut stimuler la production de cytokines par les monocytes. Ces médiateurs plasmiques sont nombreux et les plus connus sont le TNF α , les interleukines IL1 β , IL6 et

IL8. Ils possèdent des propriétés pro-inflammatoires puissantes et sont sécrétés de façon prolongée et variable dans le temps avec des pics de concentrations circulantes observés entre la quatrième et sixième heure après l'initiation de la CEC [8,9]. Il existe donc une phase précoce et une phase retardée de la réponse inflammatoire [7]. La réaction précoce fait intervenir l'anaphylatoxine C5a. Il s'agit d'un puissant agoniste de la P-sélectine, molécule d'adhésion stockée dans les vacuoles cytoplasmiques, aisément et rapidement disponible. L'expression de P-sélectine à la surface endothéliale permet le recrutement des neutrophiles au contact de l'endothélium [7]. Dans un second temps, l'attachement des neutrophiles aux cellules endothéliales s'effectue par le biais de molécules d'adhésion (E-sélectine, ICAM, VCAM), processus largement entretenu et amplifié dans le temps par les cytokines pro-inflammatoires [7]. Ces dernières peuvent altérer considérablement la circulation périphérique en réduisant le tonus vasculaire, diminuant ainsi les résistances vasculaires systémiques. En outre, le TNF α et l'IL6 sont connus pour avoir une activité inotrope négative en période postopératoire [10,11], d'autant plus que le myocarde lui-même peut en synthétiser [12].

En marge de l'activation du complément, les protéines du système contact sont également activées, débouchant ainsi sur la production de facteur XII activé (XIIa) et de kallibréine [13]. Le facteur XIIa active directement le facteur XI de la voie intrinsèque de la coagulation, qui finalement conduit à la formation de thrombine. Cependant, il est désormais montré que l'activation de cette voie intrinsèque, bien que réelle, est quantitativement marginale dans la production de thrombine en comparaison de celle provenant de l'activation de la voie tissulaire de la coagulation [6,13]. Le facteur tissulaire est largement impliqué dans cette production de thrombine, et il est issu en partie de l'activation monocyttaire [6]. Le système contact est autoamplifié par la production croissante de facteur XIIa et de kallibréine [13]. L'importance clinique du système contact peut être reliée aux activités de la kallibréine. La kallibréine clive les kininogènes de haut poids moléculaire pour libérer de la bradykinine qui est un nonapeptide ayant des propriétés vasodilatatrices notoires. Elle active aussi le système fibrinolytique conduisant à la génération de plasmine, et tout comme les produits dérivés de l'activation du complément, la kallibréine peut activer les polynucléaires neutrophiles.

La nature des matériaux influence l'intensité de la réponse inflammatoire. De tous les matériaux destinés à être en contact avec le sang au cours de la CEC, le polychlorure de vinyle (PVC) est le plus fréquemment utilisé. Les agents plastifiants, qui sont associés dans la formulation du polymère, ont une influence considérable sur la réactivité sanguine en fonction de leur nature chimique, de leur taux d'extraction dans le sang, mais aussi sur la flexibilité qu'ils confèrent au PVC [14]. Pour préparer des polymères biospécifiques, capables d'interactions biologiques spécifiques avec un système biologique vivant, deux voies sont possibles. La première méthode consiste à modifier la formulation même du polymère par fonctionnalisation statistique de chaînes macromoléculaires préexistantes par des groupements chimiques appropriés. Cette méthode, actuellement encore du domaine de la recherche, permet d'obtenir

des polymères capables de mimer l'ADN (*ADN-like*), les phospholipides (*phospholipides-like*) ou l'héparine (*heparin-like*). La seconde consiste à adjoindre aux polymères un traitement de surface améliorant la compatibilité du biomatériau, tout en préservant ses propriétés fondamentales. Cette approche de la biocompatibilité est proposée par l'industrie et mise en application clinique depuis maintenant une dizaine d'années environ [15]. Les traitements de surface ont été conçus au début pour mimer la biocompatibilité de l'endothélium vasculaire en greffant de l'héparine à la surface du circuit, soit par liaisons ioniques, soit par liaisons covalentes. Les premières expériences cliniques avec ces circuits préhéparinés ont été réalisées sur des assistances circulatoires ou des CEC partielles au cours desquelles la recherche d'une anticoagulation réduite était une préoccupation majeure des chirurgiens. La généralisation de ces technologies à la chirurgie à cœur ouvert a été plus chaotique en l'absence d'une compréhension parfaite de la physiopathologie des troubles de l'hémostase en chirurgie cardiaque au début des années 1990, entraînant de fait une relative désaffection pour ces biomatériaux [16]. Néanmoins, dès la publication des premiers essais cliniques randomisés, il a été possible de mettre en évidence un bénéfice de ces circuits sur la réduction de l'inflammation humorale, permettant de diminuer de 30 à 50 % l'activation des voies alterne et classique du complément [17]. Plus récemment, une étude menée *ex vivo* sur un modèle de CEC simulée permettant de s'affranchir de l'influence de l'héparine en phase fluide (utilisation d'une forme recombinante d'hirudine) a montré que l'inhibition du complément liée à l'utilisation de circuits préhéparinés diminuait les phénomènes d'activation leucocytaire et plaquettaire [18]. Les bénéfices cliniques qui peuvent être associés à la réduction de la réponse inflammatoire ont été plus difficiles à mettre en évidence car les essais thérapeutiques étaient le plus souvent menés soit sur des effectifs réduits, soit chez des patients à faible risque opératoire [19]. Cependant, les patients à haut risque opératoire (traités avec agents antiplaquettaires, diabétiques, insuffisants respiratoires ou rénaux) tirent un bénéfice de l'utilisation de circuits préhéparinés [20,21]. Les troubles du rythme supraventriculaires observés fréquemment deux à cinq jours après chirurgie cardiaque, dont il a été prouvé qu'ils sont entre autre corrélés à l'importance de l'activation de la voie classique du complément [22], surviennent moins fréquemment lorsque des circuits préhéparinés ont été utilisés [23,24]. La thrombo-résistance des surfaces artificielles enduites d'héparine a été démontrée expérimentalement [25] et la biocompatibilité de ces circuits préhéparinés est attestée par la réduction de l'activation de contact et de la spoliation plaquettaire lors de leur utilisation [13,16]. Ces données ont permis à certaines équipes d'envisager d'aller plus loin dans la biocompatibilité de la CEC en réduisant l'anticoagulation systémique, sous couvert de l'utilisation de circuits préhéparinés, afin de réduire le saignement et le recours transfusionnel postopératoire [26]. Cette démarche n'a été possible que grâce à une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'hémostase en chirurgie cardiaque sous CEC.

Dans la continuité des circuits préhéparinés, l'industrie a proposé d'autres types de traitement de surface afin d'améliorer

rer la biocompatibilité de la CEC [27]. Tous ces traitements de surface ne sont pas similaires dans leur principe et leur efficacité. En particulier, leur thromborésistance et leurs propriétés anti-inflammatoires peuvent différer d'un type à l'autre. Il est donc difficile de spéculer sur la possibilité de réduire l'anticoagulation systémique en les utilisant. Néanmoins, les traitements de surface à base de phosphorylcholine (phospholipide membranaire doté de propriétés anticoagulantes) semblent prometteurs [28–31] en particulier lorsqu'ils sont utilisés sous le concept de l'ECMO (*extra corporeal membrane oxygenation*) [30].

2.2. Architecture du circuit de CEC

Les contraintes mécaniques, en particulier les contraintes de cisaillement sur les éléments figurés du sang, ont des effets délétères sur ceux-ci, au moins autant que le contact du sang avec les surfaces artificielles [32]. Les leucocytes sont activés dès lors que les contraintes de cisaillement dans le circuit de CEC dépassent 75 dyn/cm² et les plaquettes pour des valeurs supérieures à 100 dyn/cm². En revanche, les érythrocytes peuvent supporter des contraintes de cisaillement plus importantes (jusqu'à 2000 dyn/cm²) au-delà desquelles ils sont hémolysés. Ces contraintes de cisaillement sont fonction de l'architecture du circuit (géométrie, dimensions) et également des conditions de flux imposées par les pompes. De nombreuses particules peuvent être ainsi générées dans la circulation en association avec d'autres particules extrêmement diverses telles que des fragments tissulaires et graisseux, des particules synthétiques provenant des différents éléments du circuit (usure des corps de pompes par exemple) et autres agents démoussants.

À cet égard, les pompes ont été supposées avoir un impact potentiel sur les embolies systémiques de particules hémolytiques et donc sur la qualité de la microcirculation. En particulier, les pompes centrifuges permettent en théorie de diminuer les embolies gazeuses de par leur géométrie, et ont été rapportées être moins hémolysantes que les pompes à galets, bien que cette dernière notion soit aujourd'hui contestée [33]. Cependant, il a été démontré que la réponse inflammatoire (activation du complément et des neutrophiles) est plus importante avec les pompes centrifuges qu'avec les pompes à galets [9,34]. Ces résultats inattendus ne reçoivent pas encore d'explications claires mais il est possible qu'ils soient en rapport avec les différences de pulsativité des flux délivrés par les pompes.

3. Bio-incompatibilité indépendante des matériaux ou facteurs dépendants de l'intervention chirurgicale

3.1. Génétique du patient

L'ampleur des phénomènes inflammatoires et/ou des troubles de l'hémostase postopératoires parfois constatés et pouvant engager le pronostic vital, ne semble pas prévisible par les scores de risques classiques, qui tiennent compte entre autres des antécédents, de la clinique, du geste chirurgical effectué et des marqueurs biologiques usuels. En effet, il existe par-

fois des disparités saisissantes d'un patient à l'autre, et certaines études rapportent que ces variabilités pourraient être expliquées par des facteurs génétiques rendant certains patients plus sensibles aux complications hémostatiques et inflammatoires postopératoires que d'autres. Ainsi, plusieurs polymorphismes génétiques, au niveau des protéines de la coagulation, des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des protéines du système du complément sont désormais connus comme étant associés à un risque élevé de complications postopératoires. Sept polymorphismes génétiques concernant les facteurs de la coagulation et les glycoprotéines plaquettaires ont été récemment identifiés comme étant associés aux saignements postopératoires en chirurgie cardiaque [35]. Par ailleurs, le polymorphisme du facteur V (Leiden) a été précédemment associé à des réductions de saignements postopératoires [36].

D'autres études ont démontré que la variabilité génétique peut modifier l'importance de la réponse inflammatoire, notamment les productions postopératoires d'IL6 [37,38], de TNF α [39] et d'acide lactique [40]. La variante E4 de l'apolipoprotéine E, reconnue comme facteur de risque d'athérosclérose, est aussi désormais connue pour être associée à une augmentation du relargage de TNF α et d'IL8 après chirurgie sous CEC [41]. Enfin, l'homozygotie pour la délétion de l'isotype C4A du complément est très significativement associée en chirurgie cardiaque pédiatrique à un syndrome d'extravasation plasmatique [42].

Ainsi, des polymorphismes génétiques sont régulièrement découverts. La prise en compte de ces polymorphismes pourrait à l'avenir être utile à l'évaluation préopératoire des risques de saignements et de complications inflammatoires.

Au-delà de ces facteurs constitutionnels, il existe des situations cliniques acquises au cours de la vie du patient qui peuvent amplifier l'intensité de la réaction inflammatoire en chirurgie cardiaque sous CEC. En particulier l'âge des patients, qui, en augmentant s'associe à une élévation postopératoire des concentrations circulantes d'endotoxine et de TNF α ainsi qu'une diminution postopératoire des performances hémodynamiques du myocarde [10]. Cette surproduction de médiateurs inflammatoires a également été retrouvée chez les patients en insuffisance cardiaque préopératoire qui sont particulièrement exposés à des suites opératoires complexes [43] et chez qui la qualité de la prise en charge chirurgicale sera déterminante pour les suites postopératoires.

Enfin, les diabétiques semblent développer durant la CEC un stress oxydatif plus important et une réponse inflammatoire qualitativement différente des patients non diabétiques, caractérisée en particulier par une majoration de l'activation du complément et des polynucléaires neutrophiles [44].

3.2. Le contact air-sang et l'utilisation de circuits clos

Le contact du sang avec l'air ambiant dans le contexte de la chirurgie est tout sauf physiologique et déclenche de nombreuses cascades d'activations cellulaires et plasmatiques. Dans un circuit de CEC, il existe des compartiments en nombre variable dans lesquels le sang est au contact de l'air ambiant (réservoirs

de cardiectomie par exemple) et constamment réintroduit dans le circuit de perfusion. Les oxygénateurs dits « à bulles » qui permettaient autrefois d'assurer l'hématose par contact direct entre le sang et l'oxygène administré, ont maintenant quasiment disparu au profit des membranes d'oxygénation. Néanmoins, l'utilisation d'un circuit totalement clos est plus astreignante, notamment en cas de nécessité de compensation volumique. Cette technique de CEC, longtemps restée marginale en chirurgie de routine, se développe de plus en plus depuis l'arrivée de la mini-CEC. C'est même un des avantages majeurs de la mini-CEC, avec la réduction du volume d'amorçage de la CEC et donc de l'hémodilution peropératoire. Pour la chirurgie coronaire, des adaptations techniques sur le système de perfusion extracorporelle (drainage veineux aspiratif et gestion des aspirations en particulier), permettent de réaliser l'intervention en supprimant cette interface air-sang. En revanche, dans le cas où les cavités cardiaques sont ouvertes (en chirurgie valvulaire par exemple), il est impossible d'obtenir un circuit totalement clos par définition. Néanmoins, ces circuits « semi-clos » permettent malgré tout de réaliser une chirurgie valvulaire dans de bonnes conditions et d'améliorer les suites opératoires cliniques et biologiques [45].

En effet, Schonberger a démontré en 1995 que la suppression de l'interface air-sang, obtenue grâce à l'utilisation de circuits clos, comportait de nombreux avantages tant sur le plan de l'hémostase que de l'inflammation [46]. L'activation du complément est significativement réduite ainsi que celle de la fibrinolyse. De même, au niveau cellulaire, l'activation des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes est diminuée. Le bénéfice clinique observé a été une réduction du saignement postopératoire. Enfin, les auteurs ont mis en évidence une réduction de l'activité hémolytique avec pour bénéfice une augmentation de la clairance hépatique par les cellules de Kupffer de l'endotoxine circulante, molécule considérée comme puissant agoniste inflammatoire. L'utilisation de systèmes clos apparaît donc essentielle dans la recherche de la biocompatibilité de la CEC, ce que d'autres auteurs ont plus récemment confirmé [47].

3.3. L'activation tissulaire et la gestion des aspirations

Il a longtemps été admis que la formation de thrombine en chirurgie cardiaque était la conséquence de l'activation de contact et de la voie intrinsèque de la coagulation, pouvant directement déboucher sur le risque de coagulation du circuit de CEC. De larges doses d'héparine sont donc utilisées pour éviter la thrombose du circuit, même si elle ne bloque pas la formation de thrombine y compris lorsque l'*activated clotting time* (ACT) est très élevé (supérieur à 1000 secondes) [48]. Cependant, l'héparine reste l'anticoagulant de référence car son utilisation est pratique dans la mesure où on lui connaît un antagoniste (protamine).

Boisclair a démontré en 1993 que la principale source de formation de thrombine provenait de l'activation de la voie extrinsèque ou tissulaire de la coagulation [49]. Cela souligne l'importance du traumatisme chirurgical, c'est-à-dire le contact

du sang avec les tissus graisseux, péricardiques, pleuraux [50], ou plus simplement avec le matériel chirurgical (instruments, gants, textiles) ou l'air ambiant [46], dans l'activation des multiples cascades de la coagulation, de la fibrinolyse, et même de l'hémolyse [33].

La chirurgie sans CEC a confirmé ces notions, non seulement à propos des perturbations biologiques de la coagulation observées à la 24^e heure postopératoire [48,51], mais également dans la mise en route des processus inflammatoires qui sont d'autant plus importants que le geste chirurgical est lourd [52]. L'utilisation des récupérateurs de CEC permettant de réinjecter le sang du champ opératoire, afin de limiter les pertes sanguines et de maintenir la volémie, a donc pour conséquence directe la retransfusion d'une grande quantité de ces protéines activées et autres médiateurs inflammatoires. Dès 1995, des travaux cliniques ont permis de démontrer qu'il est important de ne pas transfuser le sang épanché dans le champ opératoire afin de limiter l'augmentation des concentrations circulantes de thrombine, d'hémoglobine libre et autres produits de dégradation fibrinolytique [53].

Les circuits de CEC préhéparinés sont connus pour leur thromborésistance et leur biocompatibilité, en ce sens qu'ils réduisent biologiquement l'activation de contact [13]. Cependant, la réduction de l'héparinisation générale sans contrôle des aspirations de CEC, même sous couvert de la protection théorique d'un circuit préhépariné, conduit à observer une augmentation significative des concentrations circulantes de thrombine, avec le risque thromboembolique que cela comporte [54]. En respectant le principe de la production majoritairement d'origine tissulaire de la thrombine au cours de tout geste chirurgical, une gestion parfaite des aspirations, grâce à l'utilisation exclusive de systèmes de récupération-lavage du sang (*cell-saver*), limite l'élévation des concentrations circulantes de thrombine [55]. Ces dispositifs d'autotransfusion permettent de transfuser les érythrocytes après lavage, sans y associer les autres éléments figurés sanguins (polynucléaires et plaquettes) ni les facteurs de coagulation activés. Il a été également démontré que l'utilisation de *cell-saver* permet de diminuer les concentrations circulantes d'hémoglobine libre (dont la nocivité hépatique et rénale est bien connue), de cytokines (puissants agonistes inflammatoires) [56], et de protéine S100 β (marqueur de souffrance cellulaire cérébrale) [57]. Expérimentalement chez le chien, le traitement du sang épanché dans le champ opératoire par un *cell-saver* réduit les microembolies cérébrales [58].

La gestion des aspirations chirurgicales est donc fondamentale. L'intérêt des *cell-saver* n'est pas seulement de récupérer les quelques érythrocytes présents dans le champ opératoire, mais d'être utilisé comme un dispositif exclusif permettant ainsi de contrôler les conséquences de la réponse inflammatoire et des troubles de l'hémostase indépendants des matériaux, générés par l'acte chirurgical lui-même. Ces stratégies opératoires, appliquées initialement à la chirurgie coronaire, peuvent être facilement appliquées à la chirurgie à cœur ouvert, au cours de laquelle les processus physiopathologiques préalablement cités sont largement exacerbés. Il est en effet, très facile d'opérer la grande majorité des patients sans utiliser les récupérateurs de CEC, mais il est en revanche, important de ne pas

ou dépasser les « limites » d'un tel système, ce qui conduirait à une déperdition protéique et cellulaire significative dommageable pour le patient.

3.4. Héparine et protamine

La gestion conventionnelle et historique de l'anticoagulation en CEC consiste à administrer une dose de 300 UI/kg d'héparine afin d'obtenir un ACT cible de 480 secondes. Cette approche empirique qui date des années 1960 ne tient aucun compte de la sensibilité individuelle de chaque patient (résistance à l'héparine, activité antithrombine) et il est déjà possible d'atteindre ce niveau d'anticoagulation en diminuant la dose initiale d'héparine [59]. L'utilisation de circuits préhéparinés clos et la gestion des aspirations permettent, au-delà des bénéfices préalablement évoqués, d'aller encore plus loin dans cette démarche et de diminuer en toute sécurité l'ACT cible jusqu'à des valeurs comprises entre 250 et 300 secondes en chirurgie coronaire [26,55,60,61]. Dans cette perspective, c'est une logique d'efficacité pharmacologique de l'héparine qui est retenue (anticoagulation efficace et adaptée) plutôt que celle d'une posologie calculée d'après le poids du malade.

Certes, l'héparine est connue pour diminuer *in vitro* la réponse inflammatoire [62]. Mais le rôle anti-inflammatoire spécifique de l'héparine en CEC, en dehors de son utilisation comme traitement de surface, est très mal connu. L'obligation d'utiliser l'héparine comme anticoagulant rend difficile la discrimination entre les effets de l'héparine sur les marqueurs inflammatoires et l'impact général de la CEC sur ces mêmes marqueurs [62]. Néanmoins, une récente étude suggère l'existence d'une activation endothéliale par l'héparine circulante aux doses habituellement employées en CEC [63] par un possible mécanisme d'activation des polynucléaires neutrophiles [64].

Actuellement, les avantages à réduire la quantité totale d'héparine administrée au cours d'une opération sous CEC l'emportent possiblement sur la perte théorique du potentiel anti-inflammatoire de l'héparine en phase fluide pour les raisons suivantes. Tout d'abord, pour les chirurgiens, le premier intérêt de la réduction de l'anticoagulation systémique (ACT cible à 250 secondes en chirurgie coronaire) est à l'évidence de pouvoir diminuer les pertes sanguines durant l'intervention chirurgicale. Certaines équipes ont pu ainsi diminuer le taux d'administration de produits sanguins homologues mais sans pouvoir toutefois réduire significativement les pertes sanguines au cours de l'intervention [55]. Il ne faut cependant pas négliger l'intérêt de cette méthode dans l'obtention d'une hémostasie chirurgicale rapidement satisfaisante avant la fermeture du thorax, ce qui est certes difficilement quantifiable, mais qui procure un grand confort chirurgical. Ainsi, plus que le volume sanguin perdu en période postopératoire, dont l'estimation varie d'un centre à l'autre, la chute de l'hématocrite reflète probablement mieux le retentissement général d'une opération cardiaque [60,61].

La réduction de l'héparinisation générale, et par conséquent celle de la protamine, a un effet significatif sur l'hémostasie et

l'inflammation. En effet, l'héparine induit une dysfonction plaquettaire et une accentuation de la fibrinolyse avant même l'initiation (donc indépendamment) de la CEC [65]. Par conséquent, la réduction de l'héparinisation générale en chirurgie cardiaque est intéressante d'un point de vue hémostatique pourvu que la conduite de la CEC le permette [55,60,66].

Des auteurs ont constaté que la réduction des doses d'héparine à 200 UI/kg au lieu de 300 UI/kg réduit significativement les phénomènes d'adhésions cellulaires, plus précisément leucocytaire, sur le filtre artériel d'un circuit de CEC préhépariné [67]. Le rôle de la réduction de l'héparine circulante sur l'adhésion des polynucléaires neutrophiles laisse supposer dans cette étude que l'héparine en phase fluide activerait l'inflammation cellulaire [64,67,68].

Des travaux ont prouvé que la réduction de l'héparinisation générale permet de mieux préserver l'activité de l'antithrombine [61]. Cet anticoagulant naturel, par ailleurs doté de propriétés anti-inflammatoires [69], en étant moins consommé pourrait être à l'origine de la diminution des complications thromboemboliques [61] déjà observée par d'autres auteurs avec ce type de protocole chirurgical [55].

En outre, la protamine, indépendamment de l'héparinisation préalable, provoque des interactions cellulaires de nature inflammatoire entre les leucocytes et les cellules endothéliales dans la circulation [70]. L'activité inotrope négative de la protamine a été démontrée expérimentalement sur modèle de cœur isolé perfusé de Langendorff (donc indépendamment de toute influence anesthésique, chirurgicale ou perfusionnelle) et a été rapportée à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α) par les cardiomyocytes eux-mêmes [71]. Il y a donc un intérêt synergique à réduire l'héparine et la protamine, d'autant plus que leur association sous forme de complexes est connue pour activer la voie classique du complément [5,7,17]. Enfin, il est admis depuis longtemps dans la pratique de routine de neutraliser dose pour dose (1 :1) l'héparine par la protamine. Des auteurs ont démontré que cette pratique aboutissait à administrer la protamine en excès [72]. La méthode de titration utilisée dans cette étude a permis de déterminer plus précisément un ratio protamine/héparine idéal, aux alentours de 0,3, permettant de restaurer une agrégation plaquettaire optimale en fin d'intervention (80 % de la valeur pré-CEC au lieu de 26 %) [72]. La surexposition des plaquettes à la protamine peut donc prédisposer à un saignement postopératoire excessif.

