

Université de Montréal

Étude pharmacologique de la réponse fonctionnelle vasculaire produite par des
peptides vasoconstricteurs

par

Éric Dumont

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en Pharmacodynamie biochimique

Mai 1999

©Éric Dumont, 1999



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude pharmacologique de la réponse fonctionnelle vasculaire produite par des
peptides vasoconstricteurs

présentée par:

Éric Dumont

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Nobuharu Yamaguchi, Ph.D.	président du jury
Daniel Lamontagne, Ph.D.	directeur de recherche
Pierre Moreau, Ph.D.	membre du jury
Gaétan Guillemette, Ph.D.	examineur externe
Alain Fournier, Ph.D.	représentant du doyen de la FÉS

Thèse acceptée le: 25 août 1999

Sommaire

L'objectif principal de ce projet était d'étudier par une approche fonctionnelle certains mécanismes de signalisation cellulaire menant à la vasoconstriction produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1. L'implication des tyrosine kinases, des canaux calciques de type L, des canaux chlore et des canaux potassiques dépendants de l'ATP lors de la vasoconstriction a été approfondie de façon plus particulière.

Quatre concepts tirés de la littérature du domaine de la contraction musculaire lisse ont orienté ces travaux. Premièrement, la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 stimulent l'activité de tyrosine kinases dans différents types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses vasculaires. La contraction de tissus musculaires lisses non-vasculaires induite par la vasopressine et l'angiotensine II est inhibée en partie par des inhibiteurs des tyrosine kinases. De plus, des agents vasoactifs tels la sérotonine, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et la noradrénaline impliquent des tyrosine kinases lors de la contraction de certains vaisseaux. Deuxièmement, la contribution des canaux calciques de type L dans la contraction musculaire lisse autant vasculaire que viscérale est bien connue. Cependant, il semble que cette contribution soit variable d'un vasoconstricteur à l'autre. De plus, on connaît peu les mécanismes d'activation et de modulation de l'activité de ces canaux calciques dans le muscle lisse vasculaire. Troisièmement, la vasoconstriction produite par différents agents vasoactifs sous-entend la

dépolarisation du tissu vasculaire. L'ouverture de canaux chlore membranaires stimule une sortie d'ions chlore provoquant une dépolarisation de la cellule qui pourrait, favoriser l'activité des canaux calciques membranaires. L'implication de canaux chlore membranaires a été démontrée lors de la vasoconstriction produite par la noradrénaline. Quatrièmement, des études électrophysiologiques ont démontré que la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 pouvaient inhiber un courant potassique sortant dépendant de l'ATP. Cette diminution de la sortie d'ions potassium provoquerait une accumulation de charges positives dans la cellule menant à une dépolarisation et, peut-être, à la vasoconstriction.

Les études faisant l'objet de la présente thèse ont été faites sur un modèle d'anneaux aortiques isolés où les contractions isométriques ont été mesurées. Des courbes action-doses à la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 ont été effectuées en présence d'agents pharmacologiques permettant d'évaluer la contribution des différents mécanismes. Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosine kinases, des canaux calciques de type L, des canaux chlore ainsi que des canaux potassiques dépendants de l'ATP ont permis d'évaluer la véracité des hypothèses.

Les résultats obtenus suggèrent une contribution importante des tyrosine kinases lors de la contraction vasculaire produite par des peptides vasoactifs. Cependant, l'identité de ces tyrosine kinases reste à être démontrée. De plus, la localisation de ces tyrosine kinases dans la cascade de signalisation cellulaire

menant à la contraction artérielle n'est pas encore clairement établie. Ces études proposent aussi une implication importante des canaux calciques de type L et des canaux chlore lors de la contraction produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1. Incidemment, tout porte à croire qu'une étroite relation existe entre l'activité des tyrosine kinases et de ces canaux ioniques. Finalement, les canaux potassiques dépendants de l'ATP ne semblent pas être impliqués dans le maintien du tonus vasculaire ni dans la contraction des grandes artères de conductance produite par la vasopressine et l'endothéline-1.

Table des matières

Sommaire	iii
Liste des figures	xiii
Liste des sigles et abréviations	xvii
Remerciements	xix
Avant-propos	xx
Chapitre 1: Introduction	1
1.1 La contraction du muscle lisse vasculaire	2
1.1.1 Interaction ligands-protéines réceptrices	2
1.1.2 Protéines G hétérotrimériques	3
1.1.3 Effecteurs des protéines Gq	6
1.1.3.1 Voie des phospholipases C	6
1.1.3.2 Voie des phospholipases A ₂	8
1.1.3.3 Voie des phospholipases D	9
1.1.4 Les seconds messagers de la contraction musculaire lisse	

vasculaire	10
1.1.4.1 L'IP ₃	11
1.1.4.2 Le DAG	12
1.1.5 Les canaux ioniques du muscle lisse vasculaire	12
1.1.5.1 Les canaux calciques	13
1.1.5.1.1 Sources intracellulaires de calcium ..	14
1.1.5.1.2 Sources extracellulaires de calcium ..	19
1.1.5.2 Les canaux potassiques	28
1.1.5.2.1 Les canaux potassiques sensibles au voltage (K _v)	28
1.1.5.2.2 Les canaux potassiques à large conductance activés par le calcium (Maxi-K)	28
1.1.5.2.3 Les canaux potassiques activés par le calcium à faible conductance sensibles à l'apamine	29
1.1.5.2.4 Les canaux potassiques dépendants de l'ATP (K _{ATP})	29
1.1.5.2.5 Les canaux potassiques à rectification entrante (K _{IR})	32
1.1.5.3 Les canaux chlore	33

1.1.5.3.1 Les canaux chlore sensibles à la dépolarisation	34
1.1.5.3.2 Les canaux chlore activés par le calcium ($I_{Cl(Ca)}$)	35
1.1.5.3.3 Les canaux chlore à haute conductance	35
1.1.5.4 Les canaux sodiques	36
1.1.6 Les kinases et les phosphatases	36
1.1.6.1 Les sérine/thréonine kinases	37
1.1.6.1.1 Les protéine kinases C	37
1.1.6.1.2 La kinase des chaînes légères de myosine (KCLM)	40
1.1.6.2 Les tyrosine kinases	42
1.1.6.3 Les sérine/thréonine phosphatases	45
1.1.7 Régulation de l'interaction actine-myosine dans la contraction du muscle lisse vasculaire	46
1.1.7.1 La caldesmone	46
1.1.7.2 La calponine	48
1.1.8 L'endothélium vasculaire	49
1.2 Les peptides vasoconstricteurs	51
1.2.1 La vasopressine	51

1.2.1.1 Synthèse et libération	51
1.2.1.2 La vasopressine et la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires	53
1.2.2 L'angiotensine II	54
1.2.2.1 Synthèse et libération	54
1.2.2.2 L'angiotensine II et la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires	55
1.2.3 L'endothéline	56
1.2.3.1 Synthèse et libération	56
1.2.3.2 Effets de l'endothéline sur les cellules musculaires lisses vasculaires	57
1.3 Hypothèses de travail	61
1.3.1 Implication des tyrosine kinases dans la vasoconstriction produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1	61
1.3.2 Implication et modulation par les tyrosine kinases de différents canaux ioniques lors de la vasoconstriction produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1	62
1.3.2.1 Les canaux calciques	62
1.3.2.2 Les canaux chlore	63

1.3.3.3 Les canaux potassiques dépendants de l'ATP	63
1.4 Objectifs général et spécifiques	64
Chapitre 2: Pharmacological study of the interaction between tyrosine kinases and calcium channels in rat aorta	
2.1 Abstract	66
2.2 Introduction	66
2.3 Material and methods	68
2.3.1 Vessel preparation	68
2.3.2 Statistical analysis	69
2.3.3 Drugs	69
2.4 Results	70
2.5 Discussion	72
Chapitre 3: Pharmacological study of the interaction between chloride channels and tyrosine kinases in the contractile response of rat aorta	
3.1 Abstract	79
3.2 Introduction	79
3.3 Material and methods	81
3.3.1 Vessels preparation	81

	xi
3.3.2 Experimental protocols	82
3.3.3 Statistical analysis	83
3.3.4 Drugs	83
3.4 Results	84
3.5 Discussion	86
3.6 Conclusion	89
Chapitre 4: No role of ATP-sensitive potassium channels in the vasoconstriction produced by vasopressin	94
4.1 Abstract	94
4.2 Introduction	95
4.3 Methods	96
4.3.1 Vessel preparation	96
4.3.2 Statistical analysis	97
4.3.3 Drugs	97
4.4 Results	98
4.5 Discussion	100
Chapitre 5: Discussion générale et conclusions	108
5.1 Voies tyrosine kinases du muscle lisse vasculaire	110
5.1.1 Voies tyrosine kinases mises en jeu par la vasopressine dans	

	xii
le muscle lisse vasculaire	110
5.1.2 Voies tyrosine kinases mises en jeu par l'angiotensine II dans le muscle lisse vasculaire	111
5.1.3 Voies tyrosine kinases mises en jeu par l'endothéline-1 dans le muscle lisse vasculaire	111
5.2 Effecteurs mis en jeu par les tyrosine kinases lors de la contraction vasculaire	112
5.2.1 Canaux calciques de type L	114
5.2.2 Canaux chlore	116
5.2.3 Canaux K_{ATP}	117
5.3 Conclusions	119
5.4 Perspectives	119
Bibliographie	122
Annexe I	xxi
Annexe II	xxiv