3.5. Ischémie–reperfusion, activation et filtration leucocytaire

Les séquences d'ischémie–reperfusion sont fréquentes dans l'exercice de la chirurgie cardiaque (avec ou sans CEC) avec en premier lieu l'ischémie–reperfusion myocardique. De plus, bon nombre d'organes peuvent subir à des degrés divers une hypoperfusion durant la procédure chirurgicale, en particulier les poumons et le tube digestif. Mais plus généralement, la microcirculation générale est perturbée par les phénomènes d'adhésion leucocytaire [7]. Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules massivement engagées dans la réponse inflammatoire, qu'elle soit ou non la conséquence de l'interaction du

sang avec les matériaux de la CEC. Ils libèrent dans le voisinage de l'endothélium vasculaire, après y avoir adhéré, des enzymes protéolytiques telle l'élastase ou la myéloperoxydase leucocytaire, dont le rôle délétère sur les structures parenchymateuses, en particulier du poumon, est bien connu [5]. L'activation des polynucléaires neutrophiles, sous l'influence de celle du complément, contribue également à la génération de radicaux libres oxygénés [73]. Ces lésions oxydatives sur les membranes cellulaires, se propagent par de véritables réactions en chaîne. Les lésions tissulaires importantes qui en découlent ont été bien étudiées sur le myocarde [73]. Néanmoins, c'est aux équipes de chirurgie cardiaque pédiatrique que revient le mérite d'avoir démontré chez des enfants atteints de cardiopathies congénitales cyanogènes, que les phénomènes de peroxydation lipidique membranaire survenaient dès l'initiation de la CEC, avant même l'ischémie induite par le clampage aortique, prouvant de fait la toxicité de l'apport massif d'oxygène pour les tissus [74]. De même, il est maintenant acquis que le niveau d'oxygénation durant la CEC en chirurgie coronarienne de routine peut avoir un impact tout à fait significatif sur l'élévation des concentrations circulantes en élastase leucocytaire et en enzymes myocardiques dans le sinus coronaire. Les valeurs de ces marqueurs en CEC hyperoxique (400 mmHg de PO₂) atteignent quasiment le double de celles observées en CEC normoxique (inférieures à 15 mmHg de PO₂) [75]. Il s'agit là d'un paramètre physiopathologique très important d'un point de vue pratique et dont il n'est pratiquement jamais fait mention lors des études comparant la chirurgie sous CEC avec la chirurgie à cœur battant qui serait censée provoquer moins de dommage tissulaire myocardique. Il est pourtant évident que les conditions de ventilation diffèrent entre ces deux alternatives thérapeutiques, ne serait ce que par le maintien de la ventilation mécanique assurant un lavage vasculaire pulmonaire permanent. Une étude récente a en effet, démontré l'intérêt du maintien de la ventilation pulmonaire durant la CEC, permettant ainsi de limiter grâce à un effet de lavage permanent de diminuer l'impact tissulaire local de la réponse inflammatoire [76]. Hormis cette approche de la ventilation artificielle, d'autres techniques anesthésiques peuvent avoir un impact favorable sur l'inflammation tissulaire en particulier myocardique. Pour minimiser les lésions d'ischémie–reperfusion sur le myocarde, les anesthésiques halogénés ont clairement montré leur intérêt, après une période encore récente où ils étaient bannis de l'arsenal anesthésique. Ils confèrent une protection myocardique par le biais d'une action mimant le préconditionnement ischémique mais aussi en limitant les effets délétères de la reperfusion. Le sévoflurane ajouté à la solution de cardioplégie diminue la réaction inflammatoire (diminution de la production d'IL6 du CD11b/CD18) [77]. Administrés pendant toute l'intervention en chirurgie coronarienne sous CEC, ils améliorent les performances mécaniques post-CEC et limitent l'ascension des troponines [78]. Enfin, leur utilisation (sévoflurane ou desflurane) a des implications économiques avec une diminution des durées de séjour en soins intensifs et hospitalier [79].

Les polynucléaires neutrophiles étant au centre de ces réactions en chaîne, il a été envisagé de les retirer de la circulation par des techniques de filtrations leucocytaires. Différentes ap-

proches ont été essayées selon le site de filtration et le moment auquel elle est réalisée [80]. Ainsi, la filtration leucocytaire peut être réalisée sur la ligne artérielle, sur le circuit de cardioplégie sanguine, ou en fin de CEC sur le contenu des lignes de CEC avant retransfusion. Par conséquent, la leucofiltration peut être permanente ou temporaire (réchauffement, reperfusion). Les résultats actuels ne font pas encore l'objet d'un consensus (en particulier il persiste des discordances entre les résultats cliniques et biologiques) mais semblent indiquer que la filtration leucocytaire pourrait diminuer les dysfonctions myocardiques [81], rénales et pulmonaires postopératoires [82]. Cependant, des études complémentaires sont encore nécessaires pour clarifier les modalités et l'intérêt de ces stratégies de filtration leucocytaire dans l'arsenal thérapeutique de la CEC.

Il a été également suggéré que l'ultrafiltration modifiée pourrait réduire la réponse inflammatoire en même temps qu'elle réduit l'inflation hydrique [83]. La plupart de ces études ont été réalisées en chirurgie cardiaque pédiatrique [84]. Là encore, les discordances entre les résultats biologiques (réduction des concentrations circulantes de marqueurs inflammatoires) et les résultats cliniques laissent perplexes même si les suites opératoires semblent être également améliorées chez l'adulte [84].

3.6. Endotoxine, pulsatilité et priming

D'un point de vue expérimental, la mise sous CEC d'un cochon peut amorcer la réaction inflammatoire et provoquer une séquestration pulmonaire de polynucléaires neutrophiles mais ne crée pas nécessairement de dysfonction pulmonaire dans un premier temps [85]. L'exposition ultérieure à une dose d'endotoxine, bénigne dans d'autres circonstances, provoque alors l'activation de ces polynucléaires neutrophiles séquestrés et par voie de conséquence le syndrome post-CEC. Les interactions entre les différentes cascades inflammatoires sont donc complexes et encore incomplètement élucidées. L'origine majoritairement digestive de l'endotoxine dans l'organisme au cours d'une CEC (en dehors de contaminations bactériennes ou du rôle de facteurs pyrogènes présents dans les solutions de remplissage) met en avant la qualité de la perfusion digestive et la souffrance potentielle du territoire splanchnique au cours de l'intervention. En effet, le tube digestif est un organe très sensible aux variations de perfusion systémique [86]. L'ischémie ou l'hypoperfusion splanchnique peuvent générer des phénomènes de translocations bactériennes (passages de fragments bactériens ou endotoxine) de la lumière digestive vers la circulation portale [87]. Les cellules du système réticuloendothélial hépatique (cellules de Kupffer) ont pour rôle d'assurer la clairance de cette endotoxine [87]. Lorsque cette clairance hépatique est dépassée, ce qui peut être le cas si l'activité hémolytique est importante, l'endotoxine passe dans la circulation systémique au sein de laquelle elle stimule l'activation du complément et la production de cytokines par les monocytes [46,87]. Certains auteurs ont mis en évidence que la perfusion splanchnique est significativement diminuée au cours de la CEC et que la perméabilité intestinale est consécutive-

ment augmentée [88]. Les concentrations d'endotoxine dans la circulation systémique sont corrélées à cette augmentation de perméabilité intestinale durant le déroulement de la CEC [89]. Des auteurs avaient déjà affiné ces notions en corrélant l'importance de l'endotoxémie à la durée du clampage aortique et à la perte de pulsativité de la perfusion [90]. D'autres ont également confirmé le rôle délétère de la durée du clampage aortique dans l'élévation de l'endotoxine circulante, plus que la durée de la CEC elle-même [91]. Cette prédominance de la durée de clampage sur la durée de CEC souligne peut-être l'influence de la perte de pulsativité dans la genèse du processus inflammatoire.

En effet, l'énergie pulsatile ne représente qu'une part minime mais néanmoins significative de l'énergie hydraulique [92]. Cette énergie pulsatile persiste tant que le cœur garde une activité rythmique mais disparaît lorsque le chirurgien clamp l'aorte. La pulsativité résiduelle dans le système circulatoire durant le clampage aortique est donc celle générée par la pompe artérielle. Les perturbations circulatoires lors de la CEC modifient le « shear stress » au niveau de l'endothélium [93]. Les cellules endothéliales sont normalement constamment exposées à des forces mécaniques (5 à 20 dyn/cm²) qui influencent significativement leur phénotype [94]. Des variations, dans un sens ou dans l'autre par rapport à cet état basal, conduisent au déclenchement de signaux intercellulaires [94]. L'application à la CEC clinique de ces données biologiques reste encore du domaine de la spéculation et de l'investigation, mais il est vrai que la réponse inflammatoire peut être modulée par le type de pompe artérielle utilisée [9,34] ce qui n'est peut-être pas sans rapport avec leur régime de pulsativité intrinsèque [95].

Ces interactions entre les paramètres rhéologiques et la fonction endothéliale vont probablement revêtir une importance particulière dans les années à venir [93]. En effet, la mini-CEC est l'une des évolutions majeures proposées par l'industrie. Elle est le résultat des améliorations et de l'évolution de la chirurgie à cœur battant dont elle cherche à reproduire les avantages physiopathologiques tout en s'affranchissant de la difficulté opératoire. Comparativement à une CEC standard, la mini-CEC, parce qu'elle respecte la plupart des principes énoncés préalablement dans ce propos, diminue globalement la réponse inflammatoire généralisée [96] et semble améliorer les suites opératoires en chirurgie coronaire ou valvulaire aortique [45,97]. Ces résultats récents devront néanmoins être confirmés par d'autres études complémentaires. Outre le caractère clos d'un circuit traité et la gestion des aspirations, les deux points singulièrement innovants de cette nouvelle approche de la CEC sont le drainage veineux actif par pompe centrifuge et la réduction du volume de priming qu'autorise l'architecture spécifique du circuit de mini-CEC. En effet, le circuit de mini-CEC est réduit à son strict minimum et ne comporte pas de réservoir, ce qui explique son caractère ergonomique. C'est le malade lui-même qui fait office de « réservoir ». Les détracteurs de cette technique avancent d'ailleurs la difficulté à parfois rendre le champ opératoire exsangue et à maintenir un retour veineux constant et optimal. La mini-CEC exige donc une étroite collaboration entre chirurgiens perfusionnistes

et anesthésistes car elle transfère en réalité un volume sanguin du secteur droit vers le secteur gauche et est dépendante de la précharge. En outre, le drainage veineux actif par pompe centrifuge a possiblement des effets physiopathologiques différents de ceux engendrés par un drainage veineux par gravité, mais qui restent actuellement méconnus hormis une hémolyse biologique, sans traduction clinique, plus importante avec un drainage veineux actif [98]. Mais incontestablement, le faible volume de priming qu'offre la mini-CEC procure un avantage en termes de réduction de l'hémodilution, sans même insister sur le rôle délétère évident de celle-ci dans les perturbations de l'hémostase. L'hémodilution provoque une fuite liquidienne vers les espaces interstitiels, accroît ainsi l'hypovolémie et l'œdème tissulaire diminuant ainsi l'apport local en oxygène [89, 91]. À ce titre, la réduction du volume d'amorçage de la CEC pour limiter l'hémodilution contribue à la diminution de l'endotoxémie [99]. La pratique de l'amorçage rétrograde autologue du circuit de CEC obtenu en drainant le volume cristalloïde est une méthode permettant de diminuer l'hémodilution peropératoire indépendamment de l'utilisation d'une mini-CEC. Des auteurs ont ainsi réussi à démontrer une diminution postopératoire significative du contenu en eau extravasculaire pulmonaire [100]. Les conséquences de cette réduction drastique de l'hémodilution peropératoire ont été une réduction des épisodes de fibrillation auriculaire postopératoire, une réduction de la durée nécessaire à la récupération du poids préopératoire et donc une mobilisation complète plus rapide des patients autorisant une sortie de l'hôpital plus précoce.

4. Conclusion

La réponse inflammatoire en chirurgie cardiaque est donc un problème complexe et multifactoriel. Elle nécessite par conséquent une approche thérapeutique multifactorielle et les comparaisons entre la chirurgie cardiaque avec ou sans CEC l'ont bien démontré, en dépit de leurs fréquentes insuffisances méthodologiques. Cette évolution de la chirurgie cardiaque sans CEC, au cours des dix dernières années, a au moins eu le mérite de différencier la part dépendante des matériaux de celle liée à la technique de perfusion extracorporelle dans la réponse inflammatoire et les troubles de l'hémostase. Nul doute que l'essor de la chirurgie à cœur battant a permis ces dernières années à la CEC de progresser de façon significative. Bon nombre de centres ont intégré à leur CEC de routine certains principes comme la gestion des aspirations, la normothermie ou l'utilisation de circuits clos. Le bon sens impose également certains principes fondamentaux comme le respect scrupuleux d'une hémostase chirurgicale de qualité.

Il faudra bien évidemment associer dans cette réflexion certains paramètres anesthésiques ou cardiologiques, en particulier l'évolution de la pharmacologie dans ces deux disciplines. C'est de la flexibilité et de la coopération entre tous les acteurs qui prennent en charge un patient que dépend le succès de cette entreprise. Reste aussi que l'on ne sait toujours pas prédire en routine quel patient aura des suites complexes après chirurgie cardiaque alors que la CEC aura été l'objet de toutes les précautions au cours de sa réalisation. D'un point de vue écono-

mique, le coût d'une CEC par rapport au coût total d'une hospitalisation est marginal, de l'ordre de 5 à 10 %, mais il est aisément concevable que son impact clinique est plus que significatif sur les 90 % restants.

Références

- [1] Lehot JJ, Lefevre M, Phan T, Bastien O, Diab C, Jegaden O. Que faut-il attendre de la chirurgie coronaire sans circulation extracorporelle ? *Ann Fr Anesth Réanim* 2004;23:1063–72.
- [2] Menasche P. The systemic factor: the comparative roles of cardiopulmonary bypass and off-pump surgery in the genesis of patient injury during and following cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2001;72:S2260–5 (discussion S2265–6, S2267–70).
- [3] Biglioli P, Cannata A, Alamanni F, Naliato M, Porqueddu M, Zanobini M, et al. Biological effects of off-pump vs on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;24:260–9.
- [4] Cartier R, Brann S, Dagenais F, Martineau R, Couturier A. Systematic off-pump coronary artery revascularization in multivessel disease: experience of three hundred cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:221–9.
- [5] Edmunds Jr. LH. Why cardiopulmonary bypass makes patients sick: strategies to control the blood-synthetic surface interface. *Adv Card Surg* 1995;6:131–67.
- [6] Boyle Jr. EM, Verrier ED, Spiess BD. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the procoagulant response. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1549–57.
- [7] Boyle Jr. EM, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997;63:277–84.
- [8] Baufreton C, Moczar M, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using two different types of heparin-coated extracorporeal circuits. *Perfusion* 1998;13:419–27.
- [9] Baufreton C, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, Vonk A, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *Ann Thorac Surg* 1999;67:972–7.
- [10] te Velthuis H, Jansen PG, Oudemans-van Straaten HM, Sturk A, Eijssman L, Wildevuur CR. Myocardial performance in elderly patients after cardiopulmonary bypass is suppressed by tumor necrosis factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1663–9.
- [11] Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrick SH, Keith FM, Bronstein MH, et al. Relationship of the pro-inflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:626–35.
- [12] Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997;63:269–76.
- [13] te Velthuis H, Baufreton C, Jansen PG, Thijs CM, Hack CE, Sturk A, et al. Heparin coating of extracorporeal circuits inhibits contact activation during cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:117–22.
- [14] Courtney JM, Zhao X, Qian H. Biomaterials in cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 1999;14:263–7.
- [15] Baufreton C, de Brux JL. Les traitements de surfaces en circulation extracorporelle. *ITBM–RBM* 1999;21:20–5.
- [16] Bannan S, Danby A, Cowan D, Ashraf S, Martin PG. Low heparinization with heparin-bonded bypass circuits: is it a safe strategy? *Ann Thorac Surg* 1997;63:663–8.
- [17] Baufreton C, Jansen PG, Le Besnerais P, te Velthuis H, Thijs CM, Wildevuur CR, et al. Heparin coating with aprotinin reduces blood activation during coronary artery operations. *Ann Thorac Surg* 1997;63:50–6.
- [18] Lappégard KT, Fung M, Bergseth G, Riesenfeld J, Lambris JD, Videm V, et al. Effect of complement inhibition and heparin coating on artificial surface-induced leukocyte and platelet activation. *Ann Thorac Surg* 2004;77:932–41.
- [19] Wildevuur CR, Jansen PG, Bezemer PD, Kuik DJ, Eijssman L, Bruins P, et al. Clinical evaluation of Duraflon II heparin treated extracorporeal circulation circuits (2nd version). The European working group on heparin coated extracorporeal circulation circuits. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;11:616–23 (discussion 24–5).
- [20] Ranucci M, Mazzucco A, Pessotto R, Grillone G, Casati V, Porreca L, et al. Heparin-coated circuits for high-risk patients: a multicenter, prospective, randomized trial. *Ann Thorac Surg* 1999;67:994–1000.
- [21] Jansen PG, Baufreton C, Le Besnerais P, Loisanse DY, Wildevuur CR. Heparin-coated circuits and aprotinin prime for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1363–6.
- [22] Bruins P, te Velthuis H, Yazdanbakhsh AP, Jansen PG, van Hardevelt FW, de Beaumont EM, et al. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: post-surgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation* 1997;96:3542–8.
- [23] Ovrum E, Am Holen E, Tangen G, Ringdal MA. Heparinized cardiopulmonary bypass and full heparin dose marginally improve clinical performance. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1128–33.
- [24] Baufreton C, Le Besnerais P, Jansen P, Mazzucotelli JP, Wildevuur CR, Loisanse DY. Clinical outcome after coronary surgery with heparin-coated extracorporeal circuits for cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 1996;11:437–43.
- [25] Lazar HL, Bao Y, Rivers S, Treanor PR, Shemin RJ. Decreased incidence of arterial thrombosis using heparin-bonded intra-aortic balloons. *Ann Thorac Surg* 1999;67:446–9.
- [26] Aldea GS, Doursounian M, O'Gara P, Treanor P, Shapira OM, Lazar HL, et al. Heparin-bonded circuits with a reduced anticoagulation protocol in primary CABG: a prospective, randomized study. *Ann Thorac Surg* 1996;62:410–7 (discussion 417–8).
- [27] Wendel HP, Ziemer G. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:342–50.
- [28] Albes JM, Stohr IM, Kaluza M, Siegemund A, Schmidt D, Vollandt R, et al. Physiological coagulation can be maintained in extracorporeal circulation by means of shed blood separation and coating. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1504–12.
- [29] De Somer F, Francois K, van Oeveren W, Poelaert J, De Wolf D, Ebels T, et al. Phosphorylcholine coating of extracorporeal circuits provides natural protection against blood activation by the material surface. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18:602–6.
- [30] Ranucci M, Isgro G, Soro G, Canziani A, Menicanti L, Frigiola A. Reduced systemic heparin dose with phosphorylcholine coated closed circuit in coronary operations. *Int J Artif Organs* 2004;27:311–9.
- [31] von Segesser LK, Tonz M, Leskosek B, Turina M. Evaluation of phospholipidic surface coatings ex vivo. *Int J Artif Organs* 1994;17:294–9.
- [32] Daniel S. Material and circuit related bio-incompatibility of cardiopulmonary bypass in cardiovascular surgery. In: Baykut D, Krian A, editors. Current perspective of the extracorporeal circulation. Darmstadt: Steinkopff-Springer; 2000. p. 37–46.
- [33] Hansbro SD, Sharpe DA, Catchpole R, Welsh KR, Munsch CM, McGoldrick JP, et al. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: an in vivo comparison of standard roller pumps, non-occlusive roller pumps and centrifugal pumps. *Perfusion* 1999;14:3–10.
- [34] Ashraf S, Butler J, Tian Y, Cowan D, Lintin S, Saunders NR, et al. Inflammatory mediators in adults undergoing cardiopulmonary bypass: comparison of centrifugal and roller pumps. *Ann Thorac Surg* 1998;65:480–4.
- [35] Welsby IJ, Podgoreanu MV, Phillips-Bute B, Mathew JP, Smith PK, Newman MF, et al. Genetic factors contribute to bleeding after cardiac surgery. *J Thromb Haemost* 2005;3:1206–12.
- [36] Donahue BS, Gailani D, Higgins MS, Drinkwater DC, George Jr. AL. Factor V Leiden protects against blood loss and transfusion after cardiac surgery. *Circulation* 2003;107:1003–8.
- [37] Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R, Di Castelnuovo A, Nasso G, Burzotta F, et al. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences

- postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation* 2003;108 (Suppl 1):II195–II199.
- [38] Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, et al. Interleukin-6 gene $-174g>c$ and $-572g>c$ promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1458–63.
- [39] Schroeder S, Borger N, Wrigge H, Welz A, Putensen C, Hoefft A, et al. A tumor necrosis factor gene polymorphism influences the inflammatory response after cardiac operation. *Ann Thorac Surg* 2003;75:534–7.
- [40] Ryan T, Balding J, McGovern EM, Hinchion J, Livingstone W, Chughtai Z, et al. Lactic acidosis after cardiac surgery is associated with polymorphisms in tumor necrosis factor and interleukin 10 genes. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1905–9 [discussion 10–1].
- [41] Drabe N, Zund G, Grunenfelder J, Sprenger M, Hoerstrup SP, Bestmann L, et al. Genetic predisposition in patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery is associated with an increase of inflammatory cytokines. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:609–13.
- [42] Zhang S, Wang S, Yao S. Evidence for development of capillary leak syndrome associated with cardiopulmonary bypass in pediatric patients with the homozygous C4A null phenotype. *Anesthesiology* 2004;100:1387–93.
- [43] Deng MC, Dasch B, Erren M, Mollhoff T, Scheld HH. Impact of left ventricular dysfunction on cytokines, hemodynamics, and outcome in bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1996;62:184–90.
- [44] Matata BM, Galinanes M. Cardiopulmonary bypass exacerbates oxidative stress but does not increase pro-inflammatory cytokine release in patients with diabetes compared with patients without diabetes: regulatory effects of exogenous nitric oxide. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:1–11.
- [45] Remadi JP, Rakotoarivello Z, Marticho P, Trojette F, Benamar A, Poulain H, et al. Aortic valve replacement with the minimal extracorporeal circulation (Jostra MECC system) vs standard cardiopulmonary bypass: a randomized prospective trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:436–41.
- [46] Schonberger JP, Everts PA, Hoffmann JJ. Systemic blood activation with open and closed venous reservoirs. *Ann Thorac Surg* 1995;59:1549–55.
- [47] Brown Mahoney C, Donnelly JE. Impact of closed vs open venous reservoirs on patient outcomes in isolated coronary artery bypass graft surgery. *Perfusion* 2000;15:467–72.
- [48] Englberger L, Immer FF, Eckstein FS, Berdat PA, Haerberli A, Carrel TP. Off-pump coronary artery bypass operation does not increase procoagulant and fibrinolytic activity: preliminary results. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1560–6.
- [49] Boisclair MD, Lane DA, Philippou H, Esnouf MP, Sheikh S, Hunt B, et al. Mechanisms of thrombin generation during surgery and cardiopulmonary bypass. *Blood* 1993;82:3350–7.
- [50] Tabuchi N, de Haan J, Boonstra PW, van Oeveren W. Activation of fibrinolysis in the pericardial cavity during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:828–33.
- [51] Mariani MA, Gu YJ, Boonstra PW, Grandjean JG, van Oeveren W, Ebels T. Procoagulant activity after off-pump coronary operation: is the current anticoagulation adequate? *Ann Thorac Surg* 1999;67:1370–5.
- [52] Gu YJ, Mariani MA, Boonstra PW, Grandjean JG, van Oeveren W. Complement activation in coronary artery bypass grafting patients without cardiopulmonary bypass: the role of tissue injury by surgical incision. *Chest* 1999;116:892–8.
- [53] de Haan J, Boonstra PW, Monnick SH, Ebels T, van Oeveren W. Retransfusion of suctioned blood during cardiopulmonary bypass impairs hemostasis. *Ann Thorac Surg* 1995;59:901–7.
- [54] Kuitunen AH, Heikkilä LJ, Salmenpera MT. Cardiopulmonary bypass with heparin-coated circuits and reduced systemic anticoagulation. *Ann Thorac Surg* 1997;63:438–44.
- [55] Aldea GS, O'Gara P, Shapira OM, Treanor P, Osman A, Patalis E, et al. CABG with heparin-bounded cardiopulmonary bypass circuits. *Ann Thorac Surg* 1998;65:425–33.
- [56] Reents W, Babin-Ebell J, Misoph MR, Schwarzkopf A, Elert O. Influence of different autotransfusion devices on the quality of salvaged blood. *Ann Thorac Surg* 1999;68:58–62.
- [57] Anderson RE, Hansson LO, Liska J, Settergren G, Vaage J. The effect of cardiomy suction on the brain injury marker S100beta after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69:847–50.
- [58] Kincaid EH, Jones TJ, Stump DA, Brown WR, Moody DM, Deal DD, et al. Processing scavenged blood with a cell saver reduces cerebral lipid microembolization. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1296–300.
- [59] Shuhaibar MN, Hargrove M, Millat MH, O'Donnell A, Aherne T. How much heparin do we really need to go on pump? A rethink of current practices. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:947–50.
- [60] Baufréon C, de Brux JL, Binuani P, Corbeau JJ, Subayi JB, Daniel JC, et al. A combined approach for improving cardiopulmonary bypass in coronary artery surgery: a pilot study. *Perfusion* 2002;17:407–13.
- [61] Ranucci M, Cazzaniga A, Soro G, Isgro G, Frigiola A, Menicanti L. The antithrombin III-saving effect of reduced systemic heparinization and heparin-coated circuits. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002;16:316–20.
- [62] Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21:232–44.
- [63] Eikemo H, Sellevold OF, Videm V. Markers for endothelial activation during open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2004;77:214–9.
- [64] Videm V. Heparin in clinical doses "primes" granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. *Scand J Immunol* 1996;43:385–90.
- [65] Khuri SF, Valeri CR, Loscalzo J, Weinstein MJ, Birjiniuk V, Healey NA, et al. Heparin causes platelet dysfunction and induces fibrinolysis before cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1008–14.
- [66] Baufréon C, Moreau X, Corbeau JJ, Pavie P, De Brux JL. Déroulement de la CEC standard et avec les nouveaux dispositifs consommables. In: Janvier G, Lehot JJ, editors. *Circulation extracorporelle : principes et pratique*. Seconde ed. Rueil-Malmaison: Arnette; 2004. p. 113–45.
- [67] Nakajima T, Kawazoe K, Ishibashi K, Kubota Y, Sasaki T, Izumoto H, et al. Reduction of heparin dose is not beneficial to platelet function. *Ann Thorac Surg* 2000;70:186–90.
- [68] Berliner S, Fishelson Z, Wasserman L, Pinkhas J, Aronson M. Synergism between zymosan-activated serum and heparin in the induction of polymorphonuclear leukocyte aggregation. *Biomed Pharmacother* 1988;42:69–72.
- [69] Okajima K, Uchiba M. The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:27–32.
- [70] Habazettl H, Martinek V, Vollmar B, Conzen P. Enhancement of the leukocyte-endothelial cell interaction in collecting venules of skeletal muscle by protamine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:784–91.
- [71] Pevni D, Frolkis I, Iaina A, Wollman Y, Chernichovski T, Shapira I, et al. Protamine-induced cardiotoxicity is prevented by anti-TNF-alpha antibodies and heparin. *Anesthesiology* 2001;95:1389–95.
- [72] Shigeta O, Kojima H, Hiramatsu Y, Jikuya T, Terada Y, Atsumi N, et al. Low-dose protamine based on heparin-protamine titration method reduces platelet dysfunction after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:354–60.
- [73] Shandelya SM, Kuppusamy P, Weisfeldt ML, Zweier JL. Evaluation of the role of polymorphonuclear leukocytes on contractile function in myocardial reperfusion injury. Evidence for plasma-mediated leukocyte activation. *Circulation* 1993;87:536–46.
- [74] Allen BS, Ilbawi MN. Hypoxia, reoxygenation and the role of systemic leukodepletion in pediatric heart surgery. *Perfusion* 2001;16(Suppl):19–29.
- [75] Ihnken K, Winkler A, Schlensak C, Sarai K, Neidhart G, Unkelbach U, et al. Normoxic cardiopulmonary bypass reduces oxidative myocardial damage and nitric oxide during cardiac operations in the adult. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:327–34.

- [76] Suzuki T, Fukuda T, Ito T, Inoue Y, Cho Y, Kashima I. Continuous pulmonary perfusion during cardiopulmonary bypass prevents lung injury in infants. *Ann Thorac Surg* 2000;69:602–6.
- [77] Nader ND, Li CM, Khadra WZ, Reedy R, Panos AL. Anesthetic myocardial protection with sevoflurane. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004;18:269–74.
- [78] De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* 2004;101:299–310.
- [79] De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, ten Broecke PW, De Blier IG, et al. Choice of primary anaesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2004;101:9–20.
- [80] Asimakopoulos G. The inflammatory response to CPB: the role of leukocyte filtration. *Perfusion* 2002;17(Suppl):7–10.
- [81] Gott JP. Leukodepletion and aprotinin improve clinical outcome after extracorporeal circulation. *Perfusion* 2001;16(Suppl):5–9.
- [82] Treacher DF, Sabbato M, Brown KA, Gant V. The effects of leukodepletion in patients who develop the systemic inflammatory response syndrome following cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2001;16(Suppl):67–73.
- [83] Journois D, Bourdarias B. Hémo-filtration en chirurgie cardiaque. In: Janvier G, Lehot JJ, editors. *Circulation extracorporelle: principes et pratique*. Seconde ed. Rueil-Malmaison: Arnette; 2004. p. 377–85.
- [84] Chew MS. Does modified ultrafiltration reduce the systemic inflammatory response to cardiac surgery with cardiopulmonary bypass? *Perfusion* 2004;19(Suppl 1):S57–60.
- [85] Picone AL, Lutz CJ, Finck C, Carney D, Gatto LA, Paskanik A, et al. Multiple sequential insults cause post-pump syndrome. *Ann Thorac Surg* 1999;67:978–85.
- [86] Ohri SK, Becket J, Brannan J, Keogh BE, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on gut blood flow, oxygen utilization, and intramucosal pH. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1193–9.
- [87] Jansen NJ, van Oeveren W, Gu YJ, van Vliet MH, Eijssman L, Wildevuur CR. Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992;54:744–7 [discussion 7–8].
- [88] Ohri SK, Bjarnason I, Pathi V, Somasundaram S, Bowles CT, Keogh BE, et al. Cardiopulmonary bypass impairs small intestinal transport and increases gut permeability. *Ann Thorac Surg* 1993;55:1080–6.
- [89] Oudemans-van Straaten HM, Jansen PG, Hoek FJ, van Deventer SJ, Sturk A, Stoutenbeek CP, et al. Intestinal permeability, circulating endotoxin, and postoperative systemic responses in cardiac surgery patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1996;10:187–94.
- [90] Watarida S, Mori A, Onoe M, Tabata R, Shiraishi S, Sugita T, et al. A clinical study on the effects of pulsatile cardiopulmonary bypass on the blood endotoxin levels. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:620–5.
- [91] Jansen PG, Te Velthuis H, Oudemans-Van Straaten HM, Bulder ER, Van Deventer SJ, Sturk A, et al. Perfusion-related factors of endotoxin release during cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994;8:125–9.
- [92] Wright G, Ping JS, Campbell CS, Tobias MA. Computation of haemodynamic power and input impedance in the ascending aorta of patients undergoing open-heart surgery. *Cardiovasc Res* 1988;22:179–84.
- [93] Morariu AM, Gu YJ, Huet RC, Siemons WA, Rakhorst G, Oeveren WV. Red blood cell aggregation during cardiopulmonary bypass: a pathogenic cofactor in endothelial cell activation? *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:939–46.
- [94] Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L529–L533.
- [95] James SA, Peters J, Maresca L, Kalush SL, Trigueros EA. The roller pump does produce pulsatile flow. *J Extra Corpor Technol* 1987;19:376–83.
- [96] Fromes Y, Gaillard D, Ponzio O, Chauffert M, Gerhardt MF, Deleuze P, et al. Reduction of the inflammatory response following coronary bypass grafting with total minimal extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:527–33.
- [97] Wiesenack C, Liebold A, Philipp A, Ritzka M, Koppenberg J, Birnbaum DE, et al. Four years' experience with a miniaturized extracorporeal circulation system and its influence on clinical outcome. *Artif Organs* 2004;28:1082–8.
- [98] Kiyama H, Imazeki T, Katayama Y, Murai N, Mukoyama M, Yamauti N. Vacuum-assisted venous drainage in single-access minimally invasive cardiac surgery. *J Artif Organs* 2003;6:20–4.
- [99] Jansen PG, te Velthuis H, Bulder ER, Paulus R, Scheltinga MR, Eijssman L, et al. Reduction in prime volume attenuates the hyperdynamic response after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995;60:544–9 (discussion 9–50).
- [100] Eising GP, Pfauder M, Niemeier M, Tassani P, Schad H, Bauernschmitt R, et al. Retrograde autologous priming: is it useful in elective on-pump coronary artery bypass surgery? *Ann Thorac Surg* 2003;75:23–7.

Paradoxical Role of Angiotensin II Type 2 Receptors in Resistance Arteries of Old Rats

Frederic Pinaud, Arnaud Bocquet, Odile Dumont, Kevin Retailleau, Christophe Baufreton, Ramaroson Andriantsitohaina, Laurent Loufrani, Daniel Henrion

Abstract—The role of angiotensin II type 2 receptors (AT2Rs) remains a matter of controversy. Its vasodilatory and antitrophic properties are well accepted. Nevertheless, in hypertensive rats, AT2R stimulation induces a vasoconstriction counteracting flow-mediated dilation (FMD). This contraction is reversed by hydralazine. Because FMD is also decreased in aging, another risk factor for cardiovascular diseases, we hypothesized that AT2R function might be altered in old-rat resistance arteries. Mesenteric resistance arteries (250 μ m in diameter) were isolated from old (24 months) and control (4 months) rats receiving hydralazine (16 mg/kg per day; 2 weeks) or water. FMD, NO-mediated dilation, and endothelial NO synthase expression were lower in old versus control rats. AT2R blockade improved FMD in old rats, suggesting that AT2R stimulation produced vasoconstriction. AT2R expression was higher in old rats and mainly located in the smooth muscle layer. In old rats, AT2R stimulation induced endothelium-independent contraction, which was suppressed by the antioxidant Tempol. Reactive oxygen species level was higher in old-rat arteries than in controls. Hydralazine improved FMD and NO-dependent dilation in old rats without change in AT2R expression and location. In old rats treated with hydralazine, reactive oxygen species level was reduced in endothelial and smooth muscle cells, and AT2R-dependent contraction was abolished. Thus, AT2R stimulation induced vasoconstriction through activation of reactive oxygen species production, contributing to decrease FMD in old-rat resistance arteries. Hydralazine suppressed AT2R-dependent reactive oxygen species production and AT2R-dependent contraction, improving FMD. Importantly, endothelial alterations in aging were reversible. These findings are important to consider in the choice of vasoactive drugs in aging. (*Hypertension*. 2007;50:96-102.)

Key Words: aging ■ endothelium ■ microcirculation ■ angiotensin II receptors ■ NO ■ oxidative stress ■ vasodilator agents

Resistance arteries play a key role in vascular homeostasis. They possess a basal vasoconstrictor tone^{1,2} counteracted in part by flow (shear stress)-mediated dilation (FMD). Their tone is modified in hypertension, ischemic diseases, myocardial infarction, or diabetes, with situations being more frequent in aging.³⁻⁵ In aging, large arteries develop calcification and become less compliant.⁶ By contrast, resistance arteries do not develop calcification or stiffening in old subjects; nevertheless, the microvascular network becomes less efficient.¹ Indeed, aging reduces the ability to increase blood flow to skeletal muscle, as shown in rats⁷ and humans,⁸ because of endothelial dysfunction.³ Endothelium-dependent contraction is increased in aging in parallel with a decreased endothelial capacity to produce vasodilator agents.⁹ In humans, FMD, assessed by forearm blood flow measurement after reactive hyperemia, is lowered.¹⁰⁻¹²

We have shown previously that angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is involved in FMD in normotensive rat resistance arteries,¹³ whereas in hypertensive animals, FMD is counter-

acted by angiotensin II type 1 receptor (AT1R)- and AT2R-induced vasoconstriction.^{2,14} Because hypertension is often presented as a premature vascular aging, we tested the hypothesis that, in aging, AT2R receptor function might also be altered in resistance arteries. Thus, we determined the involvement of AT2R-dependent tone in FMD and determined the pathway stimulated after stimulation of AT2R in resistance arteries isolated from old rats. In addition, because we have shown previously that a chronic treatment with hydralazine reverses AT2R-dependent contraction into dilation in hypertensive rats,² we also tested the hypothesis that hydralazine might improve AT2R-dependent tone and/or FMD in old rats. We used a dose of hydralazine shown previously to improve mesenteric blood flow without changing systemic blood pressure.¹⁵

Methods

Animals

Twelve old (24 months) and 12 young (4 months) male Wistar rats (Iffa-Credo) were treated for 2 weeks with hydralazine (16 mg/kg per

Received November 22, 2006; first decision December 14, 2006; revision accepted April 12, 2007.

From the Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche (CNRS UMR) 6214 (A.B., O.D., K.R., R.A., L.L., D.H.), Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale UMR (INSERM UMR) 771 (A.B., O.D., K.R., R.A., L.L., D.H.), Université d'Angers; and Centre Hospitalier Universitaire d'Angers (F.P., C.B.), Department of Cardiac Surgery and Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur-Equipe Associée 3860, Angers, France.

Correspondence to Daniel Henrion, Department of Neurovascular Integrated Biology, UMR CNRS 6214, INSERM 771, Faculté de Médecine, 49045 Angers, France. E-mail daniel.henrion@univ-angers.fr

© 2007 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://www.hypertensionaha.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.085035

day in drinking water)¹⁵ or tap water (control). They were then anesthetized with isoflurane. Arterial blood pressure was measured in the femoral artery. Their mesentery was then removed to isolate mesenteric resistance arteries (MRAs).

The procedure followed in the care and euthanasia of the study animals was in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Agriculture, France, authorization 6422). From each rat, several segments of mesenteric arteries were isolated for the following experiments.

Pressure and Flow-Dependent Tone in MRAs

From each rat, a segment of third-order MRA was cannulated and mounted in a video-monitored perfusion system, and myogenic tone was measured. FMD was then determined before and after NO synthesis or AT2R blockade. At the end of the experiment, passive diameter of the vessel, that is, in the absence of smooth muscle tone, was measured (see the online data supplement at <http://hyper.ahajournals.org>).

Vascular Response to Exogenous Angiotensin II in Isolated Mesenteric Arteries

Six segments of MRAs were used per rat (12 rats per group) to test the effect of endothelium removal, NO synthesis blockade with *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 μ mol/L), cyclooxygenase blockade with indomethacin (10 μ mol/L), bradykinin B2 receptor blockade with HOE 140 (10 μ mol/L), AT2R blockade with PD 123319 (10 μ mol/L), or reactive oxygen species (ROS) removal with the catalase mimetic Tempol (100 μ mol/L) on AT2-dependent dilation or contraction (see the data supplement).

Western Blot Analysis of AT2Rs and Endothelial NO Synthase Expression and Immunohistological Analysis of AT2Rs

For details, see the online data supplement.

Detection of ROS Using Confocal Microscopy in Resistance Arteries

ROS detection was performed on transverse cross-sections 7- μ m thick incubated with dihydroethydyne, as described previously.¹⁶ Positive staining using confocal microscopy and image analysis was performed as described above.

Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Significance of the differences between groups was determined by ANOVA: 2-factor ANOVA on the whole curve or 1-way ANOVA followed by a Bonferroni test. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

AT2R blockade with PD123319 (10 μ mol/L) significantly reduced FMD in young rats (Figure 1A) and significantly increased FMD in old rats (Figure 1B). In old rats, the effect of PD123319 on FMD was more pronounced in the range of low flow rates (until 21 μ L/min; Figure 1B). After treatment with hydralazine in young rats, PD123319 also reduced FMD (Figure 1C). This effect of PD 123319 was not significant using a 2-factor ANOVA on the whole curve, but a significant effect was found for the flow range 15 to 30 μ L/min when using a 1-way ANOVA followed by a Bonferroni test. In old rats treated with hydralazine, PD123319 had no significant effect on FMD (Figure 1D).

Western blot analysis performed in MRA showed that AT2R expression was significantly higher in old versus young rats. Hydralazine had no significant effect on AT2R

expression level in old rats but significantly increased AT2R expression in young rats (Figure 1E).

In MRAs, AT2R was visualized using confocal microscopy and fluorescent angiotensin II in the presence of candesartan. AT2Rs were present in both the endothelium and the tunica media in young and old rats. Nevertheless, in old rats, AT2R density in the endothelium was 3 times lower than in young rats (Figure 2). Hydralazine had no significant effect on AT2R location (Figure 2). Negative control (in the presence of PD 123319 or in the absence of fluorescent angiotensin II) showed the absence of labeling.

Acute stimulation of AT2R with angiotensin II in the presence of candesartan induced dilation in young rats, which was not significantly affected by hydralazine (Figure 3A through 3E). Removal of the endothelium (Figure 3A) and NO synthesis blockade (L-NAME; Figure 3B) suppressed AT2R-dependent dilation in young rats, whereas the indomethacin did not affect AT2R-dependent dilation (Figure 3C). AT2R blockade with PD 123319 abolished the dilation (Figure 3D), and bradykinin B2 receptor blockade with HOE 140 (Figure 3E) significantly decreased AT2R-dependent dilation in young rats treated or not treated with hydralazine.

In old rats, AT2R stimulation induced contraction (Figure 3A through 3E). In old rats treated with hydralazine, AT2R-dependent contraction was suppressed. Endothelium removal (Figure 3A), NO synthesis blockade (L-NAME; Figure 3B), cyclooxygenase blockade with indomethacin (Figure 3C), and bradykinin B2 receptor blockade with HOE 140 (Figure 3E) did not affect AT2R-dependent contraction (Figure 3A). AT2R blockade with PD 123319 abolished AT2R-induced contraction in old rats (Figure 3D).

Antioxidant treatment of the isolated MRA with Tempol did not affect AT2R-dependent dilation in young rats, but it suppressed AT2R-dependent contraction on old rats (Figure 4A). ROS were detected using dihydroethydyne staining and confocal microscopy (Figure 4B). In old rats, ROS level was significantly higher in the endothelium and in the smooth muscle cell layer than in young animals (Figure 4C). Hydralazine had no significant effect on ROS production in young rat arteries. In old rats, hydralazine significantly reduced the ROS level in both endothelial and smooth muscle cells (Figure 4C).

Discussion

This study identified a paradoxical role of the AT2R in resistance arteries isolated from old rats. Stimulation of AT2R by endogenous (in response to shear stress) or exogenous angiotensin II induced contraction through the production of ROS by smooth muscle cells in old rats. This effect contrasts with AT2R-dependent dilation in young rats. A treatment with hydralazine improved FMD in old rats through a strong reduction in ROS production.

Myogenic tone was lower in old versus young rats as shown previously in mesenteric and coronary arteries.^{17,18} Aging was also associated with a decreased FMD with a rightward shift of the flow rate response curve (lower sensitivity) and a decreased maximal response. This is in agreement with previous reports in large arteries,^{3,19} in rat soleus feed arteries,²⁰ and in the human brachial circulation.¹¹

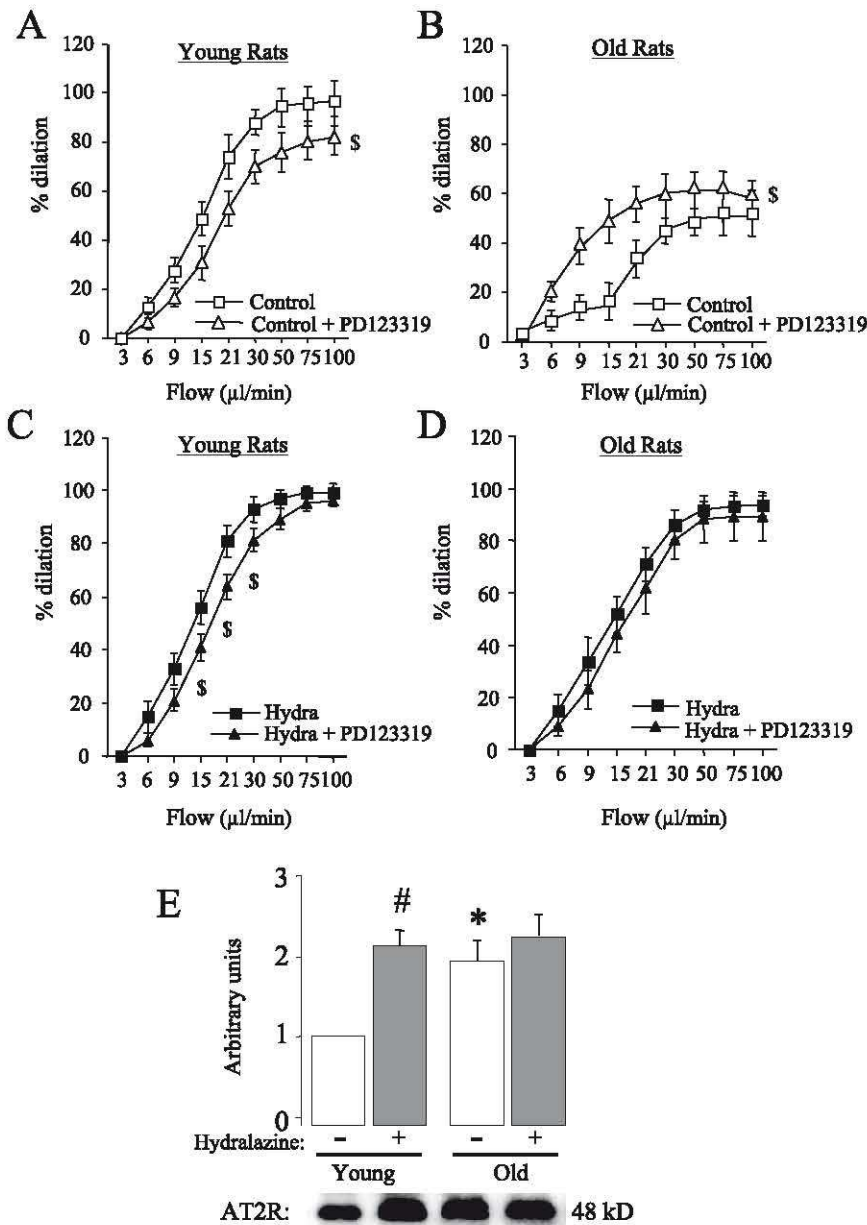


Figure 1. Effect of the AT2R antagonist PD123319 on flow-mediated dilation. Diameter changes in response to step-wise increases in flow in MRA were measured before and after the addition of PD123319. Arteries were isolated from young (A and C) or old (B and D) rats treated with hydralazine (hydra; C and D) or water (control, A and B). E, Expression level of AT2R measured by Western blot analysis in MRA isolated from old or young rats treated with hydralazine (+) or water (-). Mean±SEM is presented (n=12 old rats per group). *P<0.01, old vs young rats. #P<0.01, effect of hydralazine. \$P<0.01, effect of PD123319.