Liste des figures

Figure 1.1 Structure tri-dimensionnelle d'un récepteur à sept domaines transmembranaires illustrant le site de liaison des agonistes.	2
Figure 1.2 Cycle fonctionnel des protéines G hétérotrimériques.	5
Figure 1.3 Structure de quelques sous-types de phospholipases de type C.	6
Figure 1.4 Cycle métabolique des phosphoinositols.	11
Figure 1.5 Libération du calcium des sources intracellulaires sensibles à l'IP ₃ et représentation schématique du récepteur-canal à l'IP ₃	15
Figure 1.6 Représentation schématique de la structure du canal calcique sensible au voltage.	19
Figure 1.7 Structure chimique de trois types de bloquant des canaux calciques de type L.	24
Figure 1.8 Structure du canal potassique dépendant de l'ATP.	30
Figure 1.9 Structure chimique des sulphonylurés.	31
Figure 1.10 Structure des principales protéine kinases de type C.	38
Figure 1.11 Mécanisme de régulation de l'activité des protéine kinases C.	39
Figure 1.12 Illustration du rôle de la KCLM dans le processus de contraction du muscle lisse.	41
Figure 1.13 Illustration de la voie des MAP kinases.	43
Figure 1.14 Illustration de la synthèse de vasopressine à partir de sa préprohormone.	52

Figure 1.15 Illustration du métabolisme de l'angiotensine II.	55
Figure 1.16 Schéma récapitulatif des voies de signalisation menant à la contraction du muscle lisse vasculaire.	60
Figure 2.1 Maximal response evaluated by fitting dose-response curves to phenylephrine (0.01nM-10µM) and KCl (1-56mM) in the absence or presence of tyrosine kinase inhibitor genistein.	75
Figure 2.2 Dose-response curves to vasopressin under control conditions, in the presence of genistein, nifedipine or both nifedipine and genistein given together	76
Figure 2.3 Dose-response curves to angiotensin II under control conditions, in the presence of genistein, nifedipine or both nifedipine and genistein given together	77
Figure 2.4 Dose-response curves to endothelin-1 under control conditions, in the presence of genistein, nifedipine or both nifedipine and genistein given together	78
Figure 3.1 Dose-response curves to KCl under control conditions or in the presence of IAA-94.	90
Figure 3.2 Dose-response curves to vasopressin under control conditions, in the	

presence of IAA-94, genistein or both IAA-94 and genistein given together.	91
Figure 3.3 Dose-response curves to angiotensin II under control conditions, in the presence of genistein, IAA-94 or both genistein and IAA-94 given together	92
Figure 3.4 Dose-response curves to endothelin-1 under control conditions, in the presence of genistein, IAA-94 or both genistein and IAA-94 given together	93
Figure 4.1 Dose-response curves to vasopressin, and to phenylephrine under control conditions, and in the presence of 1 μ M glibenclamide.	104
Figure 4.2 Relaxation of phenylephrine-induced (0.3 μ M) and vasopressin-induced (0.1 μ M) tension as a function of the logarithm of lemakalim concentration and papaverine concentration.	105
Figure 4.3 Dose-response curves to phenylephrine under control conditions, and in the presence of 0.1 μ M lemakalim. The ordinate indicates the constriction relative to a standard 1 μ M phenylephrine constriction performed in the absence of any other drug.	106
Figure 4.4 Relaxation of phenylephrine-induced (0.3 μ M) and vasopressin-induced (0.1 μ M) tension as a function of the logarithm of nifedipine concentration.	107

Figure 5.1 Courbes action-doses à l'endothéline-1 en absence et en présence de
glibenclamide. 117

Liste des sigles et abréviations

AC9	Acide anthracène-9-carboxylique
ADNc	ADN complémentaire
cADP-ribose	Adénosine biphosphate cyclique-ribose
ATP	Adénosine triphosphate
AT ₁	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
AT ₂	Récepteur à l'angiotensine II de type 2
[Ca ²⁺] _i	Concentration de calcium intracellulaire
Ca ²⁺ -CaM	Complexe calcium-calmoduline
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
DAG	Diacylglycérol
DIDS	4,4'-diiso-thiocyanostilbène-2,2'-disulphonate
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
ET _A	Récepteur à l'endothéline de type A
ET _B	Récepteur à l'endothéline de type B
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
I _{ba}	Courant ionique Ba ²⁺
IP ₃	Inositol trisphosphate

IP	Inositol phosphate
IAA-94	Acide indanyloxiacétique
JAK	<i>Janus</i> kinase
K _{ATP}	Canal potassique dépendant de l'ATP
KCLM	Kinase des chaînes légères de myosine
K _{IR}	<i>Inward rectifier potassium current</i>
LC ₂₀	Chaîne légère de myosine
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PIP ₂	Phosphatidyl inositol biphosphate
pS	picosiemens
ROC	<i>Receptor operated channel</i>
SITS	4-acétamide-4'-isothiocyanostilbène-2,2'-disulphonate
SUR	Unité réceptrice aux sulphonylurés
V _{1a}	Récepteur à la vasopressine de type 1A
V _{1b}	Récepteur à la vasopressine de type 1B
V ₂	Récepteur à la vasopressine de type 2

Remerciements

C'est avec grand enthousiasme que j'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance à tous ceux et celles qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Merci à mon directeur de thèse, Daniel Lamontagne, pour ta grande patience et pour m'avoir donné ma chance.

Merci à mes professeurs, Gilbert Blaise, Louis Dumont, Chantal Lambert, Nobuharu Yamaguchi, Jacques de Champlain et Guy Drolet, pour m'avoir transmis votre passion pour la recherche.

Merci à toute ma famille, particulièrement à Claude, Andrée, Hugo, Pascale, Hugues, Raphaël et Laurent pour votre confiance et votre appui inconditionnel.

Un merci bien spécial à Jacques, Louise, Sylvie et Mélanie, pour votre grande compréhension.

Merci à mes amis, Marc, Jean-François F., Claude, Jean-François B., Esther, Denis, Stéphane, Raphaël, Cédric, Eric, Nicolay, Mylène, Jean-Pascal, Patrick, Rania et Stéphanie. Sans vous je n'y serais tout simplement pas arrivé.

Avant-propos

Cette thèse est divisée en cinq chapitres dont une introduction générale (chapitre 1) et une discussion générale (chapitre 5). Les trois chapitres constituant le corps de la thèse ont été rédigés sous forme d'articles qui sont, ou publiés, ou soumis dans des journaux avec évaluation par comité de pairs. Le manuscrit intitulé *Pharmacological study of the interaction between tyrosine kinases and calcium channels in the rat aorta* (chapitre 2) a été soumis récemment au journal *Pharmacology*. Le second manuscrit, *Pharmacological study of the interaction between chloride channels and tyrosine kinases in the contractile response of rat aorta* (chapitre 3), a été soumis au journal *Fundamental and Clinical Pharmacology*. Finalement, le manuscrit faisant l'objet du chapitre 4 et s'intitulant *No role of ATP-sensitive potassium channels in the vasoconstriction produced by vasopressin* a été publié en 1995 dans le *Journal of Vascular Research*, Vol. 32(2): 138-142. Dans les trois cas, les auteurs sont Éric Dumont et Daniel Lamontagne.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Le rôle du système vasculaire est d'assurer la circulation du sang à travers tout l'organisme et ainsi de permettre à chaque cellule les échanges gazeux, l'apport en énergie ainsi que l'élimination des déchets, tâches essentielles à sa survie. Le système vasculaire des mammifères se divise en une circulation systémique et une circulation pulmonaire. Chacune de ces circulations est formée d'un réseau bien organisé de vaisseaux de différentes tailles et de différentes compositions ayant des rôles bien précis. Le sang est éjecté du coeur vers les grandes artères de conductance (aorte, artères pulmonaires, carotide commune) qui sont reconnues pour leur élasticité. En effet, leur capacité à absorber les fluctuations de débit créées par la propulsion cyclique du sang par le coeur permet une circulation constante du sang dans le réseau vasculaire. Le sang poursuit sa route dans les artères de calibre moyen (e.g. brachiales) qui sont des vaisseaux de distribution dont la paroi musculaire importante permet l'aiguillage du sang vers les régions adéquates. Les branches des artères de distribution deviennent des artères de résistance (entre 100 et 300 μ M de diamètre) et finalement des artérioles (moins de 100 μ M) qui contrôlent le débit sanguin aux capillaires. Étant distribuées en parallèle, les artères de résistance et les artérioles imposent la pression sanguine. Les capillaires sont formés pour la plupart d'une simple couche de cellules endothéliales à travers lesquelles se font les échanges entre le sang et les tissus. Les

artères sont donc des organes dont la dynamique de contraction et de relaxation aura un impact capital sur la circulation sanguine. Elles répondent à différents stimuli physiologiques suite à la contraction ou à la relaxation des cellules musculaires lisses de leur paroi. Lorsqu'une hormone vasoconstrictrice stimule un récepteur membranaire, un processus biochimique complexe se met en branle. Cette signalisation intracellulaire mènera finalement au glissement des filaments d'actine sur les têtes de myosine provoquant ainsi le raccourcissement de la fibre musculaire.