In parallel, we found in old rats a decreased involvement of NO in FMD, suggesting a decreased endothelial NO synthase activity, as shown previously.²⁰⁻²²

The presence of AT2R in the adult vasculature is now well recognized, although its role remains a matter of controversy.²³⁻²⁵ Our previous works suggest that AT2R stimulation, which does not induce desensitization, might have a role in hypertensive patients treated with AT1R blockers.²⁶ Indeed, AT1R blockers induce AT2R overexpression and increase circulating angiotensin II.²⁵

We found that AT2R-dependent dilation in MRAs (young rats) depended on the presence of the endothelium and was inhibited by NO-synthesis blockade and bradykinin B2 receptor blockade, whereas cyclooxygenase inhibition with indomethacin did not affect the dilation. These findings are in agreement with our previous reports in the same arterial bed^{2,13,14,26} and in other arteries.²⁵ The involvement of the

bradykinin B2 receptor in AT2R-dependent dilation has been described in several vascular territories, including the mesentery,²⁷ and in the renal circulation.²⁸ Heterodimerization of bradykinin B2 receptor and AT2R might occur²⁹ after AT2R stimulation to activate NO production in endothelial cells. This interaction between the 2 receptors might be efficient in the 2 directions, because bradykinin B2 receptor dilation involved in FMD is reduced by AT2R blockade in the mouse carotid artery.³⁰ On the other hand, AT2R located on smooth muscle cells can downregulate Rho/Rho kinase activity, at least in conditions inducing AT2R upregulation, such as chronic AT1R blockade in hypertensive rats.³¹

A main new finding of the present study is that FMD was counteracted by AT2R-dependent contraction in old rats. This effect was mainly significant with low flow values. Stimulation of AT2R by exogenous angiotensin II also produced a vasoconstriction in old rats, which was not suppressed by

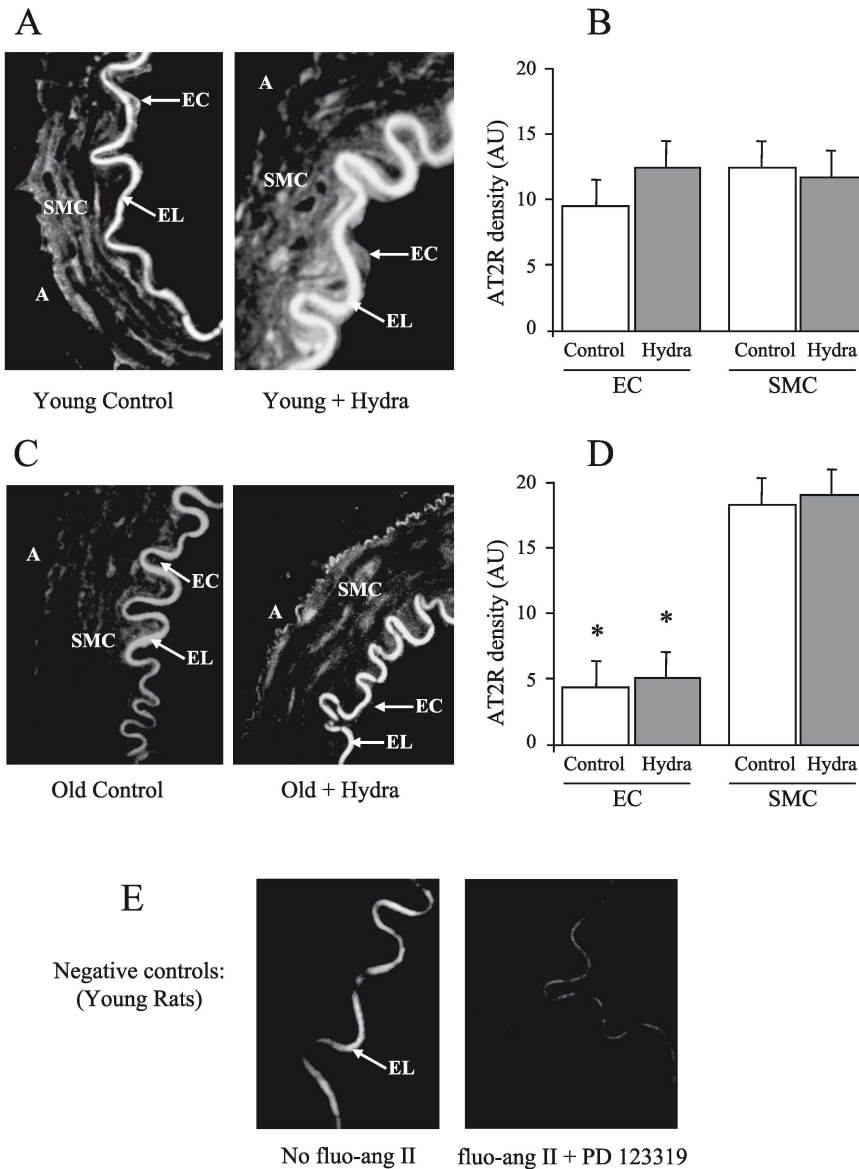


Figure 2. Localization of AT2R using fluorescent angiotensin II and confocal microscopy in MRA isolated from young (A and B) or old (C and D) rats treated with hydralazine (hydra) or water (control). Bar graphs (B and D) show the quantification of the AT2R in the endothelial cell (EC) layer and in the smooth muscle cells (SMC) layer. “EL” and “A” designate the elastic lamina and the adventitia, respectively. E, Negative control experiments without fluorescent angiotensin II (fluo-angII) or with fluorescent angiotensin II plus the AT2R antagonist PD 123319. **P* < 0.01, old vs young. n = 12 rats per group.

endothelium removal. In old rats, AT2R expression was higher than in young animals, and AT2Rs were mainly located to the smooth muscle cells layer. Finally, AT2R-dependent contraction was suppressed by the antioxidant Tempol. Thus, in aging, AT2Rs located in the smooth muscle layer induced ROS-dependent contraction.

We have previously observed AT2R-induced contraction in spontaneously hypertensive rats, also in association with a preferential muscular location, although the expression level of AT2R is low in spontaneously hypertensive rats.² In spontaneously hypertensive rats, AT2R function depends on blood pressure. AT2R-induced contraction occurs with high blood pressure and AT2R-induced dilation with normal blood pressure.²

In addition, AT2R-dependent contraction in old-rat resistance arteries was suppressed by the antioxidant Tempol, whereas it was unaffected by endothelium removal or indomethacin. Thus AT2R-dependent contraction was mediated by ROS. Angiotensin II-induced contraction through AT1R

also involves ROS in pathological situations.³² Thus, AT2R in aging, at least in MRAs, might induce contraction through a similar mechanism. Aging was associated with a high basal ROS production in resistance arteries, as shown in other cell types.³³ Further supporting the key role of ROS in AT2R-dependent contraction, we found that hydralazine, which reduced ROS level in arteries from old rats, also suppressed AT2R-induced contraction.

The probability of developing cardiovascular diseases requiring a treatment with AT1R blockers or angiotensin-converting enzyme inhibitors increases with age. AT1R blockers induce AT2R overexpression and increase circulating angiotensin II.²⁵ Both effects should produce additional vasodilation and, thus, increase the protective effect of AT1R blockade. Nevertheless, this protective effect in patients treated with AT1R blockers may not occur in old patients, unless AT2R-dependent contraction is reversed by vasodilator treatments in aging as it is in hypertension.² This is possible, because hydralazine suppressed AT2R-related contraction in the present study.

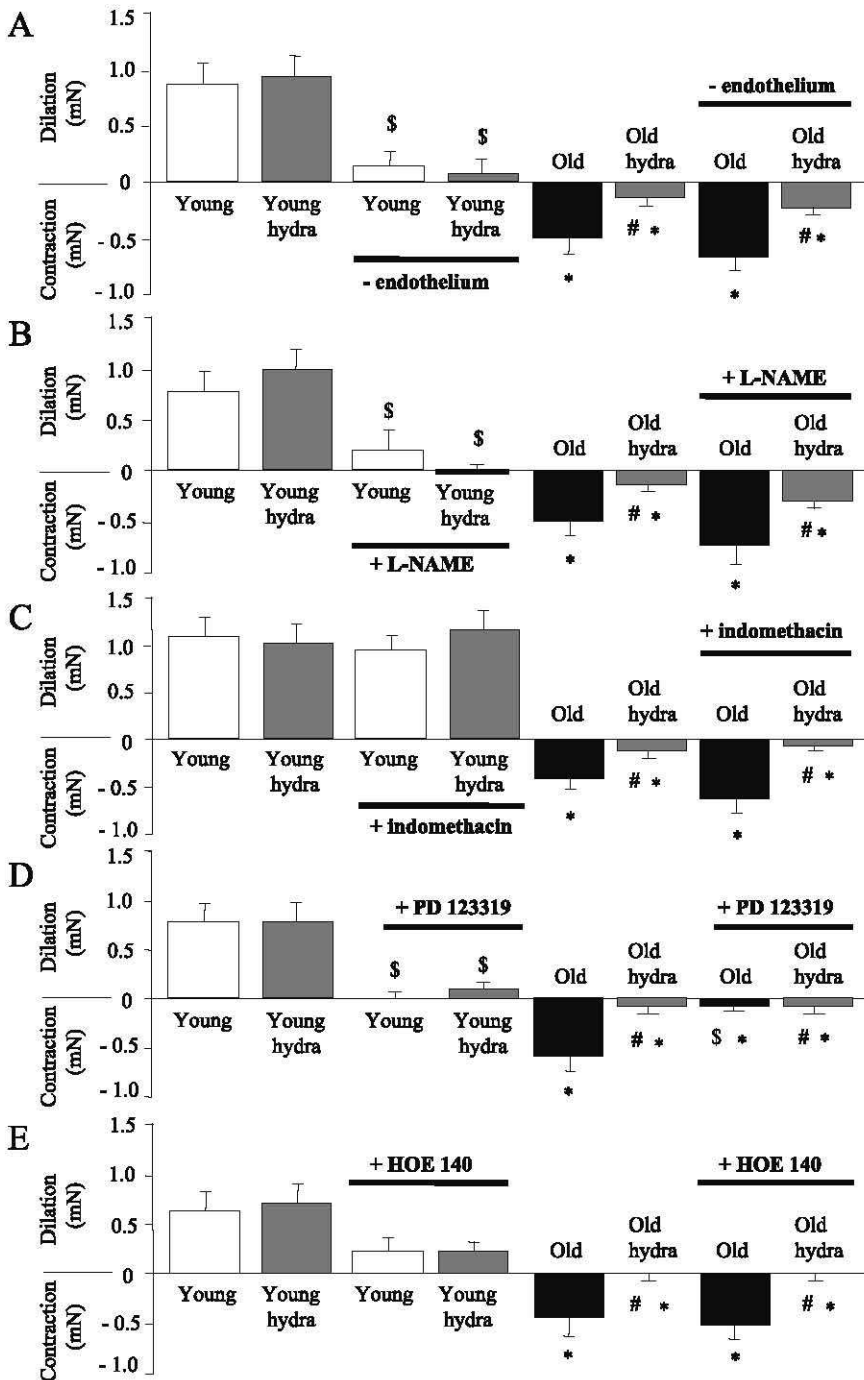


Figure 3. Contraction or dilation induced by angiotensin II measured in the presence of candesartan (AT2R-dependent effect) in MRAs isolated from old or young rats treated with or without hydralazine (hydra). A, Effect of AT2R stimulation with or without endothelium. B, Effect of AT2R stimulation with or without NO synthesis blockade with L-NAME (100 μ mol/L). C, Effect of AT2R stimulation with or without cyclooxygenase inhibition (indomethacin: 10 μ mol/L). D, Effect of AT2R stimulation with or without AT2R blockade (PD 123319: 10 μ mol/L). E, Effect of AT2R stimulation with or without bradykinin B2 receptor blockade (HOE 140: 10 μ mol/L). * P <0.01, old rats vs the corresponding group in young rats. # P <0.01, effect of hydralazine. \$ P <0.01, effect of endothelium removal (A), L-NAME (B), indomethacin (C), PD 123319 (D), or HOE 140 (E). n=12 rats per group.

The beneficial effect of hydralazine on FMD in old rats is the second new finding of the present study. First, in hydralazine-treated old rats, FMD was restored to the control level in association with an increased NO-dependent tone. Second, hydralazine suppressed AT2R-dependent contraction in old rats. The possibility to restore FMD to control level in old rats is a key finding showing that, in resistance arteries, the alteration is not irreversible. We have shown previously that a chronic treatment with hydralazine improves FMD in association with outward hypertrophic remodeling because of increased mesenteric blood flow.¹⁵ This is associated with an increased endothelial NO synthase expression in arteries from hydralazine-treated rats.¹⁵

In old rats, outward remodeling also occurred (as shown by an increased passive arterial diameter) in hydralazine-treated rats. Nevertheless, endothelial NO synthase expression did not increase in old rats treated with hydralazine, although NO-dependent tone (efficacy of L-NAME) increased. In addition, in old rats treated with hydralazine, FMD was restored to control level, despite an absence of effect on endothelial NO synthase expression. Nevertheless, FMD was enhanced for 2 reasons: AT2R-induced contraction was suppressed, and NO-bioavailability was enhanced, as visualized by an increased efficiency of L-NAME in blocking FMD in old-rat resistance arteries. In both cases, ROS production had a central role. First, AT2R-induced contrac-

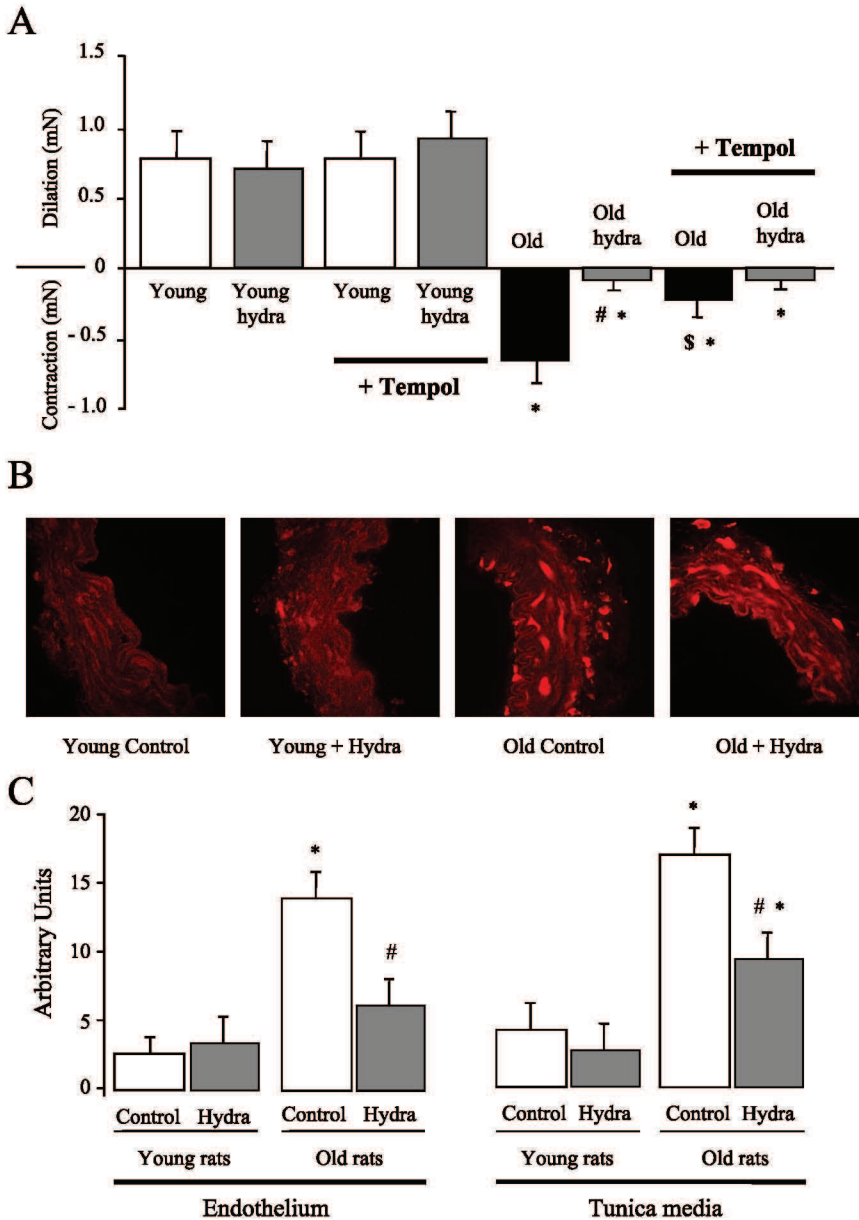


Figure 4. Effect of ROS reduction with Tempol (A) on AT2R-dependent contraction or dilation in MRAs isolated from old or young rats treated or not with or hydralazine (hydra). The level of ROS was measured in MRAs isolated from old or young rats treated with hydralazine (hydra) or water (control): typical image obtained with confocal microscopy (B) and quantification of ROS in the endothelium and the tunica media (C). * $P < 0.01$, old vs young rats. # $P < 0.01$, effect of hydralazine. \$ $P < 0.01$, effect of tempol (A). $n = 12$ rats per group.

tion depended on ROS production, and in hydralazine-treated rats, AT2R-induced contraction was absent in parallel with the strong decrease in ROS level. Thus, hydralazine most probably suppressed AT2R-induced contraction thanks to its antioxidant property. This observation is in agreement with previous studies demonstrating that hydralazine is an antioxidant.³⁴ Second, FMD might also be improved because of the increased bioavailability of NO found in arteries from hydralazine-treated old rats. Indeed, this effect might also be associated with the antioxidant property of hydralazine. We found that the level of ROS in mesenteric arteries was decreased after treatment with hydralazine in both endothelial and smooth muscle cells. This is in agreement with previous studies showing that a reduction in ROS production in response to flow, in diabetic animals, restores FMD to the control level.³⁵

Perspectives

We identified an important change in AT2R function in aging, because AT2R stimulated by flow (endogenous angio-

tensin II) or by exogenous angiotensin II induced a contraction involving the production of ROS. This contraction contributed to lower FMD. This alteration might affect the efficiency of the treatments used to fight vascular disorders in old patients. This observation is especially important, because the occurrence and severity of vascular diseases is largely related to vascular aging.³⁶ In addition, hydralazine improved FMD in resistance arteries from old rats, showing that the alteration is reversible. Hydralazine decreased ROS level in both endothelial and smooth muscle cells, thus improving FMD. This effect was because of the suppression of AT2R-induced contraction and through an increase of the NO availability.

Interestingly, the positive effect of hydralazine on FMD in old rats is comparable to the effect of exercise training.³⁷ Both hydralazine and exercise increase blood flow and FMD. Thus, the present finding also provides a possible explanation for the beneficial effect of exercise training on resistance

arteries in the elderly. Nevertheless, exercise training is not always possible or safe in the older patients. In this situation, hydralazine or other vasodilator treatment (to be tested) might be an alternative when improving endothelium-dependent tone is necessary.

Sources of Funding

This work was supported in part by a grant from the French Foundation for Medical Research (Paris, France). F.P. was supported by a grant from the French Federation of Cardiology (Paris, France). A.B. was supported by the Conseil Général du Maine et Loire. O.D. was supported by the Pays de la Loire Region. C.B. and D.H. were supported by an interface grant (Contrat d'Interface INSERM-CHU d'Angers).

Disclosures

None.

References

- Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation*. 2005;12:33–45.
- You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin ii type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2005;111:1006–1011.
- Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res*. 2005;66:286–294.
- Barton M. Ageing as a determinant of renal and vascular disease: Role of endothelial factors. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:485–490.
- Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Age-related changes in vascular responses. *Exp Gerontol*. 1999;34:503–512.
- Safar ME. Systolic hypertension in the elderly: arterial wall mechanical properties and the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Hypertens*. 2005;23:673–681.
- Irion GL, Vasthare US, Tuma RF. Age-related change in skeletal muscle blood flow in the rat. *J Gerontol*. 1987;42:660–665.
- Lawrenson L, Poole JG, Kim J, Brown C, Patel P, Richardson RS. Vascular and metabolic response to isolated small muscle mass exercise: Effect of age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1023–H1031.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005;144:449–458.
- Allen JD, Wilson JB, Tulley RT, Lefevre M, Welsch MA. Influence of age and normal plasma fibrinogen levels on flow-mediated dilation in healthy adults. *Am J Cardiol*. 2000;86:703–705, A709.
- Rajagopalan S, Brook R, Mehta RH, Supiano M, Pitt B. Effect of losartan in aging-related endothelial impairment. *Am J Cardiol*. 2002;89:562–566.
- Saka B, Oflaz H, Erten N, Bahat G, Dursun M, Pamukcu B, Mercanoglu F, Meric M, Karan MA. Non-invasive evaluation of endothelial function in hypertensive elderly patients. *Arch Gerontol Geriatr*. 2005;40:61–71.
- Matrougui K, Loufrani L, Heymes C, Levy BI, Henrion D. Activation of at(2) receptors by endogenous angiotensin ii is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension*. 1999;34:659–665.
- Matrougui K, Levy BI, Henrion D. Tissue angiotensin ii and endothelin-1 modulate differently the response to flow in mesenteric resistance arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2000;130:521–526.
- Gorny D, Loufrani L, Kubis N, Levy BI, Henrion D. Chronic hydralazine improves flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation in mouse mesenteric resistance arteries in vitro. *Microvasc Res*. 2002;64:127–134.
- Bagi Z, Toth E, Koller A, Kaley G. Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of no and bh(4). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H626–H633.
- Gros R, Van Wert R, You X, Thorin E, Husain M. Effects of age, gender, and blood pressure on myogenic responses of mesenteric arteries from c57bl/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H380–H388.
- Shipley RD, Muller-Delp JM. Aging decreases vasoconstrictor responses of coronary resistance arterioles through endothelium-dependent mechanisms. *Cardiovasc Res*. 2005;66:374–383.
- Luscher TF, Dohi Y, Tschudi M. Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19:S34–S42.
- Woodman CR, Price EM, Laughlin MH. Selected contribution: aging impairs nitric oxide and prostacyclin mediation of endothelium-dependent dilation in soleus feed arteries. *J Appl Physiol*. 2003;95:2164–2170.
- Spier SA, Delp MD, Meininger CJ, Donato AJ, Ramsey MW, Muller-Delp JM. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol*. 2004;556:947–958.
- Smith AR, Hagen TM. Vascular endothelial dysfunction in aging: Loss of akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (r)-alpha-lipoic acid. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1447–1449.
- Henrion D, Kubis N, Levy BI. Physiological and pathophysiological functions of the at(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension*. 2001;38:1150–1157.
- Levy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 2004;109:8–13.
- Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA. Angiotensin at2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol*. 2003;140:809–824.
- Widdop RE, Matrougui K, Levy BI, Henrion D. At2 receptor-mediated relaxation is preserved after long-term at1 receptor blockade. *Hypertension*. 2002;40:516–520.
- Soares de Moura R, Resende AC, Emiliano AF, Tano T, Mendes-Ribeiro AC, Correia ML, de Carvalho LC. The role of bradykinin, at2 and angiotensin 1–7 receptors in the edrf-dependent vasodilator effect of angiotensin ii on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol*. 2004;141:860–866.
- Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS, Carey RM. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol*. 1996;271:R1090–R1095.
- Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin b2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension*. 2006;48:316–322.
- Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P, Dong Y, Bloch-Faure M, Inagami T, Alhenc-Gelas F, Levy BI, Boulanger CM. Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin at2 receptors. *Circ Res*. 2004;94:1623–1629.
- Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Negative regulation of rhoa/tho kinase by angiotensin ii type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin ii-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2005;23:1037–1045.
- Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:1302–1314.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47–95.
- Daiber A, Mulsch A, Hink U, Mollnau H, Warnholtz A, Celze M, Munzel T. The oxidative stress concept of nitrate tolerance and the antioxidant properties of hydralazine. *Am J Cardiol*. 2005;96:251–361.
- Bagi Z, Koller A, Kaley G. Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1404–H1410.
- Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension*. 2005;46:454–462.
- Sun D, Huang A, Koller A, Kaley G. Decreased arteriolar sensitivity to shear stress in adult rats is reversed by chronic exercise activity. *Microcirculation*. 2002;9:91–97.

Notch3 Is a Major Regulator of Vascular Tone in Cerebral and Tail Resistance Arteries

E.J. Belin de Chantemèle, K. Retailliau, F. Pinaud, E. Vessières, A. Bocquet, A.L. Guihot, B. Lemaire, V. Domenga, C. Baufreton, L. Loufrani, A. Joutel, D. Henrion

Objective—Notch3, a member of the evolutionary conserved Notch receptor family, is primarily expressed in vascular smooth muscle cells. Genetic studies in human and mice revealed a critical role for Notch3 in the structural integrity of distal resistance arteries by regulating arterial differentiation and postnatal maturation.

Methods and Results—We investigated the role of Notch3 in vascular tone in small resistance vessels (tail and cerebral arteries) and large (carotid) arteries isolated from *Notch3*-deficient mice using arteriography. Passive diameter and compliance were unaltered in mutant arteries. Similarly, contractions to phenylephrine, KCl, angiotensin II, and thromboxane A2 as well as dilation to acetylcholine or sodium nitroprusside were unaffected. However, *Notch3* deficiency induced a dramatic reduction in pressure-induced myogenic tone associated with a higher flow (shear stress)-mediated dilation in tail and cerebral resistance arteries only. Furthermore, RhoA activity and myosin light chain phosphorylation, measured in pressurized tail arteries, were significantly reduced in *Notch3*KO mice. Additionally, myogenic tone inhibition by the Rho kinase inhibitor Y27632 was attenuated in mutant tail arteries.

Conclusions—Notch3 plays an important role in the control of vascular mechano-transduction, by modulating the RhoA/Rho kinase pathway, with opposite effects on myogenic tone and flow-mediated dilation in the resistance circulation. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:2216-2224.)

Key Words: resistance arteries ■ myogenic tone ■ Notch receptors ■ flow-mediated dilation
■ local blood flow regulation

Arteries are specified into different calibers and types of vessels to perform different functions. Schematically, the major arteries of the trunk are elastic arteries of large diameter and low resistance. Elastic conduit arteries absorb the hemodynamic stress of cardiac systole and release this energy in the form of sustained blood pressure during diastole. Conversely, distal arteries are muscular arteries of small diameter and high resistance that are critically involved in local regulation of blood flow. Resistance arteries possess a constant basal tone which is tightly regulated by two mechanical stimuli, ie, flow and pressure; basal tone provides the background tone on which other vasoactive systems may act synergistically.¹⁻³ Flow produces shear stress and triggers dilation, which depends in part on the production of nitric oxide and vasodilator agents, by the endothelial cells.^{1,4,5} Mechano-transduction of shear stress involves the extracellular matrix and cell structure proteins.⁶⁻⁸ Pressure-induced (myogenic) contraction is an inherent property of smooth muscle cells. However the robustness and nature of the response vary significantly with vascular bed and vessel

caliber.^{1,2} The cellular structures and signaling pathways involved in the mechano-transduction of pressure into constriction have not been completely elucidated. Signaling mechanisms require calcium entry as well as calcium-sensitization of the contractile apparatus. Several lines of investigation implicate actin polymerization in myogenic tone.⁹ Furthermore, the RhoA-Rho kinase signaling pathway is a key regulator of the calcium sensitivity and dynamic remodeling of the actin cytoskeleton,¹⁰ and we have recently shown that RhoA activation is essential for the development of myogenic tone.^{11,12}

The Notch signaling pathway is an evolutionarily conserved intercellular signaling mechanism that plays a central role during vascular development and physiology in vertebrates.¹³ The Notch family receptors comprise 4 highly conserved members in human and rodents (Notch1 to Notch4). Among these, Notch3 is primarily expressed in vascular smooth muscle cells,¹⁴ and, recent genetic studies in human and mice have highlighted an important role for this receptor in the development and homeostasis of distal arter-

Original received December 15, 2007; final version accepted September 10, 2008.

From INSERM U771 (E.J.B.d.C., K.R., E.V., A.B., A.L.G., L.L., D.H.), Angers; CNRS UMR 6214 (E.J.B.d.C., K.R., E.V., A.B., A.L.G., L.L., D.H.), Angers; Université d'Angers (E.J.B.d.C., K.R., E.V., A.B., A.L.G., L.L., D.H.), Angers; CHU d'Angers (F.P., C.B., D.H.), Angers; INSERM U740 (B.L., V.D., A.J.), Paris; Université Paris 7 - Denis Diderot (B.L., V.D., A.J.), Faculté de Médecine, Site Lariboisière, Paris; and AP-HP, Groupe hospitalier LARIBOISIERE-FERNAND-WIDAL (A.J.), Groupement hospitalier-universitaire Nord, Laboratoire de Génétique, Paris, France.

Correspondence to Daniel Henrion, PharmD, PhD, INSERM U 771, CNRS UMR 6214, Faculté de Médecine, 49045 Angers, France. E-mail daniel.henrion@univ-angers.fr

© 2008 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.171751

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> by guest on July 13, 2012

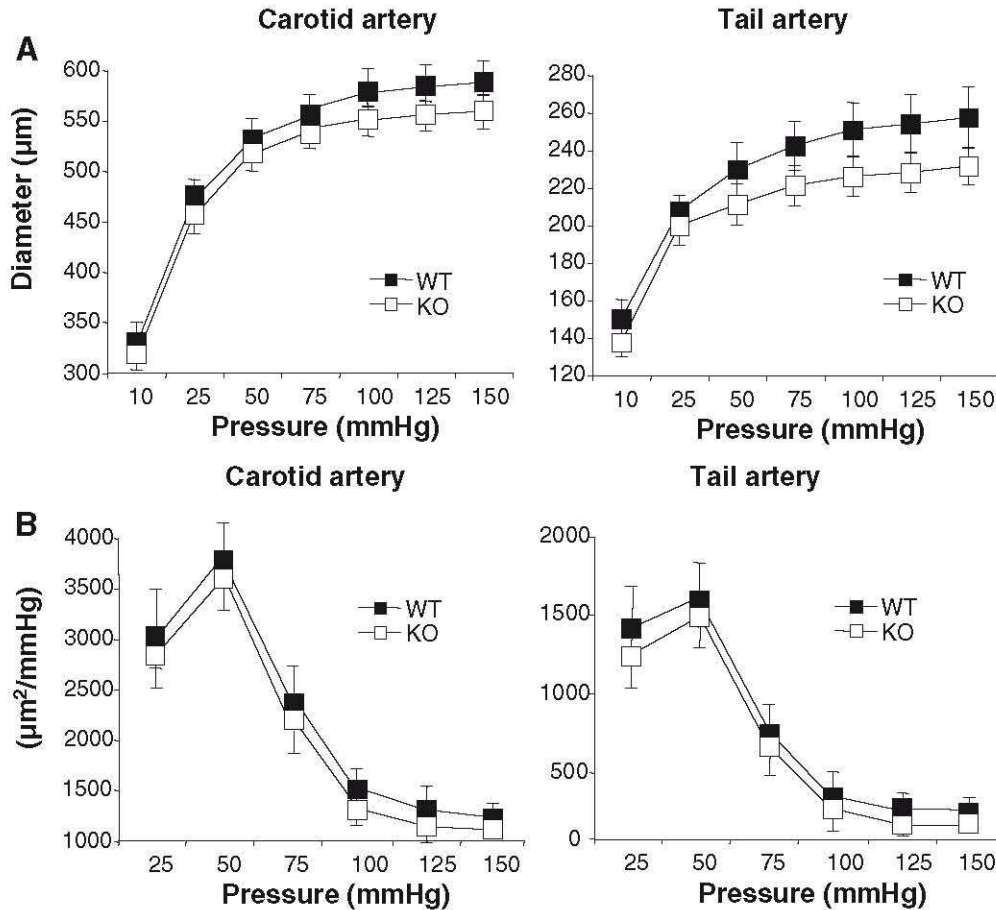


Figure 1. Passive diameter (A) and cross-sectional compliances (B) of carotid and tail caudal arteries from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice (mean±SEM, n=12 WT and 9 KO); NS, KO vs WT.

ies.¹⁵ In human, mutations of *NOTCH3* cause CADASIL, an autosomal dominant vascular dementia. Neurological symptoms arise because of a slowly progressive small-artery disease, characterized by progressive degeneration of smooth muscle cells of small brain arteries.¹⁶ In the mouse, targeted deletion of the *Notch3* gene does not affect viability nor fertility, but results in structural defects of distal arteries, particularly in the brain and the tail. Specifically, in the absence of *Notch3*, smooth muscle cells of distal arteries exhibit an abnormal shape and cytoskeleton because of an impaired arterial differentiation and postnatal maturation. It is noteworthy that major elastic arteries of the trunk appeared preserved at least at the histological level.^{17,18}

In this study we investigated the role of Notch3 in the function of small (resistance) and large (compliance) arteries. We examined the mechanical properties and vascular reactivity to vasoactive agents or mechanical stimuli of arteries from wild-type and *Notch3*-null mice. We assessed the tail caudal artery and the middle cerebral artery, as distal resistance vessels, and the common carotid artery, a compliance elastic artery with minimum role in arterial resistance. Consistent with our prior observation that elastic artery did not exhibit structural alteration, we found that the mechanical properties and vascular reactivity of mutant carotid arteries were preserved. Importantly, we found that in the tail caudal and middle cerebral arteries, absence of *Notch3* selectively

impaired the response to pressure and flow. Furthermore, RhoA activity and myosin light chain phosphorylation were reduced in pressurized mutant tail arteries, and myogenic tone inhibition elicited by the Rho kinase inhibitor Y-27632 was significantly attenuated in mutant tail arteries. Together these data support a specific role for Notch3 in the mechano-transduction of pressure and flow in the distal resistance arteries through a RhoA/Rho kinase pathway.

Materials and Methods

Notch3^{-/-} mice (KO) and their wild-type littermates (WT) were obtained by crossing *Notch3* heterozygous mice. Adult male mice (n=25 per group) were anesthetized for blood pressure measurement¹⁹ and then killed by CO₂ inhalation. Common carotid, mesenteric, middle cerebral, and tail caudal arteries were collected. Histology was performed as previously described.¹⁷

Pharmacological study was performed on 2-mm-long arterial segments mounted on a wire-myograph.²⁰ Contraction to Phenylephrine (PE), thromboxane A₂ mimetic (U46619)²¹ angiotensin II (AngII), and calcium was tested.²² Concentration-dependent relaxation in response to Acetylcholine (ACh) was performed with or without NO synthase blockade (L-NAME), or cyclooxygenase blockade (indomethacin).²³

Pressure (myogenic) and flow-dependent tone was determined in isolated arteries cannulated in a video monitored perfusion system.²⁴

For Western blotting arterial segments were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen (LN₂). Samples were analyzed for eNOS, p-eNOS, caveolin-1, α V-integrin and β 3-integrin, RhoA, P38, pP38, P42, pP42, P44, pP44, FAK, pFAK, MLC, and pMLC. Preliminary

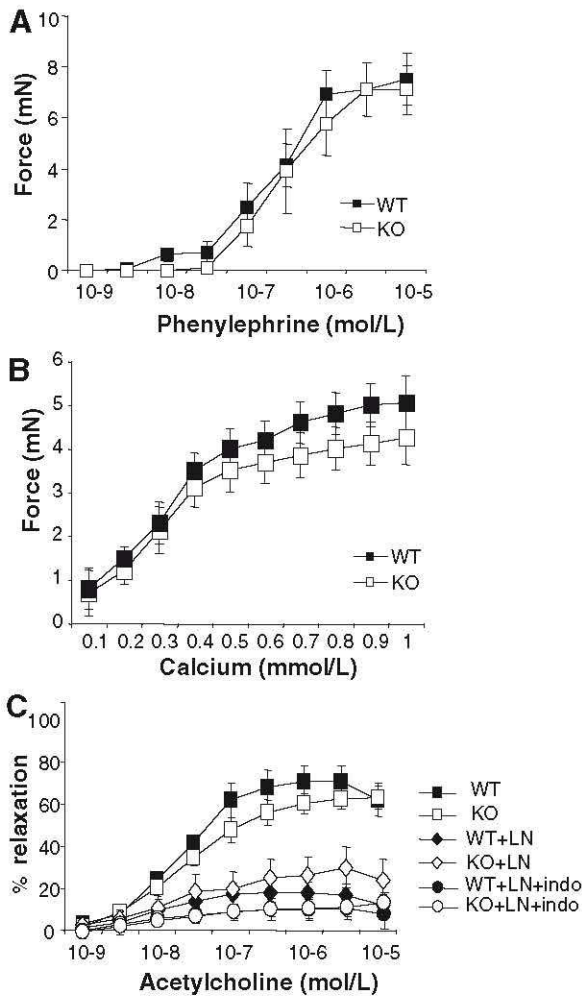


Figure 2. Contraction induced by phenylephrine (A) and calcium (B) and vasodilation induced by acetylcholine (C) in the presence of L-NAME (LN) or L-NAME plus indomethacin (LN+INDO) in tail arteries from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice (mean±SEM, n=12 WT and 9 KO). NS, KO vs WT.

immunoblot analysis showed that comparable results were obtained using freshly isolated arteries as compared to pressurized (75 mm Hg) arterial segments (supplemental Figure I, available online at <http://atvb.ahajournals.org>). RhoA activation was assessed as previously described²⁵ using a Rho-GTP pull-down assay kit.

Statistical Analysis

Results were expressed as means±SE. Significance of the differences between groups was determined by analysis of variance (ANOVA for consecutive measurements for pressure-diameter curves) or 1-way ANOVA followed by Bonferroni or paired *t* test. probability values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Structural and Mechanical Properties of KO Arteries

High-resolution optic microscopy showed structural defects of the mutant caudal artery and middle cerebral artery with thinning and disorganization of the tunica media as previously reported.¹⁷ By contrast, carotid artery of *Notch3*-null mice appeared indistinguishable from the one of WT mice (supplemental Figure II). To determine the effect of absence

Table. Pharmacological Profile of *Notch3*-Deficient (KO) and Wild-Type (WT) Mice Arteries

	Tail Artery		Carotid Artery		Units
	WT	KO	WT	KO	
Phenylephrine					
Emax	7.6±1.0	7.2±0.9	3.2±0.4	3.6±0.4	mN
EC50	323±78	358±65	45±8	37±7	nmol/L
Angiotensin II					
Emax	2.5±0.3	2.4±0.4	1.8±0.3	1.6±0.4	mN
EC50	3.8±0.7	5.1±0.8	39±6	35±6	nmol/L
U 46619					
Emax	6.3±1.0	5.6±0.8	4.8±0.3	5.2±0.5	mN
EC50	52±11	64±15	79±15	86±17	nmol/L
SNP					
Imax	98±2	96±3	98±3	95±4	% dilation
IC50	32±7	34±6	25±6	19±5	nmol/L

Contraction to phenylephrine, serotonin (5HT), angiotensin II, and U46619 as well as dilation to sodium nitroprusside (SNP) were obtained in tail and carotid arteries. EC₅₀ and IC₅₀ represent the concentration necessary to reach 50% of the maximal effect; E_{max} and I_{max} give the maximal effect of the drug (n=12 per group). NS, KO vs WT.

of *Notch3* on the passive properties of the vascular wall, arteries were submitted to stepwise increase in intraluminal pressure. Passive arterial diameter (Figure 1A; supplemental Figure VI) and arterial cross sectional compliance (Figure 1B and data not shown) were not significantly different in KO and WT mice.

KCl and Receptor-Dependent Contractions

The contraction induced by KCl (80 mmol/L) was not significantly affected by the absence of *Notch3* in carotid, tail caudal, and middle cerebral arteries (supplemental Figures III and VI). PE, Ang II, and U46619 produced a concentration-dependent contraction in carotid and tail caudal arteries. Importantly, contractile responses to these agonists were not significantly different between WT and KO mice (Figure 2A, and Table; supplemental Figures III and VI). Moreover, the Ca²⁺ dose-response curves in WT and mutant arteries were comparable (Figure 2B). Endothelium-dependent and -independent dilation.

Absence of *Notch3* did not significantly affect ACh-induced dilation in carotid, tail, and middle cerebral arteries (Figure 2C; supplemental Figures IV and VI). Inhibition of NO synthase by L-NAME decreased ACh-induced dilation in carotid and tail caudal arteries with the same potency in WT and KO mice in tail (Figure 2C) and carotid arteries (data not shown). Indomethacin did not significantly reduce ACh-induced dilation when added after L-NAME in WT and KO tail (Figure 2C) and carotid arteries (data not shown). Endothelium-independent relaxation (SNP) was similar in KO and WT mice (Table and data not shown).

Vascular Mechano-Transduction of Flow (Shear Stress) and Pressure

Myogenic tone was significantly decreased by 68% and 75% (measured from the decrease in diameter induced by a pressure of 75 mm Hg) in tail and cerebral arteries, respec-

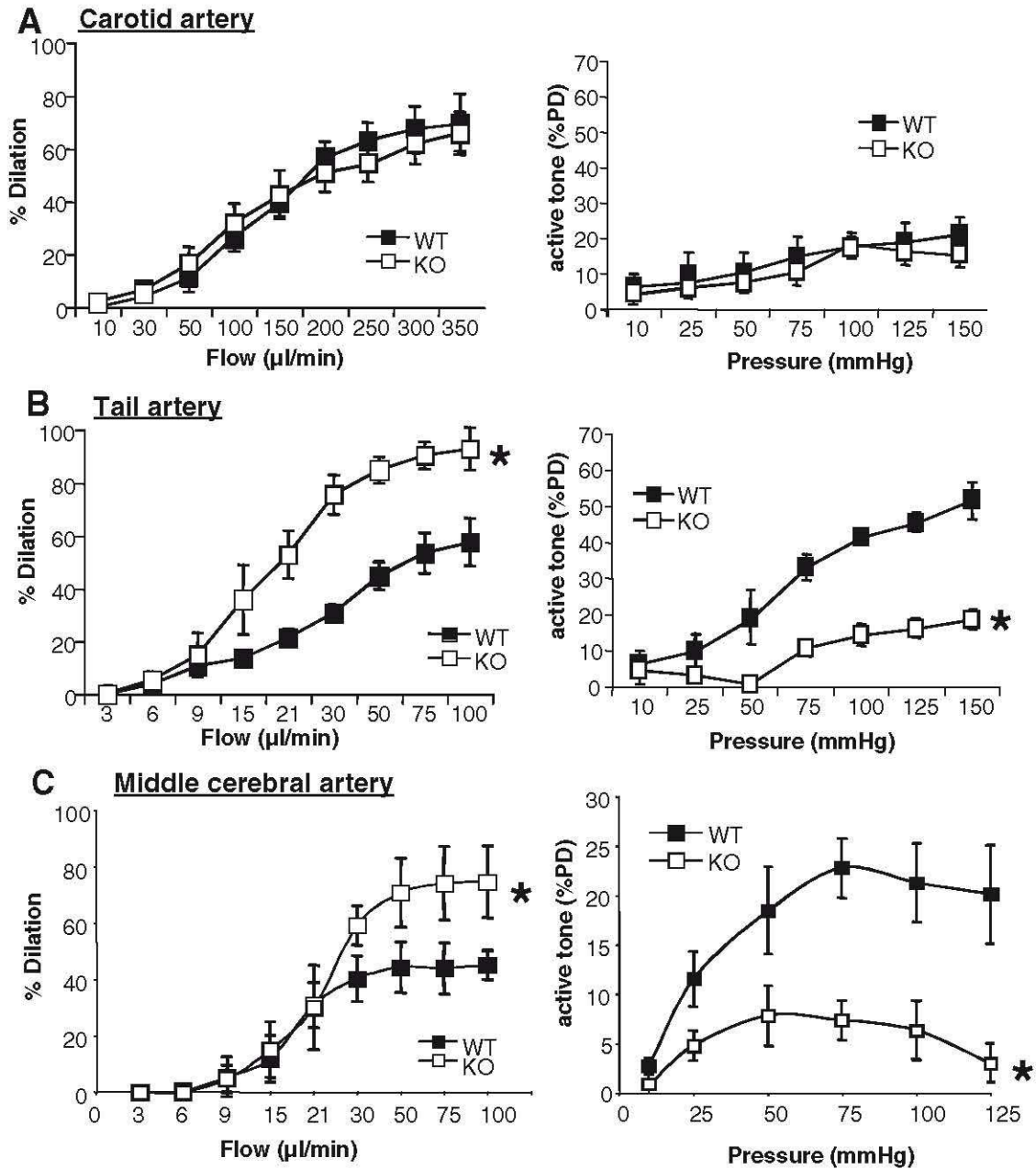


Figure 3. Response of carotid (A), tail (B), and middle cerebral arteries (C) from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) to stepwise increase in intraluminal pressure (Myogenic tone, right panel) or intraluminal flow (flow-mediated dilation, left panel) (mean±SEM, n=12 WT and 9 KO). *P<0.01, KO vs WT.

tively, from KO mice compared to WT animals. By contrast, pressure-induced contraction was not significantly different in KO and WT mice in carotid arteries (Figure 3, right panel).

Flow mediated dilation (FMD) was significantly higher in mutant tail and cerebral arteries (43% and 30% increase in FMD for a flow rate of 100 μL/min) as compared with WT arteries. FMD of WT and mutant carotid arteries were comparable (Figure 3, left panel). The precontraction level before FMD was similar in WT and KO mice (supplemental Figure V).

Biochemical Analysis

To investigate the mechanisms by which absence of *Notch3* affects mechanotransduction, we assessed the expression

level and activation (phosphorylation) of proteins possibly involved in myogenic tone (pP38, P38, pP42, P42, pP44, P44, MLC, pMLC),^{2,9,11} in FMD (peNOs, eNOs, Cav-1)¹ or in both (FAKs, pFAKs, αV-integrin and β3-integrin)^{1,2} in tail arteries. No difference in protein expression level between WT and mutant mice was found at the exception of pMLC, which was significantly decreased in mutant arteries (Figure 4).

To further analyze the mechanism involved in the decrease in myogenic tone, we examined the expression level and activity of RhoA. As shown in Figure 5 (A and B), *Notch3*-null mice exhibited a significant 46% reduction of RhoA activity, whereas RhoA protein level was unaltered as compared with wild-type mice.

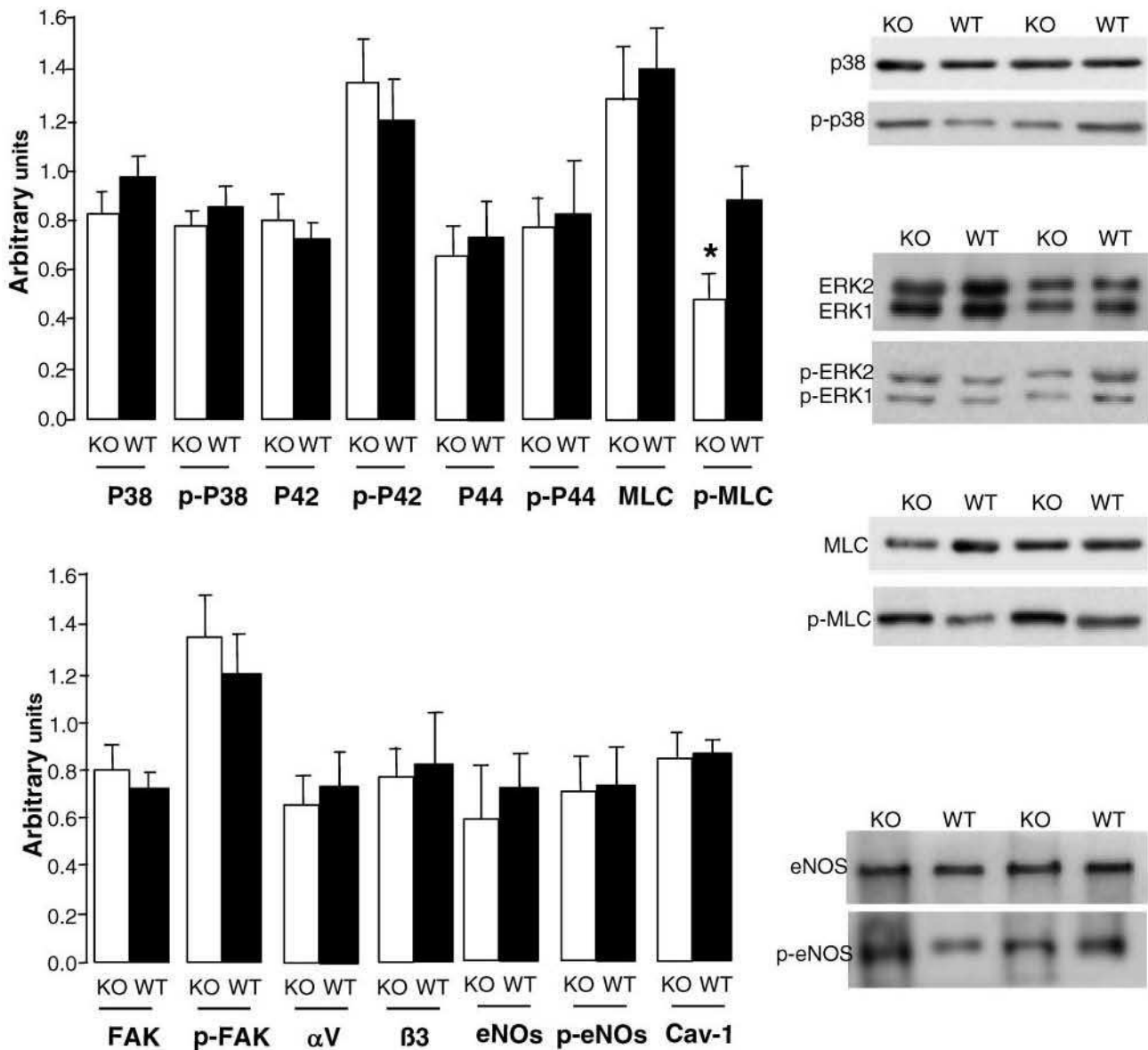


Figure 4. Expression level of the MAP kinase P38, P42, P44, FAK, alphaV integrin (α V), beta 3 integrin (β 3), myosin light chains (MLC), eNOS, and caveolin-1 (cav-1) in tail caudal arteries from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice. The level of phosphorylated proteins was determined as well (p-P38, p-P42, p-P44, p-FAK, p-MLC, and p-eNOS). Shown on the right are representative immunoblots (mean \pm SEM, n=6 per group). **P*<0.05, KO vs WT.

Effect of Rho-Kinase Inhibition

To confirm the involvement of the RhoA/Rho kinase pathway in the mechano-transduction defect observed in *Notch3*-null mice, we measured the relaxation induced by stepwise increase in the concentration of the Rho kinase inhibitor Y-27632. Myogenic tone was concentration-dependently inhibited by Y-27632. In control mice, complete inhibition was achieved with 10 μ mol/L Y-27632 whereas in *Notch3* deficient mice inhibition reaches only a maximum of 49% at the same dose (Figure 5C). We further assessed the relaxation induced by the Rho kinase inhibitor in tail arterial segments precontracted with KCl (60 mmol/L), PE (0.3 μ mol/L), or calcium (0.5 mmol/L). Remarkably, dose-response curves were not significantly different between WT and KO arterial segments (Figure 5D and 5E).