1.1 La contraction du muscle lisse vasculaire

1.1.1 Interaction ligands-protéines réceptrices

Plusieurs types de protéines sont spécialisées dans la reconnaissance des différents ligands et sont le point de départ vers une réponse cellulaire adéquate.

Il existe des récepteurs intracellulaires et membranaires. Les récepteurs des hormones peptidiques sont exclusivement membranaires et font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G

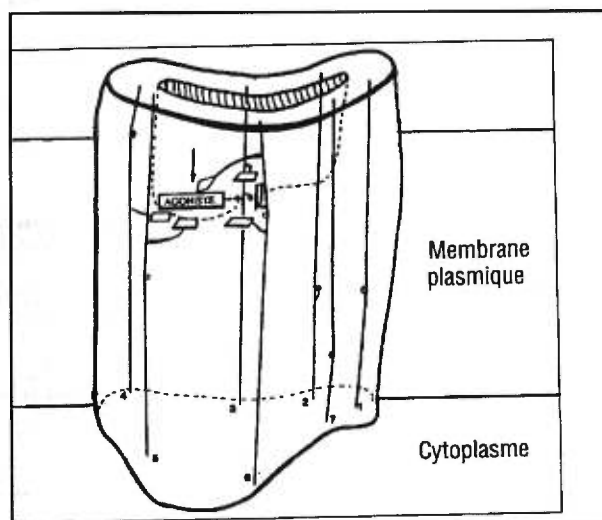


Figure 1.1 Structure tri-dimensionnelle d'un récepteur à sept domaines transmembranaires illustrant le site de liaison des agonistes. Adapté de Landry et Gies (1994)

hétérotrimériques(129).

De façon générale, les récepteurs à sept domaines transmembranaires sont des glycoprotéines de 350 à 800 acides aminés qui présentent entre eux une homologie de séquence primaire de 6 à 93%. La partie N-terminale est toujours extracellulaire et possède un nombre variable de sites de glycosylation selon le sous-type. La partie C-terminale ainsi que la troisième boucle intracellulaire portent des sites de phosphorylation (sérine, thréonine et quelques fois tyrosine) assurant la régulation de l'interaction avec la protéine G. Les sept hélices α transmembranaires, représentant les régions les plus conservées, sont chacune formées d'environ vingt acides aminés et sont responsables de la liaison du ligand. La structure tri-dimensionnelle des récepteurs à sept domaines transmembranaires suggère une poche hydrophobe formée par les hélices 3,4,5 et 6 assurant le site de liaison du ligand(129).(Figure 1.1)

La liaison de l'agoniste induit un changement de conformation modifiant l'accessibilité de la troisième boucle intracytoplasmique favorisant ainsi l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques(129).

1.1.2 Protéines G hétérotrimériques

Le récepteur stimulé fera donc basculer les protéines G de leur état inactif à un état actif. Les protéines G favoriseront ainsi l'activité d'un effecteur ou de plusieurs effecteurs(129).

Les protéines G hétérotrimériques sont constituées de trois sous-unités

protéiques. Tout d'abord, une sous-unité α qui se divise elle-même en six régions bien définies(290). Premièrement, les sites de liaison des nucléotides guanyliques (GTP, GDP). Deuxièmement, on retrouve le site ATPasique de la protéine G. Troisièmement, sur la partie C-terminale, les sites d'interaction avec le récepteur. Quatrièmement, aux 2/3 de la partie C-terminale se retrouve le site d'interaction avec l'effecteur. Cinquièmement, cette fois-ci sur la portion N-terminale de la protéine, on retrouve le site d'interaction avec la sous-unités $\beta\gamma$. Finalement, des sites d'ancrage à la membrane se retrouvent aussi sur la sous-unité α . Les deux autres sous-unités des protéines G sont souvent traitées comme une seule entité et reconnues comme le complexe $\beta\gamma$ (129). On connaît moins bien le rôle du complexe $\beta\gamma$ quoiqu'on soupçonne certaines formes de régulation de certains effecteurs ainsi que de l'interaction sous-unité α -récepteur(172,219). Les sous-unités $\beta\gamma$ sont liées à la membrane par isoprénylation(129).

Les protéines G hétérotrimériques sont regroupées en quatre familles selon l'homologie de séquence de leurs sous-unités α . Premièrement, la famille de Gs qui est sensible à la toxine cholérique et qui se caractérise principalement par son couplage positif à l'adénylate cyclase. Deuxièmement, la famille de Gi sensible à la toxine pertussique et dont la plupart des sous-familles inhibent l'adénylate cyclase. On connaît d'autres rôles pour la famille de Gi soit l'activation de canaux potassiques, de phospholipases C et de phosphodiésterases(391). Troisièmement, la famille de Gq dont tous les représentants activent les phospholipases C de type

β (377). Finalement, on a identifié la famille de G12 dont le ou les effecteurs sont encore inconnus(380). Plusieurs évidences suggèrent que les récepteurs V_{1a} , AT_1 et ET_A interagissent avec des

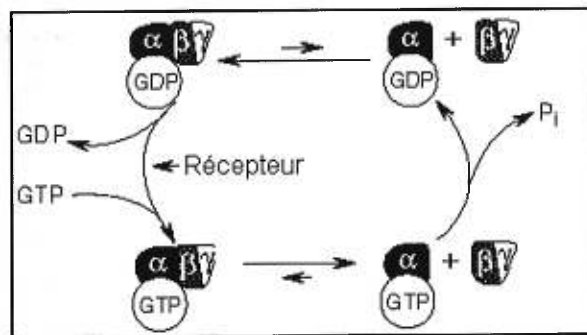


Figure 1.2 Cycle fonctionnel des protéines G hétérotrimériques. Adapté de Goodman & Gilman's (1995)

protéines G de type Gq et qu'ils sont donc couplés positivement aux phospholipases C de type β (267,342). Quelques auteurs proposent que le récepteur V_{1a} pourrait être couplé à des protéines G sensibles à la toxine pertussique(27,166). Cependant, cette contribution de protéines Gi n'a pas été démontrée dans la contraction musculaire lisse vasculaire produit par la vasopressine.

Le cycle fonctionnel des protéines G se divise en plusieurs étapes suivant l'interaction ligand-récepteur (Figure 1.2). La présence du ligand libère le GDP favorisant ainsi la liaison du GTP à la sous-unité α . La présence du GTP catalyse la libération du complexe $\beta\gamma$. Le complexe α -GTP stimule l'activité de l'effecteur jusqu'à l'hydrolyse du GTP. Le complexe α -GDP ainsi formé retrouve les sous-unités $\beta\gamma$ et, par le fait même, une affinité pour les récepteurs(129).

Plusieurs agents pharmacologiques peuvent être utilisés pour étudier les protéines G. Les toxines pertussique et cholérique sont largement utilisées pour identifier les protéines G mises en cause dans un phénomène. En effet, la toxine

pertussique ADP-ribosyle la sous-unité α_i empêchant ainsi sa liaison au récepteur(180). La toxine cholérique catalyse la liaison d'un ADP-ribose sur une arginine voisine du site de liaison du GTP, diminuant de façon importante l'hydrolyse de ce dernier(49). Le fluorure de sodium en présence d'aluminium favorise la formation d' AlF^{3+} qui remplace le phosphate γ du GTP le rendant ainsi non-hydrolysable(30). Finalement, il existe des analogues non-hydrolysables du GTP qui s'avèrent très utiles dans les études des protéines G.