Discussion

Notch3, a Key Regulator of Vascular Tone in Small Arteries

Recently, we demonstrated that Notch3 is critically required for the structural integrity of small distal arteries whereas it appears dispensable for the structural integrity of large conductance arteries.¹⁷ In this study, we provide the first insight into how *Notch3* influences function of the arterial system. Consistent with the notion that Notch3 is dispensable for structural integrity of elastic arteries, we found that the mechanical properties and pharmacological profiles of carotid arteries were unaffected in mice completely lacking *Notch3*. Importantly, we found a significant decrease in myogenic tone and an enhanced flow-mediated dilation in isolated cerebral and tail caudal arteries. These alterations are

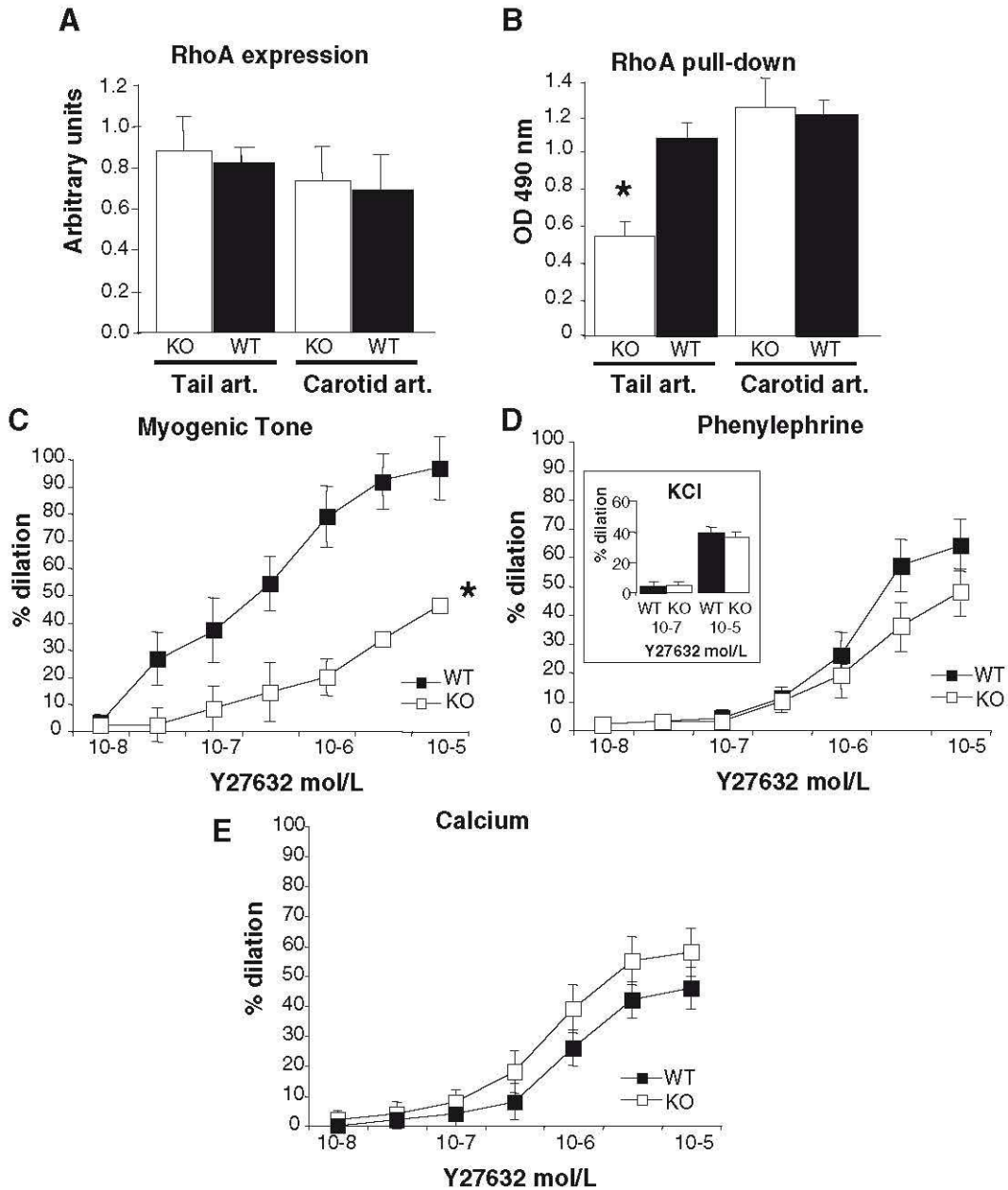


Figure 5. Quantification of RhoA expression level by Western blot (A) and RhoA activity by pull-down assay (B) in tail and carotid arteries. The inhibitory effect of the Rho-kinase inhibitor Y27632 (0.01 to 10 μ mol/L) was assessed on myogenic tone (C), phenylephrine- (D), KCl (inset in D) as well as on calcium-induced constriction (E) in the tail caudal artery (mean \pm SEM, n=6 per group). * P <0.01, KO vs WT.

unlikely to arise from a global dysfunction of vascular cells because both contraction and relaxation to pharmacological agents were unaffected. Hence, the results indicate that *Notch3* deficiency selectively impairs the function of small arteries and suggest a specific role for *Notch3* in the transduction of tensile and shear stress. We reported previously that in the absence of *Notch3* smooth muscle cells of distal arteries lack molecular markers of arterial smooth muscle cells and exhibit histological features of venous cells.¹⁷ Myogenic tone is an inherent property of arterial smooth muscle cells. Thus the present findings indicate that in the absence of *Notch3* smooth muscle cells of distal arteries lack an arterial phenotype also at the functional level and further

support the concept that *Notch3* is a key regulator of the arterial phenotype of smooth muscle cells.

The ability of small resistance arteries to develop myogenic tone is an important determinant of regional blood flow autoregulation as well as blood pressure.^{26,27} Our prior observation of strongly compromised autoregulation of cerebral blood flow in *Notch3*-null mice is consistent with the present finding of an impaired myogenic response in these mice. However, it is remarkable that basal blood pressure is normal in *Notch3*-null mice (supplemental Results).¹⁷ Although activation of cardiac or neurohumoral compensatory mechanisms in *Notch3*-null mice might solve this paradox, structural and functional analysis of additional resistance

arteries from *Notch3*^{-/-} mice suggests an alternative explanation. Specifically, high-resolution optic microscopy and electron microscopy of mesenteric arteries failed to detect structural defect of smooth muscle cells, although *Notch3* is strongly expressed in these cells (supplemental Figure II). Moreover, vasoreactivity to pharmacological agents and mechanical stimuli was similar in mutant and wild-type mesenteric arteries (supplemental Figure VII). Given the importance of large peripheral vascular beds such as the mesenteric bed in the control of arterial blood pressure a localized vascular change in reactivity is unlikely to cause a significant change in systemic blood pressure. In addition, myogenic tone is mostly involved in the short-term control of local blood flow, whereas hormonal vasoactive systems such as the sympathetic and renin-angiotensin systems have a major role in controlling systemic blood pressure.^{1,28} Thus these later findings suggest that *Notch3* is critically required for vascular tone in some vascular beds including at least the brain and the tail arteries, although being dispensable in others including the mesenteric bed.

How Does Notch3 Influence Myogenic Tone?

In resistance arteries, increase in intraluminal pressure induces a rapid cell architecture distension leading to the activation of stretch-dependent ion channels and voltage-operated Ca²⁺ channels²⁹ and ultimately of calmodulin and myosin light chain Kinase.³⁰ We^{11,12} and others³¹⁻³³ have demonstrated the key role played by the RhoA/Rho Kinase pathway in myogenic tone. Moreover, recent studies from our group¹² and others³⁴ support the hypothesis that activation of integrins and focal-adhesion kinase in caveolin-1 rich domains may participate in the Rho-kinase dependent sensitization of the contractile apparatus to calcium. In the present work, we provide evidence that *Notch3* is an upstream modulator of the RhoA/Rho kinase pathway. First, we show that RhoA activity is significantly decreased in the tail arteries lacking *Notch3*. Second, Rho kinase inhibition with Y-27632, in its range of selectivity, was minimally efficient in pressurized mutant tail arteries indicating that the RhoA/Rho kinase activity was reduced in response to pressure (myogenic tone) in the absence of *Notch3*. Third, myosin light chain phosphorylation was significantly reduced in mutant pressurized arteries. The observation that expression levels of integrins, focal adhesion kinase (FAK), ERK1/2, and MAP kinase P38 were not affected by the absence of *Notch3* suggest that *Notch3* activity is unrelated or lies downstream to these kinases. The RhoA/Rho kinase pathway has been widely shown to play a key role in the sensitization of the contractile apparatus in response to many vasoconstrictors such as angiotensin II, phenylephrine, or thromboxane A₂.¹⁰ However, our data here suggest that only the Rho kinase pathway activated in response to blood pressure elevation is modulated by *Notch3*. This supports the concept that *Notch3* is a key receptor in the signaling pathway translating pressure to contraction (myogenic tone). As previously mentioned, mutant tail arteries exhibit disorganized and disjunctional smooth muscle cells.¹⁷ Using specific inhibitors of gap junction, several studies^{31,35} reported the key

role played by cell adhesion in the process of myogenic tone but not agonist-induced vasoconstriction. Assembly of focal adhesion contacts as well as formation of actin filaments bundles (stress fibers) has been reported to be dependent on RhoA activation.³⁶ Indeed, RhoA participates in the formation of distinct patterns of actin organization and assembly of integrin complexes. It has been reported that, in epithelial cells, RhoA induces the establishment and maintenance of E-Cadherin mediated cell-cell adhesion. Furthermore inactivation of RhoA results in the dislocation of E-cadherin and its complex members from the adherent junction leading to loss of cell-cell adhesion.³⁷ The reduced RhoA activity observed in the *Notch3*-null mice is thus certainly linked to the impaired myogenic tone and to the structural dysfunction observed in vascular smooth muscle cells. Nevertheless further studies are necessary to clarify the exact relationship between *Notch3* and RhoA activation.

How Does Notch3 Activity Influence Flow-Mediated Dilatation?

In the present study we also demonstrated that *Notch3*-null mice exhibited an increased FMD. In endothelial cells, transduction of shear stress into dilation involves integrin-matrix interactions³⁸ at focal adhesions.³⁹ FAK activation leads to the phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) that triggers eNOS activation via the PI3K-Akt pathway.⁴⁰ Because *Notch3* deficiency did not affect calcium-dependent eNOS activation (ACh), or the effects of eNOS blockade (L-NAME) on ACh-induced dilation, our results rather reflect an increase in shear stress transduction than an enhanced endothelial function.

Several reports show that the preexisting myogenic tone regulates the vascular response to shear stress.^{41,42} According to the latter authors, the higher the intraluminal pressure, the higher the myogenic tone and the less negative the resting membrane potential. It would be expected that the open probability time of endothelial potassium channels involved in the FMD would be decreased, whereas the open probability time of voltage-activated calcium channels associated with constriction in vascular smooth muscle would be increased.²⁹ We expect the opposite to be true, ie, an enhanced FMD in arteries with an attenuated myogenic tone. Nevertheless, the change in myogenic tone could not directly influence the measurement of FMD because of the similar degree of precontraction applied to arteries from WT and KO mice. It is most likely that the reduced basal tone occurring in vivo influences the sensitivity of the flow-sensing process, although the mechanism involved remains to be determined. Increased FMD in the absence of *Notch3* would thus rather reflect an increased vascular smooth muscle cell capability to dilate in response to shear than an increase endothelium capability to induce dilation. We previously showed that transgenic mice expressing a mutant *Notch3* protein, with the R90C mutation (*TgNotchR90C*), whose expression was specifically targeted in arterial smooth muscle exhibited an increase in myogenic tone associated with a decrease in FMD without endothelial dysfunction.¹¹ The lack of endothelial dysfunction in these latter mice is one more argument in favor of a regulation of FMD by the preexisting myogenic tone. At

the present time interpretation of the finding that *TgNotchR90C* and *Notch3 KO* mice exhibit opposite vascular dysfunction remains unclear since both in vitro and in vivo analyses showed that the R90C mutation did not impair canonical Notch3 activity.^{43,44}

In summary, the present study provides, to the best of our knowledge, the first evidence that Notch3 controls, through the RhoA/ROK signaling pathway, vascular reactivity to the mechanical factors, pressure, and flow. Moreover, *Notch3*-null mice, because of their highly specific defects, provide an invaluable experimental model to dissect the pathways specifically involved in the modulation of myogenic tone. Finally, our work highlights Notch3 as a novel pathway for therapeutic targeting in vascular diseases where changes in myogenic responses and vascular autoregulation are thought to play a role.

Sources of Funding

This work was supported by the ANR (Agence Nationale de la Recherche) - Maladies Rares (Paris, France) and by the NIH (National Neurological Disorders and Stroke Institute grant R01 NS 054122). DH and AJ were supported by an "INTERFACE" grant (contrat d'interface INSERM-CHU d'Angers, DH and INSERM-AP-HP, AJ). E.J. Belin de Chantemèle was a recipient of a postdoctoral fellowship from the CNES.

Disclosures

None.

References

- Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98:913–921.
- Hill MA, Davis MJ, Meininger GA, Potocnik SJ, Murphy TV. Arteriolar myogenic signalling mechanisms: Implications for local vascular function. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;34:67–79.
- Dowell FJ, Henrion D, Benessiano J, Poitevin P, Levy B. Chronic infusion of low-dose angiotensin II potentiates the adrenergic response in vivo. *J Hypertens*. 1996;14:177–182.
- Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest*. 2001;107:23–25.
- Qiu HY, Henrion D, Levy BI. Alterations in flow-dependent vasomotor tone in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1994;24:474–479.
- Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, Maclour J, Samuel JL, Levy BI, Michel JB. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br J Pharmacol*. 1997;121:83–90.
- Loufrani L, Matrougui K, Gorny D, Duriez M, Blanc I, Levy BI, Henrion D. Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation*. 2001;103:864–870.
- Loufrani L, Levy BI, Henrion D. Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res*. 2002;91:1183–1189.
- Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *Faseb J*. 2002;16:72–76.
- Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*. 2006;98:322–334.
- Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension*. 2005;45:974–979.
- Dubroca C, Loyer X, Retailleau K, Loirand G, Pacaud P, Feron O, Balligand JL, Levy BI, Heymes C, Henrion D. RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. *Cardiovasc Res*. 2007;73:190–197.
- Hofmann JJ, Iruela-Arispe ML. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res*. 2007;100:1556–1568.
- Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Bataill N, Piga N, Chapon F, Godfrain C, Tournier-Lasserre E. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest*. 2000;105:597–605.
- Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*. 2007;134:2709–2718.
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillon M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*. 1996;383:707–710.
- Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjkowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev*. 2004;18:2730–2735.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Sundberg JP, Beatus P, Lendahl U, Joutel A, Gridley T. Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis*. 2003;37:139–143.
- Baron-Menguy C, Bocquet A, Guihot AL, Chappard D, Amiot MJ, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic. *Faseb J*. 2007;21:3511–3521.
- Loufrani L, Henrion D, Chansel D, Ardaillou R, Levy BI. Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291:583–588.
- Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane-induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res*. 2002;39:353–360.
- Loufrani L, Henrion D. Vasodilator treatment with hydralazine increases blood flow in mdx mice resistance arteries without vascular wall remodeling or endothelium function improvement. *J Hypertens*. 2005;23:1855–1860.
- Ben Driss A, Devaux C, Henrion D, Duriez M, Thuillez C, Levy BI, Michel JB. Hemodynamic stresses induce endothelial dysfunction and remodeling of pulmonary artery in experimental compensated heart failure. *Circulation*. 2000;101:2764–2770.
- Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloproteinase-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:317–324.
- Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, Loirand G, Pacaud P. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005;96:1152–1160.
- Bevan JA, Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *Faseb J*. 1991;5:2267–2273.
- Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation*. 2005;12:33–45.
- Schubert R, Mulvany MJ. The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond)*. 1999;96:313–326.
- Wellman GC, Bevan JA. Barium inhibits the endothelium-dependent component of flow but not acetylcholine-induced relaxation in isolated rabbit cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;274:47–53.
- Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999;79:387–423.
- Lagaud G, Gaudreault N, Moore ED, Van Breemen C, Laher I. Pressure-dependent myogenic constriction of cerebral arteries occurs independently of voltage-dependent activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2187–H2195.
- Schubert R, Kalentchuk VU, Krien U. Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2288–H2295.
- Gokina NI, Park KM, McElroy-Yaggy K, Osol G. Effects of Rho kinase inhibition on cerebral artery myogenic tone and reactivity. *J Appl Physiol*. 2005;98:1940–1948.
- Martinez-Lemus LA, Crow T, Davis MJ, Meininger GA. alpha5beta3- and alpha5beta1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of

- skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H322–H329.
35. Earley S, Resta TC, Walker BR. Disruption of smooth muscle gap junctions attenuates myogenic vasoconstriction of mesenteric resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2677–H2686.
36. Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*. 2004;377:327–337.
37. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*. 1997;139:1047–1059.
38. Muller JM, Chilian WM, Davis MJ. Integrin signaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res*. 1997;80:320–326.
39. Koshida R, Rocic P, Saito S, Kiyooka T, Zhang C, Chilian WM. Role of focal adhesion kinase in flow-induced dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2548–2553.
40. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399:601–605.
41. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol*. 1991;261:H1706–H1715.
42. Thorin-Trescases N, Bevan JA. High levels of myogenic tone antagonize the dilator response to flow of small rabbit cerebral arteries. *Stroke*. 29:1194–1200, 1998; discussion 1200–1191.
43. Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E. Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling Pathway. *Am J Hum Genet*. 2004;74:338–347.
44. Monet M, Domenga V, Lemaire B, Souilhols C, Langa F, Babinet C, Gridley T, Tournier-Lasserre E, Cohen-Tannoudji M, Joutel A. The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Hum Mol Genet*. 2007;16:982–992.

Increased cerebral blood flow velocities assessed by transcranial Doppler examination is associated with complement activation after cardiopulmonary bypass

C Baufreton¹, F Pinaud¹⁻⁴, JJ Corbeau², A Chevailler³, D Jolivot¹, A Ter Minassian², D Henrion⁴, JL de Brux¹

Abstract

The role of complement activation on the cerebral vasculature after cardiopulmonary bypass (CPB) is unclear. The goal of the study was to assess whether heparin-coated CPB reduces complement activation, and influences cerebral blood flow velocities (CBFV). Twenty-four patients undergoing coronary surgery were randomly allocated to non-coated (NC-group) or heparin-coated (HC-group) CPB. Complement activation was assessed by measuring sC5b-9. Transcranial Doppler (TCD) was performed on middle cerebral arteries before and after CPB. Systolic (SV), diastolic (DV) and mean (MV) CBFV were measured. Significant increase of sC5b-9 ($p=0.003$) was observed in the NC-group and CBFV increased after CPB (SV by 27%, $p=0.05$; DV by 40%, $p=0.06$; MV by 33%, $p=0.04$) whereas no changes were detected in the HC-group. TCD values were higher in the NC-group than in the HC-group (SV, $p=0.04$; DV, $p=0.03$; MV, $p=0.03$) although cardiac index, systemic vascular resistance, haematocrit and $p\text{CO}_2$ were similar. Postoperative SV, DV and MV were significantly correlated with sC5b-9 ($r=0.583$, $p=0.009$; $r=0.581$, $p=0.009$; $r=0.598$, $p=0.007$, respectively). Increased CBFV after CPB are correlated to the level of complement activation and may be controlled by heparin-coated circuits.

Keywords

cerebral blood flow velocity; cardiopulmonary bypass; complement activation; transcranial doppler

Introduction

The management of cardiopulmonary bypass (CPB) in cardiac surgery is of major importance in order to avoid impaired cerebral perfusion. The impact of the systemic inflammatory response, triggered by CPB, on postoperative cerebral blood flow remains unclear. The ischaemia-reperfusion sequence imposed to vessels subjected to nearly complete diversion of the blood flow, such as coronary and pulmonary arteries, causes regional endothelial dysfunction¹. Cerebral vasculature also displays endothelial dysfunction, although not bypassed by CPB. Indeed, the endothelium-dependent relaxation of cerebral arterioles experimentally has been found altered by CPB in response to products of platelet activation². Using continuous arterial spin labelling perfusion magnetic resonance imaging, evidence of increased cerebral blood flow has been reported in patients after surgery and related to anaemia and aging³. These changes remain controversial^{4,5} and are difficult to be demonstrated easily, although transcranial Doppler (TCD) examination provides bedside

information about cerebral blood flow velocities (CBFV) in the main cerebral arteries. TCD monitoring that is widely performed in neurosurgical patients has not yet elucidated fully the role of the inflammatory response in the changes of CBFV⁶⁻⁸.

Patients undergoing CPB are exposed to a whole body inflammatory response, particularly through the

¹Department of Cardiac Surgery, University Hospital, Angers, France

²Department of Anaesthesiology, University Hospital, Angers, France

³Laboratory of Immunology University Hospital, Angers, France

⁴UMR-CNRS 6214, INSERM 771, University of Angers, Angers, France

Corresponding Author:

Christophe Baufreton
 Department of Cardiac Surgery, University Hospital
 4 rue Larrey, F-49933
 Angers Cedex 09,
 France
 Email: ChBaufreton@chu-angers.fr

complement pathway activation. C5a receptor expression on astrocytes plays an important role in controlling the inflammation in the human brain^{9,10}. The goal of our study was to evaluate the effect of complement activation on the CBFV in patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) with CPB. An extracorporeal perfusion setting using heparin-coated CPB served to reduce the complement activation in order to demonstrate whether this inflammatory cascade is associated with the development of cerebral vasomotor dysfunction as assessed by CBFV changes.

Materials and Methods

Design of the study

This study was approved by the local ethical committee of our institution and written, informed consent was obtained from all patients. Patients scheduled for elective primary CABG revascularization were enrolled at the preadmission visit. Exclusion criteria included clinical conditions expected potentially to influence the magnitude of the systemic inflammatory response after surgery, such as open-heart surgery, women because they show higher complement activation after surgery¹¹, redo cases, organ dysfunction as defined in the EuroSCORE¹², such as chronic airway disease or renal dysfunction with a creatinine level greater than 200 $\mu\text{mol/L}$, patients with a left ventricular ejection fraction less than 0.30, diabetes mellitus under insulin therapy before the operation, presence of active inflammatory disease or patients taking anti-inflammatory drugs (except acetylsalicylic acid). Significant carotid artery stenoses (>70%) at the preoperative echo-Doppler examination were also retained as exclusion criteria because of their possible influence on CBFV.

Twenty-four patients were randomly assigned by computerization (GraphPad StatMate™ 1.01, San Diego, CA, USA) to receive non-coated (NC) extracorporeal circuits (n=12) or heparin-coated (HC) extracorporeal circuits (n=12) for the CPB procedure. Investigators not present in the operating room, but who were involved in the biochemical assessment, were blinded to the randomization.

Anaesthesia and haemodynamics

Anaesthesia was induced and maintained by weight-related doses of sufentanil, midazolam, and pancuronium bromide (total doses <250 μg , 15 mg and 16 mg, respectively). All patients received cefamandole as antibiotic prophylaxis: 1.5 g after induction of anaesthesia, with re-injection of 750 mg every 2 hours till skin closure. Tranexamic acid (Exacyl, Sanofi Winthrop, Paris, France) was used routinely (100 mg/kg if creatinine blood level was <100 $\mu\text{mol/L}$; 50 mg/kg otherwise). Monitoring included a radial arterial line, a pulmonary catheter for continuous cardiac output measurement (Swan-Ganz

CCO/VIP, Baxter, Irvine, CA) and pressure monitoring kits (Baxter).

Surgical procedure

All the patients were operated on by the same surgeon. The CPB was installed between an arterial catheter in the ascending aorta and a venous catheter, using a two-stage cannula, in the right atrium. The proximal anastomoses were performed first on the ascending aorta before initiation of CPB and the distal anastomoses were completed under cardioplegic arrest. Myocardial protection was kept constant throughout the period of investigation and was achieved by cold blood antegrade cardioplegia (2:1 blood cardioplegia with Saint Thomas' Hospital solution, SLF 103, Aguetant, Lyon, France). Reperfusion with warm blood cardioplegia was performed before release of the aortic cross-clamp.

Cardiopulmonary bypass

Normothermic CPB (>36°C on the venous return) was performed using a centrifugal pump (Biopump, Medtronic Bio-Medicus Inc., Eden Prairie, MN, USA) and a flow rate of 2.4 L/min/m² was maintained. The circuit consisted of polyvinylchloride tubing, a closed venous reservoir, a hollow-fibre oxygenator (Maxima Carmeda, Medtronic, Anaheim, CA, USA), a cardiotomy reservoir (Intersept, Medtronic, Anaheim, CA, USA) and an arterial line filter (Medtronic M 440). In the HC-group, the circuit was treated with endpoint-attached covalently bonded heparin except for the cannulas (CBAS Carmeda, Medtronic, Kerkrade, the Netherlands).

The circuit was primed with 1000 mL of Ringer's lactate solution and 500 mL gelatin (Gelifusine, B.Braun Medical SA, Paris, France). When necessary, Ringer's lactate solution (Fresenius Kabi, Sèvres, France) was added to the circuit to maintain filling volume. After the patient was disconnected from CPB, the residual blood remaining in the extracorporeal circuit was recirculated through a cell-saving device (Compact A, Dideco, Mirandola, Italy) and the autologous blood was thereafter transfused to the patient. Cardiotomy suction was never used and the mediastinal shed blood was systematically processed using the cell-saving device before retransfusion throughout the surgical procedure.

A full anticoagulation protocol was applied through administration of a heparin dose based on the patient's weight (250 IU/Kg with 100 IU/Kg in the prime). The level of anticoagulation was controlled by monitoring the activated clotting time (Hemocron 801, International Technidyne Corporation, Edison, NJ) and additional heparin was administered if the ACT was less than 450 seconds. After cessation of CPB, 1 mg protamine (Protamine Choay, Sanofi Winthrop) for every 100 IU heparin (of the initial dose) was administered intravenously.

Transcranial Doppler (TCD) ultrasonography

Right and left middle cerebral arteries were monitored after induction of anaesthesia and 4 hours after the start of CPB, within the intensive care unit, using a 2-MHz pulsed-wave bidirectional TCD probe (Pioneer EME TC 2020, Nicolet Biomedical Inc., Madison, WI) placed on the patient's temple and focussed at a depth of 4.5 to 6.0 cm. Data were recorded on disks and subsequently reviewed by a single examiner. Systolic (SV), diastolic (DV) and mean (MV) blood flow velocities were determined. The resistance index (RI) and the pulsatility index (PI) were calculated using the following formulae: $RI = (SV - DV) / SV$ and $PI = (SV - DV) / MV$ ¹³. The number of aggregate embolic signals was not considered because of lack of reliability without an automated counter that was not available throughout the study.

Blood sampling and biochemical analyses

Serial arterial blood samples were collected for determination of blood levels of sC5b-9, the marker of terminal complement complex activation. Blood samples were collected after induction of anaesthesia before skin incision, after the end of CPB and at 24 hours postoperatively. Blood samples collected into sterile vacuum tubes with EDTA were immediately centrifuged. Aliquots of plasma were stored at -80°C and subsequently assayed in duplicate according to the manufacturer's procedure. sC5b-9 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay from

Quidel (InGen, Rungis, France). Although the surgical team was not blinded to the TCD analyses, the biochemistry team was blinded of the extra-corporeal circuit used for surgery when they assessed complement activation.

Statistics

Data were stored and analyzed using the SPSS software package (SPSS 11.5 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL). Continuous data have been presented as mean \pm standard deviation. A χ^2 test with Fisher's exact tests was used for categorical data if appropriate. The Mann-Whitney U test was used for quantitative variables as well as Wilcoxon's signed rank test for paired data. Increases in biochemical markers with time relative to baseline values were evaluated by the Friedman one-way ANOVA to detect changes in each group. Wilcoxon's signed rank test was used post hoc to locate the changes. Changes among the groups at each data point were tested with the Mann-Whitney U test. Quantitative variables were also tested for correlations with the Spearman's rank-correlation test.

All the statistical significance thresholds were retained for a p value of less than 0.05.

Results

Patient clinical characteristics and complement activation measurements

Patient characteristics have been summarized in Table 1. In the NC-group, one patient died after mesenteric

Table 1. Patients characteristics

	Non-coated group (n=12)	Heparin-coated group (n=12)	p
Preoperative data			
Age (years)	64 \pm 9	61 \pm 7	0.21
Body surface area (m ²)	1.86 \pm 0.1	1.92 \pm 0.2	0.13
Smokers	5/12	7/12	0.41
Hypertension	1/12	5/12	0.16
Diabetes (oral medication)	2/12	1/12	1
Dyslipidaemia	8/12	12/12	0.09
Arteriopathy other than cardiac	3/12	1/12	0.59
Previous myocardial infarction	5/12	5/12	1
Left ventricular ejection fraction (%)	57 \pm 11	60 \pm 10	0.51
Preoperative ASA exposure	8/12	9/12	1
EuroSCORE	2.0 \pm 1.5	1.3 \pm 1.2	0.38
Operative data			
Heparin dose ($\times 10^3$ IU)	29375 \pm 3760	29466 \pm 6050	0.71
Protamine dose (mg)	184 \pm 49	181 \pm 44	0.93
Aortic cross-clamp time (min)	64 \pm 15	57 \pm 22	0.22
CPB duration (min)	93 \pm 19	89 \pm 29	0.63
Number of distal anastomoses	3.2 \pm 0.7	2.8 \pm 1.1	0.38

CPB: cardiopulmonary bypass; ASA acetylsalicylic acid. (Others antiplatelet agents (ticlopidine/clopidogrel) were stopped at least 7 days before surgery).

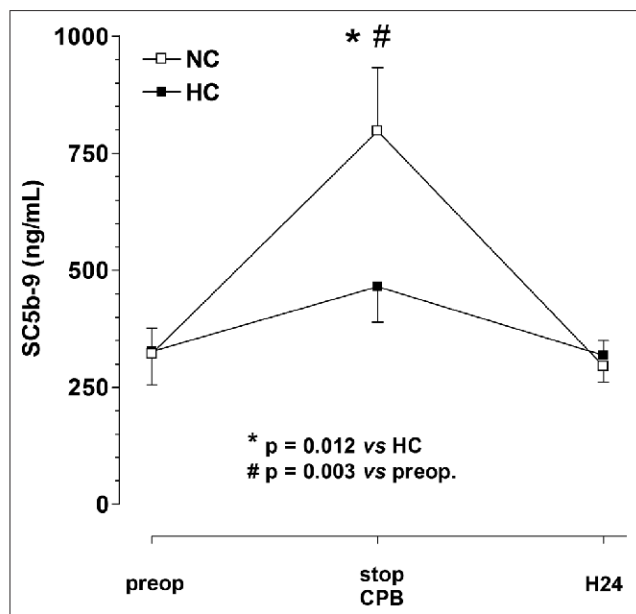


Figure 1. Pattern of release of sC5b-9 using non-coated or heparin-coated cardiopulmonary bypass. Data are presented as mean ± standard error of the mean. NC: non-coated group (n=12); HC: heparin-coated group (n=12); CPB: cardiopulmonary bypass

throughout the postoperative period. A significant increase of sC5b-9 was observed in the NC group during CPB ($p=0.003$) before returning to baseline levels at postoperative day 1 (Figure 1) whereas changes observed in the HC group were not significant ($p=0.31$). The peak value of sC5b-9 at the conclusion of CPB in the NC group was significantly higher than in the HC group (797 ± 471 ng/mL vs 465 ± 263 ng/mL; $p=0.012$, respectively).

TCD measurements.

Although TCD examination was attempted in 24 patients, preoperative and postoperative matched data were obtained only in 19 patients (8 in the NC group and 11 in the HC group). In the NC group, CBFV increased after the operation (SV by 27%, $p=0.05$; DV by 40%, $p=0.06$; MV by 33%, $p=0.04$) whereas no significant changes were detected in the HC group (SV by -3%, DV by -0.4%, MV by -3%) (Fig 2). Postoperative CBFV values were higher in the NC group than in the HC group (72 ± 21 m²/s vs 52 ± 14 m²/s for SV, $p=0.04$; 33 ± 11 m²/s vs 23 ± 6 m²/s for DV, $p=0.03$; 47 ± 14 m²/s vs 32 ± 8 m²/s for MV, $p=0.03$). RI and PI remained similar during the observation period in both groups (RI: 0.60 ± 0.08 preoperatively and 0.55 ± 0.05 postoperatively in the NC group vs 0.56 ± 0.09 and 0.55 ± 0.06 , respectively, in the HC group, p =not significant; PI: 0.99 ± 0.21 preoperatively and 0.88 ± 0.14 postoperatively in the NC group vs 0.91 ± 0.23 and 0.89 ± 0.16 , respectively, in the HC group, p =not significant). As postoperative measurements that identified significant changes in the NC group were performed, mean arterial pressure, cardiac index, systemic vascular

infarction 5 days after the operation although initial postoperative outcome was good. One stroke was observed in the NC group and one myocardial infarction in the HC group, postoperatively. In the surgical intensive care unit, 4 patients in each group (33.3%) received dobutamine and no vasoconstrictor agents were used

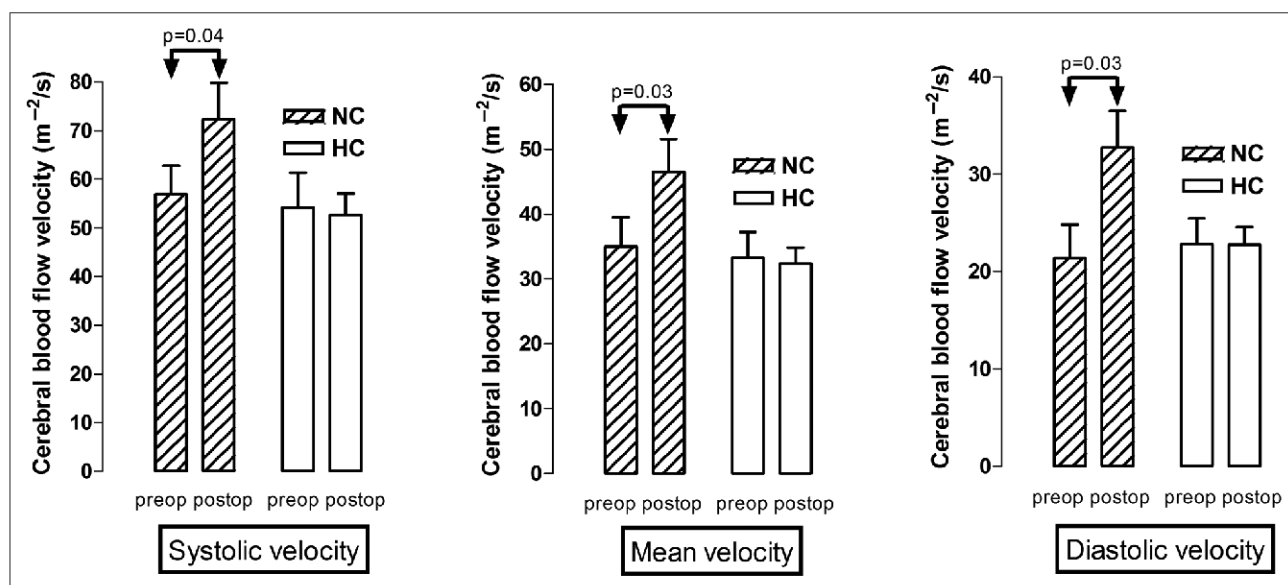


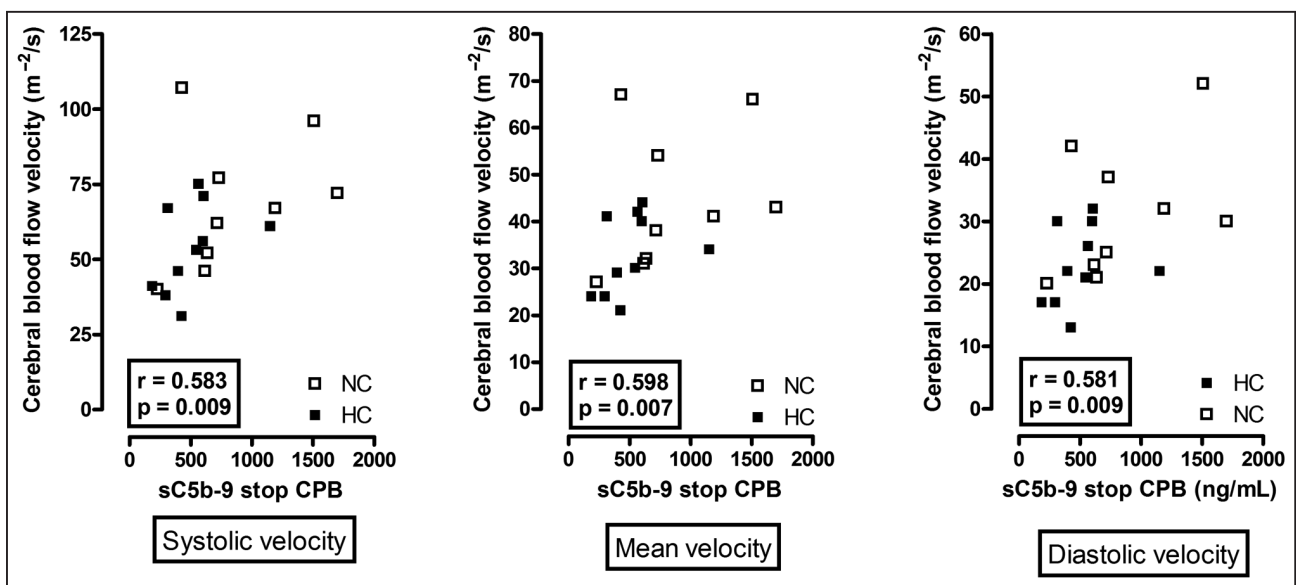
Figure 2. Transcranial Doppler: systolic velocity, mean velocity, and diastolic velocity after CPB using non-coated or heparin-coated circuits. Data are presented as mean ± standard error of the mean. NC: non-coated group (N = 8); HC: heparin-coated group (N = 11); CPB: cardiopulmonary bypass

Table 2. Haemodynamic measurements and laboratory data of patients with matched preoperative and postoperative transcranial Doppler data

	Baseline		ICU admission	
	NC (n=8)	HC (n=11)	NC (n=8)	HC (n=11)
Mean arterial pressure (mmHg)	85 ± 16	87 ± 16	76 ± 16	75 ± 13
Cardiac Index (L/min/m ²)	2.47 ± 0.45	2.09 ± 0.44 *	2.59 ± 0.55	2.55 ± 0.38 #
Systemic vascular resistance (dyn.s/cm ²)	1437 ± 721	1797 ± 1186	1154 ± 330	1121 ± 236
Haematocrit (%)	39.7 ± 3.6	39.5 ± 2.9	35.7 ± 5.2 #	35.7 ± 4.1 #
Platelets (giga/L)	194 ± 51	219 ± 64	131 ± 50 #	151 ± 48 #
pCO ₂ (mm Hg)	38.2 ± 2.2	39.5 ± 2.6	34.3 ± 4.4 #	33.7 ± 3.9 #

ICU: intensive care unit; NC: non-coated group; HC: heparin-coated group.

* p<0.05 intergroup difference significance; # p<0.05 intragroup difference significance

**Figure 3.** Correlation between sC5b-9 at the end of cardiopulmonary bypass (CPB) and postoperative cerebral blood flow velocities.

NC: non-coated group (N = 8); HC: heparin-coated group (N = 11)

resistance, haematocrit and arterial pCO₂ were similar between the two groups (Table 2)

Postoperative values of SV were significantly correlated with sC5b-9 at the termination of CPB ($r=0.583$; $p=0.009$), as well as DV ($r=0.581$; $p=0.009$) and MV ($r=0.598$; $p=0.007$) (Fig 3)

Discussion

The link between the potential changes of cerebral perfusion after cardiac surgery and the CPB-induced inflammatory response in patients has not been established until now. By using TCD examination, this study provides evidence of disturbances of CBFV during the perioperative period. The pro-inflammatory nature of CPB has been associated with increased CBFV postoperatively whereas

these changes have been abolished when complement activation was neutralized by heparin-coated CPB.

The differences in CBFV observed between the two groups could not be related to the general haemodynamic condition of the patients since mean arterial perfusion pressures, cardiac indexes, systemic vascular resistances and postoperative dobutamine use were similar. For the same reason, it could not be related to biological parameters such as arterial pCO₂ or haematocrit decrease, otherwise known to significantly influence the CBFV or the cerebral blood flow^{3,6}. Elevated CBFV could originate from a diameter reduction of the middle cerebral arteries as well as from increased volume flow in the presence of microcirculation dilatation. Considering the similar general haemodynamic condition between the two groups and the magnitude of the inflammatory response in the

NC group, our results suggest that cerebral perfusion changes after CPB are associated with complement activation and, therefore, of inflammatory origin. In non-cardiac patients, the increase in CBFV is associated with either vasospasm or increased cerebral blood flow. Noteworthy, the development of cerebral vasospasm (a vasoconstriction state with CBFV more than 200 cm/s) has been associated with the inflammatory response that is concomitant with the acute phase of bacterial meningitis or subarachnoid haemorrhage^{7,8}. In cardiac patients, Floyd and associates demonstrated that cerebral blood flow is increased by 49% on postoperative day 6 after surgery with CPB, depending on the drop of haemoglobin³. Indeed, cerebral blood flow is known to vary inversely and linearly with haematocrit¹⁴. However, others reports have concluded that cerebral blood flow is decreased several days after cardiac surgery, even in the presence of postoperative anaemia^{4,5}. The fact that haematocrit changes were of similar magnitude between the two groups may suggest that an haematocrit-related increase of cerebral blood flow was unlikely to be the mechanism involved, whereas an inflammatory induced vasoconstriction might be a suitable explanation of the changes in CBFV. Moreover, given similar postoperative general haemodynamic conditions between the two groups (cardiac index, mean arterial pressure) and the concept of cerebral autoregulation that exists within this range of pressure¹⁵, the relationship between blood flow (Q), velocity (V) and surface area (S) ($Q=V \times S$) implies that increased CBFV was associated with a vasoconstriction effect in the NC group.

Ruel and associates have reported that vasomotor dysfunction after cardiac surgery may vary among the different organs exposed to the stress induced by CPB, with reduced vascular resistances in the skeletal muscle and peripheral circulation, and increased propensity to spasm in the cardiac, pulmonary, mesenteric and cerebral vascular beds¹⁶. Most of these effects can be related to the whole body inflammatory response and to the oxygen free-radical burst of heart and lung exposed to nearly complete diversion of the blood flow and to an ischaemia-reperfusion sequence. Particularly, complement activation occurs as soon as CPB is initiated via the alternative pathway when blood gets in contact with the artificial surfaces and later on via the classical pathway when heparin-protamine complexes are formed^{17,18}. Both these activation pathways are minimized by the use of heparin-coated extracorporeal circuits¹¹ and this was confirmed by our results in the present study.

Stamler et al. have demonstrated that exposure of cortical cerebral microvessels to zymosan-induced complement-activated porcine serum reduces significantly nitric oxide (NO)-mediated, endothelium-dependent relaxation². NO participates in the maintenance of basal tone of cerebral circulation¹⁹ and is preferentially produced in large

cerebral vessels²⁰ which are the effectors of high pressure level regulation as small diameter pial and cortical vessels are implicated in low level pressure and metabolic cerebral autoregulation^{21,22}. Thus, a decreased NO synthase activity could explain a vasoconstrictive state of middle cerebral arteries that are resistive arteries. Similar impairment has been reported in other tissues. Endothelium-dependent relaxation has been found in the mesenteric circulation²³ as well as in the coronary arteries²⁴. In addition, monoclonal antibody to complement C5a prevents endothelium-dependent dilation attenuation in pig mesenteric and pulmonary arterioles after CPB^{12,5}.

TCD examination has been attempted in 24 patients. However, reliable measurements were missing in some circumstances and matching preoperative to postoperative data was possible only in 19 patients. Young subjects generally have relatively large areas over the temporal bone through which the ultrasound beam can pass. With advancing age, however, the transtemporal window can be very small or non-existent, so that the ultrasound signal may be unable to pass through the temporal bone²⁶. We did not assess the production of high intensity transient signals (HITS) as a marker of cerebral embolization to assess whether they could interfere potentially with the CBFV changes. In fact, CPB management may greatly affect their number^{27,28}. It might be argued that coating artificial surfaces of the extracorporeal circuit with heparin could limit the production of thrombin, as well as the subsequent embolization process. Actually, heparin coating has only a marginal effect on the whole thrombin production²⁹ which arises mainly from the tissue pathway cascade when surgery is initiated³⁰. This justified carefully controlling cardiectomy suctions using a cell saving device, a practice that is known to eliminate large debris (lipids, bones, ...) re-transfusion from pericardial shed blood and subsequent brain injury³¹⁻³³. This CPB management, that was used throughout this study, has been found even more protective on the brain vasculature than arterial filters to decrease the number of small capillary and arteriolar dilations in dogs³⁴.

In conclusion, increased inflammatory reaction was associated in this study with increased CBFV. However, further assessment by including higher numbers of patients is needed in order to provide clinical meaning for these observed changes.

Conflict of Interest

Christophe Baufreton would like to report that since writing this article he has received invitations to speak at some Medtronic conferences.

Funding

Supported by a grant from the Délégation Régionale à la Recherche Clinique, University Hospital of Angers.

Acknowledgements

Special thanks to Pierre Pavie, Jean-Claude Daniel, Anne-Pascale Brosseron, the perfusionists of the Department of Cardiac Surgery.

References

- Park KW, Tofukuji M, Metais C, et al. Attenuation of endothelium-dependent dilation of pig pulmonary arterioles after cardiopulmonary bypass is prevented by monoclonal antibody to complement C5a. *Anesth Analg* 1999 Jul; 89(1): 42–48.
- Stamler A, Wang SY, Li J, Thurer RL, Schoen FJ, Sellke FW. Moderate hypothermia reduces cardiopulmonary bypass-induced impairment of cerebrovascular responses to platelet products. *Ann Thorac Surg* 1996 Jul; 62(1): 191–198.
- Floyd TE, McGarvey M, Ochroch EA, et al. Perioperative changes in cerebral blood flow after cardiac surgery: influence of anemia and aging. *Ann Thorac Surg* 2003 Dec; 76(6): 2037–2042.
- Abildstrom H, Høgh P, Sperling B, Møller JT, Yndgaard S, Rasmussen LS. Cerebral blood flow and cognitive dysfunction after coronary surgery. *Ann Thorac Surg* 2002 Apr; 73(4): 1174–1178; discussion 1178–1179.
- Smith PL, Treasure T, Newman SP, et al. Cerebral consequences of cardiopulmonary bypass. *Lancet* 1986 Apr 12; 1(8485): 823–825.
- Müller M, Schwerdtfeger K, Maier B, et al. Cerebral blood flow velocity and inflammatory response after severe traumatic brain injury. *Eur J Ultrasound* 2001 Mar; 12(3): 203–208.
- Ries S, Schminke U, Fassbender K, Daffertshofer M, Steinke W, Hennerici M. Cerebrovascular involvement in the acute phase of bacterial meningitis. *J Neurol* 1997 Jan; 244(1): 51–55.
- Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, et al. Inflammatory cytokines in subarachnoid haemorrhage: association with abnormal blood flow velocities in basal cerebral arteries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001 Apr; 70(4): 534–537.
- Gasque P, Fontaine M, Morgan BP. Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J Immunol* 1995 May 1; 154(9): 4726–4733.
- Gasque P, Chan B, Fontaine M, et al. Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes. *J Immunol* 1995 Nov 15; 155(10): 4882–4889.
- Baufreton C, Jansen PG, Le Besnerais P, et al. Heparin coating with aprotinin reduces blood activation during coronary artery operations. *Ann Thorac Surg* 1997 Jan; 63(1): 50–56.
- Roques F, Nashef SA, Michel P, et al. Risk factors and outcome in European cardiac surgery: analysis of the EuroSCORE multinational database of 19030 patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999 Jun; 15(6): 816–822; discussion 822–823.
- Boishardy N, Granry JC, Jacob JB, Houi N, Fournier D, Delhumeau A. Intérêt du Doppler transcrânien dans la prise en charge des traumatisés crâniens graves. *Ann Fr Anesth Reanim* 1994; 13(2): 172–176.
- Jones MD, Jr, Hudak ML, Traystman RJ. Cerebral blood flow and haematocrit. *Lancet* 1985 Jun 29; 1(8444): 1511.
- Lassen NA. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev* 1959 Apr; 39(2): 183–238.
- Ruel M, Khan TA, Voisine P, Bianchi C, Sellke FW. Vasomotor dysfunction after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004 Nov; 26(5): 1002–1014.
- Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med* 1981 Feb 26; 304(9): 497–503.
- Cavarocchi NC, Schaff HV, Orszulak TA, Homburger HA, Schnell WA, Jr, Pluth JR. Evidence for complement activation by protamine-heparin interaction after cardiopulmonary bypass. *Surgery* 1985 Sep; 98(3): 525–531.
- Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994 Mar; 14(2): 175–192.
- You J, Johnson TD, Marrelli SP, Bryan RM, Jr. Functional heterogeneity of endothelial P2 purinoceptors in the cerebrovascular tree of the rat. *Am J Physiol* 1999 Sep; 277(3 Pt 2): H893–900.
- Kontos HA, Wei EP, Navari RM, Levasseur JE, Rosenblum WI, Patterson JL, Jr. Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension. *Am J Physiol* 1978 Apr; 234(4): H371–383.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 2003 Jan; 6(1): 43–50.
- Tofukuji M, Stahl GL, Metais C, et al. Mesenteric dysfunction after cardiopulmonary bypass: role of complement C5a. *Ann Thorac Surg* 2000 Mar; 69(3): 799–807.
- Stahl GL, Reenstra WR, Frenzl G. Complement-mediated loss of endothelium-dependent relaxation of porcine coronary arteries. Role of the terminal membrane attack complex. *Circ Res* 1995 Apr; 76(4): 575–583.
- Tofukuji M, Stahl GL, Agah A, Metais C, Simons M, Sellke FW. Anti-C5a monoclonal antibody reduces cardiopulmonary bypass and cardioplegia-induced coronary endothelial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998 Dec; 116(6): 1060–1068.
- Fujioka K, Douville C. Anatomy and freehand examination techniques. In: Newell D, Aaslid R, editors. *Transcranial Doppler*, New York: Raven Press; 1992. p.2–31.
- Rodriguez RA, Williams KA, Babaev A, Rubens F, Nathan HJ. Effect of perfusionist technique on cerebral embolization during cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2005 Jan; 20(1): 3–10.
- Taylor RL, Borger MA, Weisel RD, Fedorko L, Feindel CM. Cerebral microemboli during cardiopulmonary bypass: increased emboli during perfusionist interventions. *Ann Thorac Surg* 1999 Jul; 68(1): 89–93.
- te Velthuis H, Baufreton C, Jansen PG, et al. Heparin coating of extracorporeal circuits inhibits contact activation during cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997 Jul; 114(1): 117–122.
- Philippou H, Davidson SJ, Mole MT, Pepper JR, Burman JF, Lane DA. Two-chain factor VIIa generated in

- the pericardium during surgery with cardiopulmonary bypass: relationship to increased thrombin generation and heparin concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Feb; 19(2): 248–254.
31. Reents W, Babin-Ebell J, Misoph MR, Schwarzkopf A, Elert O. Influence of different autotransfusion devices on the quality of salvaged blood. *Ann Thorac Surg* 1999 Jul; 68(1): 58–62.
 32. Anderson RE, Hansson LO, Liska J, Settergren G, Vaage J. The effect of cardiotomy suction on the brain injury marker S100beta after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000 Mar; 69(3): 847–850.
 33. de Haan J, Boonstra PW, Monnik SH, Ebels T, van Oeveren W. Retransfusion of suctioned blood during cardiopulmonary bypass impairs hemostasis. *Ann Thorac Surg* 1995 Apr; 59(4): 901–907.
 34. Kincaid EH, Jones TJ, Stump DA, et al. Processing scavenged blood with a cell saver reduces cerebral lipid microembolization. *Ann Thorac Surg* 2000 Oct; 70(4): 1296–1300.