1.1.3 Effecteurs des protéines Gq

1.1.3.1 Voie des phospholipases C

La principale voie mise en jeu par les protéines Gq est la voie des phospholipases C. Les phospholipases C sont des phosphodiesterases responsables de la production de seconds messagers lipidiques. Les phospholipases C existent sous forme cytosolique et membranaire. Cependant, leurs effets physiologiques sont principalement attribués à la forme membranaire. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, l'activation des

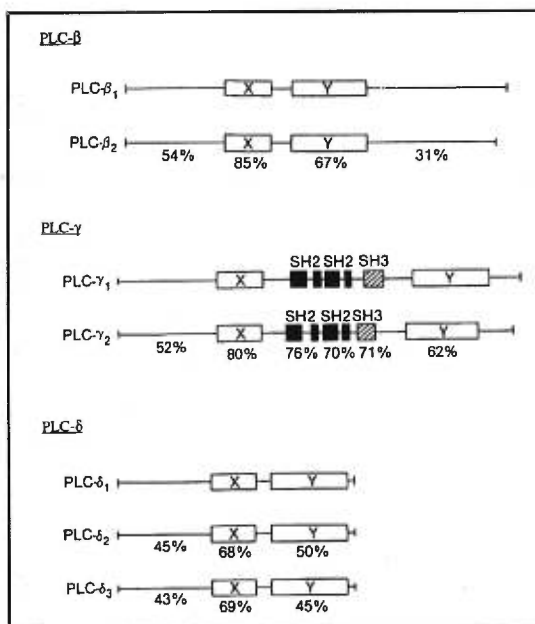


Figure 1.3 Structure de quelques sous-types de phospholipases de type C. Adapté de Landry et Gies(1994)

phospholipases C par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 a été démontrée comme étant une des voies principales impliquées dans la contraction (80,287,304).

Trois types et plus précisément neuf sous-types de phospholipases C ont été identifiés jusqu'à maintenant (Figure 1.3)(288). Les sous-types $\beta(1,2,3)$ sont impliqués dans plusieurs réponses physiologiques, incluant la contraction du muscle lisse vasculaire. En effet, leur activité est étroitement reliée aux protéines G de type Gq(32,326). L'intérêt pour les phospholipases de type γ (sous-types 1 et 2) est sans cesse grandissant, et ce principalement à cause de domaines SH que l'on retrouve dans leur séquence. Ces domaines SH rendent possible l'interaction des phospholipases C de type γ avec des enzymes à activité tyrosine kinase(177,288). Finalement, on connaît peu de chose sur les phospholipases C de type delta dont 4 sous-types ont été clonés(288).

L'activité préférentielle des phospholipases C est l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et en DAG, deux seconds messagers d'origine phospholipidique importants dans plusieurs réponses cellulaires y compris la contraction musculaire lisse vasculaire(211). L'activité des phospholipases est principalement sous le contrôle des différentes sous-unités des protéines G. Notons par exemple le complexe α_q -GTP qui favorise particulièrement l'activité des sous-types β_1 et β_2 (382). Les complexes β_{γ_i} et α_i activent plutôt les phospholipases de type β_3 (382). Les phospholipases C_{γ} sont quant à elles activées par phosphorylation de certains de

leurs résidus tyrosines. Par exemple, les récepteurs à activité tyrosine kinase tels les récepteurs à l'EGF ou au PDGF sont de puissants activateurs des phospholipases C γ (177,288). On connaît aussi des inhibiteurs des phospholipases C tels que les protéine kinases de type A et G(211).

Il existe des substances pharmacologiques permettant l'étude des phospholipases C. Notons le U-73122, substance liposoluble qui pénètre la membrane et agit comme pseudosubstrat, occupant le site de liaison du substrat sans activer l'enzyme. Cependant, le U-73122 reste une substance non-spécifique qui démontre aussi des effets inhibiteurs sur les phospholipases de type A₂(36).

1.1.3.2 Voie des phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ sont des enzymes cytosoliques ou membranaires principalement impliquées dans les processus inflammatoires. Des évidences ont démontré la stimulation de l'activité des phospholipases A₂ lors du signal généré par le récepteur V_{1a} à la vasopressine dans la lignée de cellules musculaires lisses vasculaires de rat A7r5(166). Cependant, le rôle des phospholipases A₂ n'a pas été démontré dans la contraction du muscle lisse vasculaire.

Quatre isoformes de phospholipases A₂ ont été dénombrées selon leur poids moléculaire respectif. Les types I à III (14kDa) se retrouvent respectivement dans le pancréas, les plaquettes et le venin d'abeille. Le type IV (85kda) se retrouve dans plusieurs types cellulaires comme les plaquettes et les macrophages(74).

Les phospholipases A₂ hydrolysent les phospholipides membranaires

contenant l'acide arachidonique en position sn2. L'acide arachidonique sera ensuite métabolisé en prostaglandines, leukotriènes et autres tromboxanes, substances hautement vasoactives(74).

1.1.3.3 Voie des phospholipases D

On connaît encore mal le rôle, la structure ainsi que la distribution des phospholipases de type D(88). Par contre, leur activation a été démontrée en réponse à la stimulation du récepteur V_{1a} par la vasopressine dans des cellules musculaires lisses vasculaires de rat en culture(342). De plus, la stimulation des phospholipases D par l'angiotensine II, et ce, par un couplage direct entre le récepteur AT_1 et l'enzyme(98) ou indirect via l'activité de la protéine kinase C et le calcium(97) a été démontrée. Finalement, on sait aussi que la stimulation du récepteur ET_A par l'endothéline-1 favorise l'activité des phospholipases D (218). On ne connaît cependant pas le rôle que pourrait jouer cette enzyme dans la contraction musculaire lisse vasculaire.

Les phospholipases D hydrolysent préférentiellement la phosphatidylcholine en choline et acide phosphatidique. L'acide phosphatidique est hydrolysé par une phosphohydrolase en DAG libérant un phosphate inorganique. Ce DAG pourrait contribuer à la contraction musculaire(88). Plusieurs voies semblent être impliquées dans l'activation des phospholipases D. La protéine kinase C et le calcium sont importants, d'où l'hypothèse d'une implication indirecte des substances mobilisant le calcium dans l'activation des

phospholipases D(88). De plus, la phosphorylation de l'enzyme sur des résidus tyrosines est la principale voie d'activation des phospholipases D(88). Ainsi, les récepteurs à activité tyrosine kinase favorisent l'activité de la phospholipase D(88). Présentement, on spéculé sur la modulation potentielle de l'activité des phospholipases D par des tyrosine kinases cytosoliques ou associées à la membrane(352).

1.1.4 Les seconds messagers de la contraction musculaire lisse vasculaire

La production de second messagers intracellulaires est un mécanisme des plus versatile et des plus répandu de la signalisation cellulaire utilisé pour transformer une stimulation extracellulaire en une réponse cellulaire. Les seconds messagers d'origine lipidique se sont avérés des acteurs importants de la signalisation cellulaire. Ainsi, les phospholipides membranaires contiennent de l'information importante en plus de leur rôle structurel. Cette information sera libérée suite à l'action de phospholipases spécifiques. Les deux seconds messagers d'origine lipidique les mieux caractérisés sont l' IP_3 et le DAG(26).

1.1.4.1 L'IP₃

L'IP₃ est libéré dans le cytosol et exerce un rôle bien précis, soit de stimuler l'activité du récepteur-canal à l'IP₃ de la membrane du reticulum

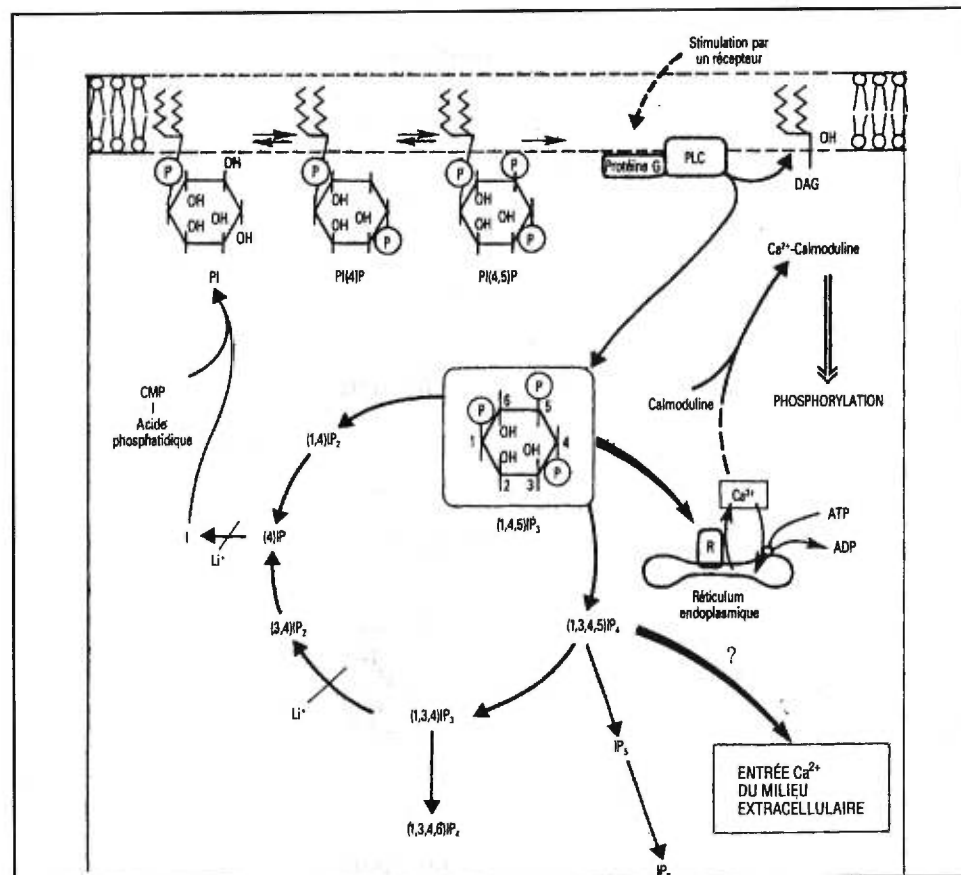


Figure 1.4 Cycle métabolique des phosphoinositols. Adapté de Landry et Gies (1994)

sarcoplasmique(90). L'ouverture du canal provoque le passage du calcium du reticulum sarcoplasmique vers le cytosol (Figure 1.5) (26).

L'IP₃ a une durée de vie très brève soit de quelques secondes à une minute avant d'être métabolisé selon deux voies enzymatiques distinctes afin d'une part

de reconstituer le PIP_2 membranaire et d'autre part de former de nouveaux messagers intracellulaires(26). Donc l' IP_3 sera rapidement hydrolysé en IP_2 et en IP avant d'être retourné à la membrane plasmique(163). Par contre, sous l'effet de différentes kinases, l' IP_3 pourra être phosphorylé en IP_4 et en IP_5 dont les rôles sont encore peu connus(163).

1.1.4.2 Le DAG

Le DAG reste quant à lui dans la membrane plasmique et lève l'auto-inhibition des protéine kinases C(211). Le DAG ancré à la membrane plasmique se lie aux structures en doigt de zinc de la protéine kinase C. En effet, deux molécules de DAG occupent les deux sites de liaison présents sur chaque protéine kinase de type C libérant ainsi le site de liaison du substrat de son pseudosubstrat, favorisant l'activité de l'enzyme(211).

Il semble que la production de DAG lors de la contraction du muscle vasculaire serait biphasique(261). En effet, une première production précoce proviendrait de l'hydrolyse du PIP_2 et serait suivie d'une production plus soutenue due à l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la phospholipase D. Le DAG sera ensuite recyclé en acide phosphatidique par une phosphorylation catalysée via la 1-2 DAG kinase(163).

1.1.5 Les canaux ioniques du muscle lisse vasculaire

Le potentiel de membrane au repos des muscles lisses vasculaires tel que mesuré à l'aide de micro-électrodes peut varier sensiblement d'une région

vasculaire à l'autre(64,122,199,200). Quoique le potentiel d'équilibre du potassium se retrouve autour de -85 à -90mV, un potentiel membranaire aussi bas que -45 à -50mV a été observé dans des tissus vasculaires spontanément actifs tels la veine porte de rat, de lapin ou de hamster. Dans les grandes artères de conductance, on mesure un potentiel de membrane au repos autour de -55 à -60mV. Les potentiels de membrane au repos les plus bas s'enregistrent dans les petites artères de résistance (-70 à -75mV)(201). Les mécanismes précis régissant l'établissement de potentiel de membrane au repos des cellules musculaires lisses vasculaires ne sont pas bien connus(347). Ce potentiel de membrane au repos pourrait être principalement déterminé par l'activité de canaux potassiques à large conductance (200-300pS) du fait qu'on les retrouve en très grande quantité dans la membrane plasmique (15 000/cellule)(347). Par contre, d'autres sources suggèrent que les courants K_v seraient responsable de l'établissement de ce potentiel de membrane (254).

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont des cellules excitables qui possèdent plusieurs représentants de différents types de canaux ioniques (Ca^{2+} , Na^{2+} , K^+ et Cl^-).

1.1.5.1 Les canaux calciques

La concentration intracellulaire de calcium $[Ca^{2+}]_i$ est régulée de façon très précise dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Le $[Ca^{2+}]_i$ est requis pour toute une gamme de réponse cellulaire y compris dans le couplage excitation-

contraction du muscle lisse vasculaire. Le calcium joue un rôle primordial dans la contraction musculaire lisse vasculaire. La liaison de quatre ions calcium sur la calmoduline est en quelque sorte le point de départ d'une série d'événements conduisant à la contraction du muscle lisse vasculaire. De plus, certaines évidences d'une forme de troponine C sur l'appareil contractile des cellules musculaires lisses vasculaires ont été démontrées. La liaison d'ions calcium sur la troponine C, lève une inhibition semblable à celle observée dans les muscles squelettiques. Il semble que l'activation des Ca^{2+} -CaM Kinase de type II favoriserait la phosphorylation de la calponine libérant ainsi l'activateur de l'ATPase de la myosine. Certains courants potassiques et chlore seraient aussi activés par le calcium.

L'étude des mouvements de calcium impliqués dans la contraction musculaire est un champ de recherche des plus complexes. Le calcium provient principalement de deux sources, soit du milieu extracellulaire et des sources intracellulaires. L'apport de calcium provenant du milieu extracellulaire aura une influence capitale sur les mouvements de calcium intracellulaire et vice-versa et ce, autant de façon directe que par l'intermédiaire d'enzymes dépendantes du calcium. Plus encore, l'énorme variété dans les tissus musculaires lisses rend difficile la généralisation des mécanismes de signalisation calcique. Seuls les mécanismes menant à des augmentations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lors d'une réponse aux agonistes seront abordés dans le cadre de cette thèse.

1.1.5.1.1 Sources intracellulaires de calcium

1.1.5.1.1.1 La libération de calcium sensible à l'IP₃

L'activation des phospholipases C β favorise, tel que vu précédemment, la formation de différents seconds messagers impliqués dans la contraction musculaire. L'IP₃ formé diffuse dans le cytosol et se lie à un récepteur-canal calcique qui lui est spécifique à la surface du réticulum sarcoplasmique.

Les récepteurs à l'IP₃ sont une famille de récepteur-canaux perméables au calcium. On connaît trois sous-types de récepteur à l'IP₃ (IP₃R1, IP₃R2, IP₃R3) chez les mammifères synthétisés suite à l'expression de trois gènes différents(233). Ce canal est une protéine tétramérique dont chacune des sous-unités est formée de

8 domaines transmembranaires. Les domaines 7 et 8 forment le canal (Figure 1.5). Les parties N- et C-terminales se situent sur la face cytosolique et le site de liaison de l'IP₃ est situé sur la partie N-terminale(90). L'ouverture du canal provoque le passage du calcium du réticulum

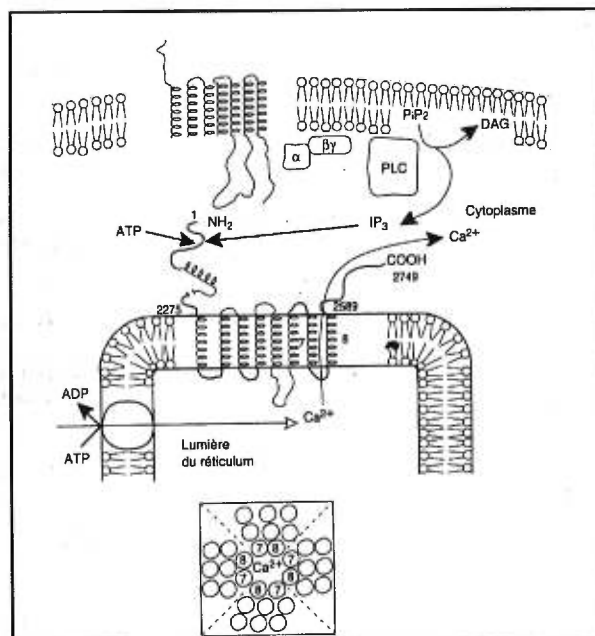


Figure 1.5 Libération du calcium des sources intracellulaires sensibles à l'IP₃ et représentation schématique du récepteur-canal à l'IP₃. Adapté de Landry et Gies (1994)

sarcoplasmique vers le cytosol représentant la source principale de calcium intracellulaire(90). L'IP₃ est le second messenger qui active le canal mais l'ATP et le calcium semblent potentialiser cette activation, leur site de liaison respectif se retrouvant également sur la portion N-terminale(90). De plus on dénombre des sites de phosphorylation reconnaissables par les protéine kinases de type A et C(90). Cependant, on ne connaît pas encore clairement la contribution de ces mécanismes de phosphorylation du récepteur. De plus la concentration du calcium intracellulaire a un impact important sur l'activité du récepteur-canal à l'IP₃. En effet, une concentration de calcium en deçà de 300nM est stimulante tandis qu'au-delà de 300nM, le calcium inhibe l'activité du récepteur-canal. L'efficacité de l'IP₃ à libérer le calcium des réserves intracellulaires se retrouve donc confinée à l'intérieur de cette fenêtre d'activation créée par la [Ca²⁺]_i(92).