References

1. Levesque MJ, Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *Journal of biomechanical engineering*. 1985;107:341-347
2. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res*. 2003;93:e136-142
3. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*. 1902;28:220-231
4. Folkow B. Intravascular pressure as a factor regulating the tone of the small vessels. *Acta Physiol Scand*. 1949;17:289-310
5. Davis MJ. Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am J Physiol*. 1993;264:H2168-2179
6. Osol G. Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res*. 1995;32:275-292
7. Zhao G, Zhao Y, Pan B, Liu J, Huang X, Zhang X, Cao C, Hou N, Wu C, Zhao KS, Cheng H. Hypersensitivity of bkca to ca²⁺ sparks underlies hyporeactivity of arterial smooth muscle in shock. *Circ Res*. 2007;101:493-502
8. Roman RJ, Renic M, Dunn KM, Takeuchi K, Hacein-Bey L. Evidence that 20-hete contributes to the development of acute and delayed cerebral vasospasm. *Neurological research*. 2006;28:738-749
9. Shirao S, Yoneda H, Ishihara H, Kajiwara K, Suzuki M. A proposed definition of symptomatic vasospasm based on treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in japan: Consensus 2009, a project of the 25 spasm symposium. *Surgical neurology international*. 2011;2:74
10. Harris AK, Elgebaly MM, Li W, Sachidanandam K, Ergul A. Effect of chronic endothelin receptor antagonism on cerebrovascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R1213-1219
11. Ahn DS, Choi SK, Kim YH, Cho YE, Shin HM, Morgan KG, Lee YH. Enhanced stretch-induced myogenic tone in the basilar artery of spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res*. 2007;44:182-191
12. Berezan DJ, Xu Y, Falck JR, Kundu AP, Davidge ST. Ovariectomy, but not estrogen deficiency, increases cyp4a modulation of alpha(1)-adrenergic vasoconstriction in aging female rats. *Am J Hypertens*. 2008;21:685-690
13. Broughton BR, Walker BR, Resta TC. Chronic hypoxia induces rho kinase-dependent myogenic tone in small pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:L797-806
14. Levesque MJ, Liepsch D, Moravec S, Nerem RM. Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis*. 1986;6:220-229
15. Tedgui AL, BI. Aspects normaux et pathologiques. *Ed Masson*. 1994
16. Sato M, Levesque MJ, Nerem RM. Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis*. 1987;7:276-286
17. Coan DE, Wechezak AR, Viggers RF, Sauvage LR. Effect of shear stress upon localization of the golgi apparatus and microtubule organizing center in isolated cultured endothelial cells. *J Cell Sci*. 1993;104 (Pt 4):1145-1153
18. Masusa MF, K. Mophological responses of single endothelial cells exposed to physiological levels of fluid shear stress. *Front Med Biol Eng*. 1993:79-87
19. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996;28:505-506
20. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112:1018-1031

21. le Noble F, Fleury V, Pries A, Corvol P, Eichmann A, Reneman RS. Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis: Go with the flow. *Cardiovascular research*. 2005;65:619-628
22. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Curcio A, Rodriguez F, Bilancio A, Leccia A, Arcucci O, Falco M, Leosco D, Chiariello M. Physical training increases enos vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats. *Circ Res*. 2002;91:1190-1197
23. Hilgers RH, Schiffers PM, Aartsen WM, Fazzi GE, Smits JF, De Mey JG. Tissue angiotensin-converting enzyme in imposed and physiological flow-related arterial remodeling in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24:892-897
24. Stepp DW, Pollock DM, Frisbee JC. Low-flow vascular remodeling in the metabolic syndrome x. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H964-970
25. Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res*. 2001;89:779-786
26. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem*. 1996;271:24313-24316
27. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 1996;98:2572-2579
28. Hao L, Nishimura T, Wo H, Fernandez-Patron C. Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:819-825
29. Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:200-208
30. Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res*. 2002;39:191-207
31. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003;92:e31-40
32. Phillips SA, Hatoum OA, Gutterman DD. The mechanism of flow-induced dilation in human adipose arterioles involves hydrogen peroxide during cad. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H93-100
33. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003;42:1075-1081
34. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:681-684
35. Vasquez-Vivar J, Duquaine D, Whitsett J, Kalyanaraman B, Rajagopalan S. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: Implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22:1655-1661
36. Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation*. 2001;104:2638-2640
37. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, Tsikas D, Ertl G, Bauersachs J. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*. 2007;56:666-674

38. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004;122:339-352
39. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1995;15:2032-2036
40. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999;31:261-272
41. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovascular research.* 2003;59:812-823
42. Hooker D. The influence of pulse pressure upon renal function. *American journal of physiology.* 1910;27:24-44
43. Parsons RJ, McMaster PD. The effect of the pulse upon the formation and flow of lymph. *J Exp Med.* 1938;68:353-376
44. McMaster PD, Parsons RJ. The effect of the pulse on the spread of substances through tissues. *J Exp Med.* 1938;68:377-400
45. Grover FL. The society of thoracic surgeons national database: Current status and future directions. *The Annals of thoracic surgery.* 1999;68:367-373; discussion 374-366
46. Undar A. Myths and truths of pulsatile and nonpulsatile perfusion during acute and chronic cardiac support. *Artif Organs.* 2004;28:439-443
47. Shepard RB, Simpson DC, Sharp JF. Energy equivalent pressure. *Arch Surg.* 1966;93:730-740
48. Wright G. Mechanical simulation of cardiac function by means of pulsatile blood pumps. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1997;11:299-309
49. Wright G. Hemodynamic analysis could resolve the pulsatile blood flow controversy. *The Annals of thoracic surgery.* 1994;58:1199-1204
50. Undar A. The abcs of research on pulsatile versus nonpulsatile perfusion during cardiopulmonary bypass. *Med Sci Monit.* 2002;8:ED21-24
51. Ji B, Undar A. Comparison of perfusion modes on microcirculation during acute and chronic cardiac support: Is there a difference? *Perfusion.* 2007;22:115-119
52. Wright G, Ping JS, Campbell CS, Tobias MA. Computation of haemodynamic power and input impedance in the ascending aorta of patients undergoing open heart surgery. *Cardiovascular research.* 1988;22:179-184
53. Wright G. The hydraulic power outputs of pulsatile and non pulsatile cardiopulmonary bypass pumps. *Perfusion.* 1988;3:251-262
54. Potapov EV, Loebe M, Nasser BA, Sinawski H, Koster A, Kuppe H, Noon GP, DeBakey ME, Hetzer R. Pulsatile flow in patients with a novel nonpulsatile implantable ventricular assist device. *Circulation.* 2000;102:III183-187
55. Boishardy N, Granry JC, Jacob JP, Houi N, Fournier D, Delhumeau A. [value of transcranial doppler ultrasonography in the management of severe head injuries]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation.* 1994;13:172-176
56. Undar A. Benefits of pulsatile flow during and after cardiopulmonary bypass procedures. *Artif Organs.* 2005;29:688-690
57. Travis AR, Giridharan GA, Pantalos GM, Dowling RD, Prabhu SD, Slaughter MS, Sobieski M, Undar A, Farrar DJ, Koenig SC. Vascular pulsatility in patients with a pulsatile- or continuous-flow ventricular assist device. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2007;133:517-524
58. Orime Y, Shiono M, Hata H, Yagi S, Tsukamoto S, Okumura H, Nakata K, Kimura S, Hata M, Sezai A, Sezai Y. Cytokine and endothelial damage in pulsatile and nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *Artif Organs.* 1999;23:508-512

59. James SP, J; Maresca, L; Kalush, SL; Trigeros, EA. The roller pump does produce pulsatile flow. *J Extra Corpor Technol.* 1987;19:376-383
60. Undar A, Eichstaedt HC, Masai T, Yang SQ, Bigley JE, McGarry MC, Mueller M, Vaughn WK, Fraser CD, Jr. Comparison of six pediatric cardiopulmonary bypass pumps during pulsatile and nonpulsatile perfusion. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2001;122:827-829
61. Undar A, Eichstaedt HC, Bigley JE, Deady BA, Porter AE, Vaughn WK, Fraser CD, Jr. Effects of pulsatile and nonpulsatile perfusion on cerebral hemodynamics investigated with a new pediatric pump. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2002;124:413-416
62. Undar A, Lodge AJ, Daggett CW, Runge TM, Ungerleider RM, Calhoon JH. The type of aortic cannula and membrane oxygenator affect the pulsatile waveform morphology produced by a neonate-infant cardiopulmonary bypass system in vivo. *Artif Organs.* 1998;22:681-686
63. Nagaoka H, Innami R, Arai H. Effects of pulsatile cardiopulmonary bypass on the renin-angiotensin-aldosterone system following open heart surgery. *Jpn J Surg.* 1988;18:390-396
64. Minami K, Korner MM, Vyska K, Kleesiek K, Knobl H, Korfer R. Effects of pulsatile perfusion on plasma catecholamine levels and hemodynamics during and after cardiac operations with cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 1990;99:82-91
65. Philbin DM, Levine FH, Kono K, Coggins CH, Moss J, Slater EE, Buckley MJ. Attenuation of the stress response to cardiopulmonary bypass by the addition of pulsatile flow. *Circulation.* 1981;64:808-812
66. Buket S, Alayunt A, Ozbaran M, Hamulu A, Discigil B, Cetindag B, Ozkilig H, Balkan Z, Bilkay O, Durmaz I. Effect of pulsatile flow during cardiopulmonary bypass on thyroid hormone metabolism. *The Annals of thoracic surgery.* 1994;58:93-96
67. Jett GK. Physiology of nonpulsatile circulation: Acute versus chronic support. *ASAIO journal.* 1999;45:119-122
68. Alston RP, Murray L, McLaren AD. Changes in hemodynamic variables during hypothermic cardiopulmonary bypass. Effects of flow rate, flow character, and arterial ph. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 1990;100:134-144
69. Alston RP, Singh M, McLaren AD. Systemic oxygen uptake during hypothermic cardiopulmonary bypass. Effects of flow rate, flow character, and arterial ph. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 1989;98:757-768
70. Goto M, Kudoh K, Minami S, Nukariya M, Sasaguri S, Watanabe M, Hosoda Y. The renin-angiotensin-aldosterone system and hematologic changes during pulsatile and nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *Artif Organs.* 1993;17:318-322
71. Levine FH, Phillips HR, Carter JE, Philbin DM, Osbakken MD, Boucher CA, Pohost GM, Okada RD, Buckley MJ. The effect of pulsatile perfusion on preservation of left ventricular function after aortocoronary bypass grafting. *Circulation.* 1981;64:II40-44
72. Louagie YA, Gonzalez M, Collard E, Mayne A, Gruslin A, Jamart J, Buche M, Schoevaerdt JC. Does flow character of cardiopulmonary bypass make a difference? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 1992;104:1628-1638
73. Alghamdi AA, Latter DA. Pulsatile versus nonpulsatile cardiopulmonary bypass flow: An evidence-based approach. *J Card Surg.* 2006;21:347-354
74. Murkin JM, Martzke JS, Buchan AM, Bentley C, Wong CJ. A randomized study of the influence of perfusion technique and ph management strategy in 316 patients undergoing coronary artery bypass surgery. II. Neurologic and cognitive outcomes. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 1995;110:349-362

75. Taylor KM, Bain WH, Davidson KG, Turner MA. Comparative clinical study of pulsatile and non-pulsatile perfusion in 350 consecutive patients. *Thorax*. 1982;37:324-330
76. Watarida S, Mori A, Onoe M, Tabata R, Shiraishi S, Sugita T, Nojima T, Nakajima Y, Matsuno S. A clinical study on the effects of pulsatile cardiopulmonary bypass on the blood endotoxin levels. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1994;108:620-625
77. Lee JJ, Tyml K, Menkis AH, Novick RJ, McKenzie FN. Evaluation of pulsatile and nonpulsatile flow in capillaries of goat skeletal muscle using intravital microscopy. *Microvasc Res*. 1994;48:316-327
78. Konishi H, Sohara Y, Endo S, Misawa Y, Fuse K. Pulmonary microcirculation during pulsatile and non pulsatile perfusion. *ASAIO journal*. 1997;43:M657-659
79. Baba A, Dobsak P, Mochizuki S, Saito I, Isoyama T, Takiura K, Shibata M, Abe Y, Chinzei T, Vasku J, Imachi K. Evaluation of pulsatile and nonpulsatile flow in microvessels of the bulbar conjunctiva in the goat with an undulation pump artificial heart. *Artif Organs*. 2003;27:875-881
80. Baba A, Dobsak P, Saito I, Isoyama T, Takiura K, Abe Y, Chinzei T, Vasku J, Imachi K. Microcirculation of the bulbar conjunctiva in the goat implanted with a total artificial heart: Effects of pulsatile and nonpulsatile flow. *ASAIO journal*. 2004;50:321-327
81. Dobsak P, Novakova M, Baba A, Vasku J, Isoyama T, Saito I, Abe Y, Chinzei T, Imachi K. Influence of flow design on microcirculation in conditions of undulation pump-left ventricle assist device testing. *Artif Organs*. 2006;30:478-487
82. Sezai A, Shiono M, Orime Y, Nakata K, Hata M, Iida M, Kashiwazaki S, Kinoshita J, Nemoto M, Koujima T, Furuichi M, Eda K, Hirose H, Yoshino T, Saitoh A, Taniguchi Y, Sezai Y. Major organ function under mechanical support: Comparative studies of pulsatile and nonpulsatile circulation. *Artif Organs*. 1999;23:280-285
83. Nakata K, Shiono M, Orime Y, Hata M, Sezai A, Saitoh T, Sezai Y. Effect of pulsatile and nonpulsatile assist on heart and kidney microcirculation with cardiogenic shock. *Artif Organs*. 1996;20:681-684
84. Sezai A, Shiono M, Orime Y, Nakata K, Hata M, Nemoto M, Saitoh T, Sezai Y. Comparison studies of major organ microcirculations under pulsatile- and nonpulsatile-assisted circulations. *Artif Organs*. 1996;20:139-142
85. Sezai A, Shiono M, Orime Y, Nakata K, Hata M, Yamada H, Iida M, Kashiwazaki S, Kinoshita J, Nemoto M, Koujima T, Sezai Y, Saitoh T. Renal circulation and cellular metabolism during left ventricular assisted circulation: Comparison study of pulsatile and nonpulsatile assists. *Artif Organs*. 1997;21:830-835
86. Yamada H. The influence of complete artificial circulation for end-organ microcirculation after cardiogenic shock: Comparison study between pulsatile and non-pulsatile circulation. *Ann thorac cardio-vasc Surg*. 1997;3:309-317
87. Gu YJ, De Kroon TL, Elstrodt JM, van Oeveren W, Boonstra PW, Rakhorst G. Augmentation of abdominal organ perfusion during cardiopulmonary bypass with a novel intra-aortic pulsatile catheter pump. *The International journal of artificial organs*. 2005;28:35-43
88. Litwak KN, Kihara S, Kameneva MV, Litwak P, Uryash A, Wu Z, Griffith BP. Effects of continuous flow left ventricular assist device support on skin tissue microcirculation and aortic hemodynamics. *ASAIO journal*. 2003;49:103-107
89. Ohri SK, Bowles CW, Mathie RT, Lawrence DR, Keogh BE, Taylor KM. Effect of cardiopulmonary bypass perfusion protocols on gut tissue oxygenation and blood flow. *The Annals of thoracic surgery*. 1997;64:163-170
90. Shepard RB, Kirklin JW. Relation of pulsatile flow to oxygen consumption and other variables during cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1969;58:694-702 passim

91. Sezai A, Shiono M, Nakata K, Hata M, Iida M, Saito A, Hattori T, Wakui S, Soeda M, Taoka M, Umeda T, Negishi N, Sezai Y. Effects of pulsatile cpb on interleukin-8 and endothelin-1 levels. *Artif Organs*. 2005;29:708-713
92. te Velthuis H, Jansen PG, Oudemans-van Straaten HM, van Kamp GJ, Sturk A, Eijlsman L, Wildevuur CR. Circulating endothelin in cardiac operations: Influence of blood pressure and endotoxin. *The Annals of thoracic surgery*. 1996;61:904-908
93. Fujishima S, Sasaki J, Shinozawa Y, Takuma K, Hori S, Aikawa N. Interleukin 8 in ards. *Lancet*. 1993;342:237-238
94. Driessen JJ, Dhaese H, Fransen G, Verrelst P, Rondelez L, Gevaert L, van Becelaere M, Schelstraete E. Pulsatile compared with nonpulsatile perfusion using a centrifugal pump for cardiopulmonary bypass during coronary artery bypass grafting. Effects on systemic haemodynamics, oxygenation, and inflammatory response parameters. *Perfusion*. 1995;10:3-12
95. Ashraf S, Butler J, Tian Y, Cowan D, Lintin S, Saunders NR, Watterson KG, Martin PG. Inflammatory mediators in adults undergoing cardiopulmonary bypass: Comparison of centrifugal and roller pumps. *The Annals of thoracic surgery*. 1998;65:480-484
96. Baufreton C, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, Vonk A, Farcet JP, Wildevuur CR, Loisanse DY. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *The Annals of thoracic surgery*. 1999;67:972-977
97. Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281:L529-533
98. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*. 2001;81:1415-1459
99. Nakano T, Tominaga R, Morita S, Masuda M, Nagano I, Imasaka K, Yasui H. Impacts of pulsatile systemic circulation on endothelium-derived nitric oxide release in anesthetized dogs. *The Annals of thoracic surgery*. 2001;72:156-162
100. Champsaur G, Vedrinne C, Martinot S, Tronc F, Robin J, Ninet J, Franck M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor during pulsatile bypass: Experimental study in the fetal lamb. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1997;114:738-744; discussion 744-735
101. Baufreton C, Moczar M, Intrator L, Jansen PG, te Velthuis H, Le Besnerais P, Farcet JP, Wildevuur CR, Loisanse DY. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using two different types of heparin-coated extracorporeal circuits. *Perfusion*. 1998;13:419-427
102. Miller LW. Is pulsatile blood flow no longer essential? *Circulation*. 2009;120:2313-2314
103. Russell SD, Rogers JG, Milano CA, Dyke DB, Pagani FD, Aranda JM, Klodell CT, Jr., Boyle AJ, John R, Chen L, Massey HT, Farrar DJ, Conte JV. Renal and hepatic function improve in advanced heart failure patients during continuous-flow support with the heartmate ii left ventricular assist device. *Circulation*. 2009;120:2352-2357
104. Baufreton C, Kirsch M, Loisanse DY. Measures to control blood activation during assisted circulation. *The Annals of thoracic surgery*. 1998;66:1837-1844
105. Panerai RB. Cerebral autoregulation: From models to clinical applications. *Cardiovasc Eng*. 2008;8:42-59
106. Dubroca C, Lacombe P, Domenga V, Maciazek J, Levy B, Tournier-Lasserre E, Joutel A, Henrion D. Impaired vascular mechanotransduction in a transgenic mouse model of cadasil arteriopathy. *Stroke*. 2005;36:113-117
107. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: Flow-mediated dilation. *Endothelium*. 2008;15:157-163
108. Onorati F, Santarpino G, Tangredi G, Palmieri G, Rubino AS, Foti D, Gulletta E, Renzulli A. Intra-aortic balloon pump induced pulsatile perfusion reduces endothelial activation

- and inflammatory response following cardiopulmonary bypass. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2009;35:1012-1019; discussion 1019
109. Stegemann JP, Nerem RM. Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture. *Exp Cell Res*. 2003;283:146-155
 110. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999;71:435-478
 111. Lehoux S, Esposito B, Merval R, Tedgui A. Differential regulation of vascular focal adhesion kinase by steady stretch and pulsatility. *Circulation*. 2005;111:643-649

RESUME THESE

L'utilisation de la circulation extracorporelle (CEC) en chirurgie cardiaque est indispensable. Cependant le bénéfice de maintenir ou pas une pulsatilité durant la CEC reste controversé. Par ailleurs, la mécanotransduction du flux et de la pression dans la microcirculation fait l'objet de peu d'études. La pulsatilité, caractéristique essentielle de la perfusion physiologique est donc importante à prendre en considération dans ces études. L'objectif de ce travail a été d'étudier les effets de la pulsatilité sur la pharmacologie et la mécanotransduction (dilatation au flux, tonus myogénique) des artères de résistances mais également l'implication de facteur inflammatoire et des radicaux oxygénés (ROS) en fonction du régime de pulsatilité sur des artères mésentériques de rats.

La présence d'une pulsatilité entraîne une diminution du tonus myogénique et une dilatation précoce au flux. Il n'y a pas de modification de la réactivité pharmacologique des artères en l'absence de pulsatilité. Une pression non pulsée pendant 3 heures entraîne une production importante des protéines inflammatoires et ROS, inexistante dans les vaisseaux pulsés. Un traitement par un antioxydant prévient la production de ROS et des protéines inflammatoires.

La pulsatilité joue un rôle essentiel dans la microcirculation. De plus, elle semble avoir un rôle protecteur de la paroi vasculaire par un effet anti-inflammatoire. Ce travail peut avoir des implications physiopathologiques importantes puisqu'il existe des modifications de la pulsatilité lors de pathologie telles l'hypertension artérielle, le diabète, ou le vieillissement, mais également en chirurgie cardiaque avec l'utilisation des pompes artérielles.

Mot Clés : Pulsatilité, Microcirculation, Circulation Extra-Corporelle, Chirurgie Cardiaque, Inflammation.