L'héparine(131) et le décavanadate(93) ont longtemps été les seules substances utilisées pour étudier de façon directe l'activité du canal calcique sensible à l'IP₃. En effet, ces substances bloquent la mobilisation du calcium intracellulaire. Cependant, l'héparine autant que le décavanadate est peu sélective et pénètre difficilement à l'intérieur de la cellule. L'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur à l'IP₃ montre une bonne sélectivité et un bon potentiel d'inhibition de l'activité du canal. Malheureusement, les anticorps pénètrent peu la membrane plasmique(198). Les derniers développements dans la pharmacologie du récepteur à l'IP₃ démontrent que la xestospongine C, une substance très

liposoluble bloque de façon physique le canal et démontre une bonne sélectivité. Cette substance est l'outil de choix présentement dans l'étude du récepteur à l' IP_3 (100).

1.1.5.1.1.2 La libération de calcium sensible au calcium

Les mécanismes de libération du calcium sensible au calcium dans le muscle lisse sont particulièrement complexes et très mal compris. Par contre, il semble que la libération de calcium sensible au calcium se fasse via des canaux qu'on dit sensibles à la ryanodine.

Les récepteurs sensibles à la ryanodine sont classés en trois types soit muscle squelettique (RyR1), muscle cardiaque (RyR2) et non-musculaire (RyR3)(404). Les récepteurs sensibles à la ryanodine du muscle lisse vasculaire sont du type RyR3 mais des banques d'ADNc ont démontré que le type RyR2 y était aussi présent(404). La séquence exacte de libération du calcium induite par le calcium est très mal connue dans les cellules musculaires lisses vasculaires. L'existence de libération de calcium induite par le calcium dans des conditions physiologiques au niveau du muscle lisse vasculaire est encore controversée(25,337,404). Par contre, un complexe récepteur à la ryanodine-canal calcique(61,229) démontrant des propriétés semblables aux structures identifiées dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque a été partiellement purifié et reconstitué dans le muscle lisse(128,384). Il a de plus été démontré que la ryanodine pouvait affecter la contraction de plusieurs types de muscles lisse y

compris ceux caractérisés par une faible proportion de sites de liaison à la [³H]-ryanodine(400). Même si le récepteur sensible à la ryanodine partage plusieurs similitudes structurelles avec le récepteur à l'IP₃, il est totalement insensible à l'IP₃(137). De fait, on ne connaît que deux activateurs physiologiques du récepteur sensible à la ryanodine soit le calcium et le cADP-ribose(101,209). Cependant, le cADP-ribose n'induit pas la contraction des muscles lisses perméabilisés(209) et sa contribution reste à être démontrée. De plus la capacité du calcium à activer le récepteur à la ryanodine en conditions physiologiques est encore controversée(404).

L'étude de ces canaux ioniques est compliquée par le manque de substances spécifiques. La caféine a été longtemps utilisée comme potentialisateur de l'activité du canal mais montre peu de sélectivité(404). En effet, la caféine est un inhibiteur important des phosphodiésterases ce qui rend difficile l'interprétation des études faites avec cet agent. Le MBED(9-méthyl-7-bromoeudistomine D), un dérivé d'un produit isolé de *Eudistoma oliverceum*, a démontré des effets potentialisateurs importants de l'activité du canal sensible à la ryanodine sans affecter l'activité des phosphodiésterases, des Ca²⁺-ATPases ou de l'actomyosine(313). Aucune étude n'a par contre été faite sur les cellules musculaires lisses vasculaires.

1.1.5.1.2 Sources extracellulaires de calcium

On peut mesurer jusqu'à 1,6mM de calcium dans le milieu extracellulaire d'une cellule musculaire lisse vasculaire alors qu'on en retrouve très peu à l'intérieur de la cellule(100-300nM). Cet important gradient électrochimique permet une entrée massive d'ions calcium jusqu'à des concentrations capables d'outrepasser les importants mécanismes tamponnant le calcium dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Les canaux calciques membranaires peuvent être subdivisés selon que leur probabilité d'ouverture est augmentée par une dépolarisation de la membrane plasmique (sensibles au voltage) ou contrôlée directement par un ligand.

1.1.5.1.2.1 Les canaux calciques sensibles au voltage

Les canaux calciques sensibles au voltage sont ubiquitaires dans les cellules excitables. Ils appartiennent à une super famille génétique comprenant les canaux sodiques et potassiques sensibles au voltage. L'activation de ces canaux ioniques semble être le résultat d'un changement de conformation en réponse à une modification du potentiel transmembranaire.

Les canaux calciques ont été initialement classés en type L (Long lasting), T (Transient) et N (Neither ou neuronal)(258,265). Les types P (Purkinje), Q et R ont été ajoutés au tableau depuis(349,399). On ne retrouve que les types L et T au niveau de la membrane plasmique des cellules musculaires lisses vasculaires.

Les canaux calciques de type L et T ont tout d'abord été différenciés sur la

base de leur réponse aux variations de potentiel membranaire et de leur propriétés cinétiques(258,265). Les deux types ont été identifiés dans les cellules musculaires lisses(99). De façon générale, les études électrophysiologiques effectuées sur des cellules musculaires lisses ont démontrées que les courants de

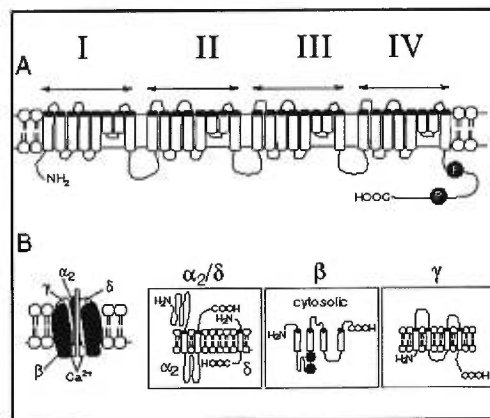


Figure 1.6 Représentation schématique de la structure du canal calcique sensible au voltage. **A** Structure des quatre motifs composant la sous-unité $\alpha 1$ **B** Agencement des différentes sous-unités du canal. Adapté de Goodman & Gilman's (1995)

type T s'activent et s'inactivent dans une fenêtre environ 20 à 40 mV plus hyperpolarisée que les courants de type L(6,21,99,105). Les courants unitaires de type T sont d'environ 8pS (100mM Ba²⁺) en comparaison des 25pS des courants L (100mM Ba²⁺) dans les cellules musculaires lisses vasculaires(105). De façon générale, les courants T sont beaucoup moins sensibles aux bloqueurs organiques des canaux calciques et démontrent une sensibilité différente aux cations(228). La contribution relative des deux types de courant telle que mesurée en mode cellule entière démontrent des variations importantes en fonction du type de cellule utilisé et des conditions de l'étude. Ainsi, des courants de type T aussi importants sinon plus importants que les courants L ont été démontrés dans quelques études effectuées sur des cellules musculaires lisses vasculaires en culture(6,364,392). Finalement, il semble que les courants de type T soient exprimés transitoirement

durant la culture des cellules musculaires lisses vasculaires compliquant ainsi leur caractérisation dans des modèles cellulaires d'électrophysiologie(104).

La structure moléculaire des canaux calciques de type L a été bien démontrée dans plusieurs tissus incluant les cellules musculaires lisses vasculaires (Figure 1.6)(349). Par contre, la structure des canaux calciques de type T n'a pas été clairement démontrée dans aucun tissu(146). Présentement, on croit que la structure des canaux L est un hétéroquintamère formé de cinq sous-unités protéiques $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ et δ (51,228,349). La sous-unité $\alpha 1$ contient les sites de liaison des antagonistes pharmacologiques des canaux calciques et formerait de surcroît le pore ionique. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, la sous-unité $\alpha 1$ est une protéine de 2 169 acides aminés évaluée à environ 243kD(189). Il s'agit d'une chaîne peptidique simple comprenant quatre unités homologues répétées formées de six hélices α ancrées dans la membrane dont la quatrième hélice serait la structure détectant les variations de potentiel membranaire(51,231). Plusieurs sites de phosphorylation (sérine, thréonine, tyrosine) pouvant être impliqués dans la modulation de l'activité du canal ont été identifiés sur la sous-unité $\alpha 1$ (66,212,333,401). Les autres sous-unités du canal calcique de type L semblent être des modulateurs importants de l'activité de la sous-unité $\alpha 1$ affectant sa cinétique d'activation, sa sensibilité aux modifications de potentiel transmembranaire ainsi que sa réponse aux dihydropyridines(202,319,357). La sous-unité $\alpha 2$ est une protéine hautement glycosylée de 140kD associée à la sous-

unité δ par un pont bisulphure(247). Il semble que la présence de cette sous-unité α_2 favorise le passage des ions Ca^{2+} . En effet des anticorps dirigés contre α_2 inhibe l'influx calcique dans des cellules musculaires lisses aortiques en culture(192). La sous-unité β est une protéine de 55kDa qui module l'activité de la sous-unité α_1 et qui serait une cible importante de phosphorylation(69,118). La sous-unité γ est une protéine de 35 kDa, ancrée dans la membrane, dont la fonction et la présence hors des muscles squelettiques sont incertaines(39,153).

On estime qu'au potentiel de membrane au repos (-60mV), la proportion de canaux calciques de type L actifs est suffisante pour permettre un influx calcique physiologiquement significatif dans la cellule(66,105,253). De plus, des évidences suggèrent qu'*in vivo*, les cellules musculaires lisses vasculaires seraient plus dépolarisées qu'*in vitro*. En effet, *in vivo*, des stimuli vasoconstricteurs constants (influx sympathiques, vasoconstricteurs circulants, tonus myogénique) optimiseraient l'activité des courants calciques de type L(46,134,250). La contribution des courants calciques de type T dans le tonus vasculaire lisse est beaucoup moins évidente. Il semble que la majorité des canaux T soient inactifs au potentiel de membrane au repos. Cependant, une légère hyperpolarisation de la membrane des cellules musculaires lisses vasculaires favorise de façon importante la réactivation des canaux T(103).

On dénombre une quantité importante de modulateurs endogènes de l'activité des canaux calciques dépendants du voltage. L'action de plusieurs agents

vasoactifs implique ces canaux calciques. En plus de causer la dépolarisation membranaire, plusieurs substances vasoactives semblent moduler directement l'activité de ces canaux. Néanmoins, on dénombre énormément de variations dans ces effets en fonction du tissu et des conditions expérimentales. Par exemple, les données sont relativement contradictoires lors de la réponse des canaux calciques de type L à une stimulation α_1 -adrenergique dans les cellules musculaires lisses vasculaires. À l'origine, deux études indépendantes(17,392) ont démontré que la noradrénaline n'avait aucun effet sur I_{ba} dans les artères mésentériques de rat ou la veine saphène de chien. De plus, Droogmans *et al.*(72,81) ont démontré que la noradrénaline et la phényléphrine inhibaient I_{ba} dans des cellules isolées de l'artère de l'oreille de lapin alors que Benham et Tsien (22) démontraient une activation des courants L par la noradrénaline dans le même modèle expérimental. Plusieurs autres agonistes vasoconstricteurs incluant l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat et de lapin(34,267), l'histamine dans la veine saphène de lapin(268) et la sérotonine dans les artères cérébrales de lapin(381) augmentent les courants calciques. L'endothéline-1 avait été proposée à l'origine comme étant le ligand endogène des canaux calciques(387). Cependant, des études subséquentes ont démontré que l'endothéline-1 n'agissait pas directement sur le canal mais plutôt via sa liaison à son récepteur membranaire(356). Néanmoins, l'endothéline-1 augmente les courants calciques dans les cellules musculaires lisses vasculaires tel que démontré en mode cellule entière(114) ou canal isolé(316). Il

a été bien démontré qu'une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ diminuait les courants calciques de type L sans avoir d'effet majeurs sur les courants T dans plusieurs types cellulaires(350). Le mécanisme exacte de cette inhibition est cependant inconnu. Des sites de liaison pour le calcium liés à des mécanismes d'inactivation membranaire situé près du pore ont été proposés(325). Les variations du pH extracellulaire affectent les courants L; une alcalinisation augmente alors que l'acidification diminue l'activité des canaux L(185,372). Finalement, les mécanismes de phosphorylation sont grandement impliqués dans la modulation de l'activité du canal calcique de type L. De fait les protéine kinases C et la calmoduline sont de puissants modulateurs des canaux calciques sensibles au voltage(312,385,398).

Les propriétés des bloquants pharmacologiques de canaux calciques de type L comme les dihydropyridines(nifédipine), les phénylalkylamine(vérapamil) et les benzothiazépines(diltiazem) sont bien connues (Figure 1.7)(201,228). Les mécanismes

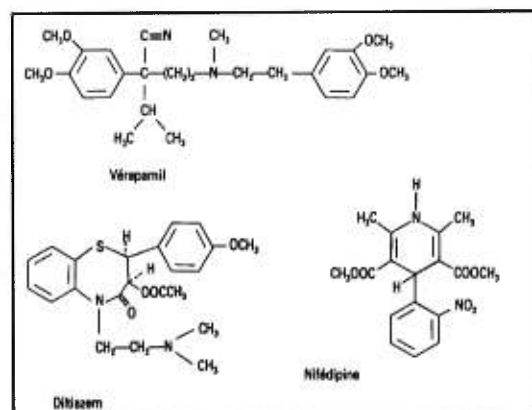


Figure 1.7 Structure chimique de trois types de bloquant des canaux calciques de type L. Adapté de Landry et Gies (1994)

d'action de ces agents ont été étudiés dans plusieurs types cellulaires y compris dans les cellules musculaires lisses vasculaires(201). Plusieurs évidences suggèrent

que les cellules musculaires lisses vasculaires seraient plus sensibles aux dihydropyridines(17,227,392). Les caractéristiques classiques des bloquants des canaux calciques ont été bien démontrées dans le muscle lisse vasculaire(201,228). Toutes les classes de bloquant des canaux calciques déplacent l'état d'inactivation des canaux à des potentiels plus négatifs(17,127,197,339). Les études faites sur des myocytes vasculaires démontrent que l'affinité du canal calcique pour les dihydropyridines augmente avec les potentiels dépolarisés(227). Plusieurs études démontrent une insensibilité des canaux de type T aux antagonistes organiques du calcium(17,127,197,339). Un nouveau composé, le mibéfradil qui semble inhiber sélectivement le canal calcique de type T lorsqu'utilisé à des concentrations de 0.1 μ M, permettra peut-être de mieux caractériser ce canal (235).

1.1.5.1.2 Les courants calciques capacitifs

Dans les cellules non-excitables (cellules endothéliales, hépatocytes, cellules épithéliales), l'influx calcique se fait vraisemblablement via des voies sensibles à la $[Ca^{2+}]_i$, les courants calciques capacitifs(282). Ces courants capacitifs peuvent être mis en évidence par application de thapsigargine, un inhibiteur des Ca^{2+} -ATPases du reticulum sarcoplasmique(340). En effet, la vidange des sources intracellulaires de calcium représente le principal stimulus de cette entrée capacitative de calcium. Dans les cellules excitables telles les neurones, les muscles et les cellules endocriniennes, l'influx calcique se fait

principalement via les canaux calciques sensibles au voltage. Cependant, quelques évidences suggèrent l'implication des courants capacitifs dans de tels types cellulaires. Par exemple, l'application intracellulaire de thapsigargine provoque la contraction du muscle lisse vasculaire(232,305).

On ne connaît pas encore le signal intracellulaire qui stimule cette entrée capacitative de calcium. Cependant, trois hypothèses ont été suggérées soit un messenger soluble(283), un couplage conformationnel(162) ou encore par traficque vésiculaire(89). Deux types de courants capacitifs ont été identifiés jusqu'à maintenant soit le courant I_{CRAC} (138) ainsi qu'un courant capacitif qu'on ne retrouve que dans les cellules endothéliales(221). La structure moléculaire des canaux membranaires impliqués dans l'entrée capacitative de calcium est inconnue. Récemment, des travaux ont démontré que des protéines analogues aux protéines TRP drosophiliennes pourraient être des candidates potentielles(240). D'ailleurs, ces protéines TRP mammaliennes seraient très semblables aux canaux calciques sensibles au voltage(280).

Les courants capacitifs calciques ont plusieurs implications tels le remplissage des stocks intracellulaires déplétés, la sécrétion, la transcription ou l'apoptose dans les cellules non-excitables. Cependant, aucun rôle physiologique pour ces courants calciques capacitifs dans les cellules excitables n'a été clairement démontré.

1.1.5.1.2.3 Les canaux cationiques activés directement par le récepteur(ROCs)

L'existence des ROCs a été originalement proposée suite à l'observation d'influx calciques insensibles aux bloqueurs des canaux calciques dans certains myocytes vasculaires(294,360,403). Ainsi, plusieurs évidences suggèrent que certains vasoconstricteurs activeraient des canaux calciques insensibles aux dihydropyridines. La noradrénaline en se liant à un récepteur α -adrenergique activerait un courant cationique entrant insensible à la nifédipine et sélectif au Ba^{2+} dans des cellules provenant de la veine porte de lapin(9,160,363). La vasopressine(193,355), l'endothéline-1(54,356), l'angiotensine II(201) et la sérotonine(201) semblent, elles-aussi, activer des canaux cationiques non-sélectifs dans des modèles de cellules entières. On connaît encore mal les mécanismes d'activation de ces ROCs. Il semble que ni le calcium intracellulaire ni l' IP_3 ne serait impliqués. Par contre, les protéine kinases C pourraient être des intermédiaires entre le récepteur et l'activation des canaux calciques(184). Ceci suggère donc une implication des protéines G dans ces mécanismes. D'ailleurs, l'application de GDP β S à l'intérieur d'une cellule A7r5 inhibe un courant calcique de type ROCs induit par la vasopressine(355).

1.1.5.1.2.4 Les récepteurs-canaux

Dans les tissus non-vasculaires, plusieurs récepteur-canaux ont été décrits tels le récepteur nicotinique, certains récepteurs aux acides aminés excitateurs ainsi que le récepteur 5-HT₃ à la sérotonine. Dans les cellules musculaires lisses

vasculaires, l'ATP agit sur son récepteur-canal de type P_{2X1} permettant ainsi l'entrée de cations. Cependant, il a été bien démontré qu'en conditions physiologiques le courant majeur traversant ce canal était sodique (19,20). Jusqu'à maintenant, le récepteur P_{2X1} est l'exemple de récepteur-canal le mieux caractérisé des cellules musculaires lisses vasculaires.

1.1.5.2 Les canaux potassiques

En se basant sur les données provenant d'études pharmacologiques faites sur des artères intactes et de travaux d'électrophysiologie faits sur des cellules isolés, on distingue jusqu'à maintenant cinq types de canaux potassiques sur la membrane des cellules musculaires lisses vasculaires(42). Ces canaux jouent un rôle dans la régulation du tonus vasculaire qui variera d'un tissu musculaire à l'autre.

1.1.5.2.1 Les canaux potassiques sensibles au voltage (Kv)

Les canaux Kv, aussi connus sous les appellations de *delayed rectifier* ou de *transient outward*, ont été identifiés dans les cellules musculaires lisses vasculaires isolées de plusieurs artères différentes telles les artères coronaires(358), cérébrales(38), rénales(107) et pulmonaires(269). Ils sont impliqués principalement dans l'établissement du potentiel de membrane au repos(254). De plus, leur activation induite par la dépolarisation de la membrane cellulaire suggèrent que ces canaux pourraient limiter la réponse aux stimuli vasoconstricteurs(254).

Les canaux Kv sont sélectivement bloqués par la 4-aminopyridine, avec un

Ki d'environ 0.2-1mM selon le tissu étudié(107,269).

1.1.5.2.2 Les canaux potassiques à large conductance activés par le calcium (Maxi-K)

Les canaux Maxi-K sont les canaux potassiques activés par le calcium les mieux caractérisés dans le tissu vasculaire(42). Ils sont présents dans la très grande majorité des cellules musculaires lisses vasculaires(254). Le courant unitaire des Maxi-K est de 250pS et la probabilité d'ouverture de ces canaux augmente exponentiellement avec la dépolarisation de la membrane et l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$. Les Maxi-K opposent un bio-contrôle négatif en réponse à la dépolarisation, l'entrée de calcium et la contraction du muscle lisse vasculaire(43).

Les Maxi-K sont principalement sensibles au tétraéthylamonium, à la charybdotoxine et à l'iberiotoxine.

1.1.5.2.3 Les canaux potassiques activés par le calcium à faible conductance sensibles à l'apamine

Des évidences récentes émanant d'études faites sur des artères intactes suggèrent la présence de ces canaux dans les cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que leur implication dans les vasodilatations dépendantes de l'endothélium(42). Aucune mesure directe de ces canaux sensibles à l'apamine n'a été faite dans les cellules musculaires lisses vasculaires mais on sait qu'il s'agit de canaux sensibles au calcium, à faible conductance et sensibles à l'apamine tel que caractérisé dans le muscle squelettique. De plus, il a été démontré que des cellules

musculaires lisses porcines exprimaient de l'ARNm codant pour ces canaux suggérant leur présence dans le tissu vasculaire(322).

1.1.5.2.4 Les canaux potassiques dépendants de l'ATP (K_{ATP})

Les canaux K_{ATP} ont d'abord été identifiés dans les myocytes cardiaques(263) avant d'être décrits dans plusieurs types cellulaires y compris les cellules musculaires lisses vasculaires(4). Les premières mesures électrophysiologiques directes ont été faites sur des cellules musculaires lisses vasculaires isolées d'artères mésentériques et démontraient un courant unitaire sortant d'environ 30pS(324).

Le canal K_{ATP} est un octamère comprenant quatre sous-unités K_{IR} (155,298) formant le pore ionique et qui sont jumelées à quatre sous-unités SUR(58,157)(Figure 1.8). Deux gènes encodant deux sous-types de sous-unités K_{IR} (6.1 et 6.2) ont

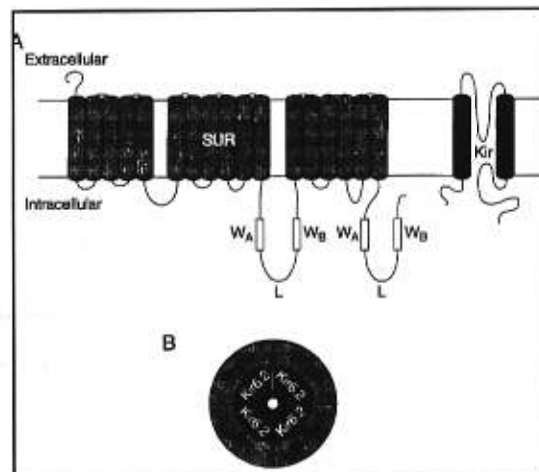


Figure 1.8 Structure du canal potassique dépendant de l'ATP. Adapté de Ashcroft and Gribble, 1998.

été identifiés(4,155,298). De même, deux sous-types de sous-unités SUR(1 et 2) sont exprimés par deux gènes différents(4,56,156,165). L'agencement des différents sous-types de sous-unités confèrent aux différents canaux K_{ATP} des propriétés pharmacologique et physiologique spécifiques. Le canal K_{ATP} du muscle

lisse vasculaire serait composé de sous-unités K_{IR} 6.2 et SUR2B(4,56,156,165).

Le canal K_{ATP} est principalement inhibé par des concentrations physiologiques d'ATP. D'autres facteurs tels le ratio ADP/ATP(207) ou le pH intracellulaire modifient la sensibilité du canal à l'ATP. De plus, il semble que le Mg^{2+} , l'AMPc et les protéines G soient nécessaires à l'activité du canal. Les K_{ATP} sont très peu sensibles aux variations de potentiel membranaire(13). Les K_{ATP} sont des médiateurs importants de la réponse vasculaire à plusieurs vasodilatateurs ainsi qu'à des changements métaboliques importants qui auront ultimement un effet sur le débit sanguin dans différents tissus. Jusqu'à maintenant, on sait que le CGRP(252), le peptide vasoactif intestinal(324), l'adénosine(67), les prostaglandines I_2 , E_2 et D_2 (40), ainsi que le monoxyde d'azote(245) activent les K_{ATP} et hyperpolarisent les cellules musculaires lisses vasculaires. Ces effets sont inhibés en partie par le glibenclamide. Certaines évidences suggèrent que les canaux K_{ATP} seraient actifs dans des cellules au repos tel que démontré dans les cellules musculaires lisses coronaires(154). En effet l'infusion de glibenclamide dans le réseau coronaire de rat ou de lapin cause une importante vasoconstriction réversible par l'arrêt du traitement(300). L'activité des K_{ATP} en conditions basales suggère qu'un blocage de ces canaux favoriserait l'accumulation de charges positives à l'intérieur de la cellule et ainsi une dépolarisation membranaire menant potentiellement à une vasoconstriction. De fait, il a été démontré dans des études électrophysiologiques faites sur des myocytes isolés d'artères coronaires de porc

que la vasopressine(359), l'endothéline-1(239) et l'angiotensine II(237) inhibaient l'activité des K_{ATP} . Cependant, le rôle de ce blocage des K_{ATP} dans la contraction produite par ces peptides n'a pas été démontré.

Une caractéristique bien connue des K_{ATP} est leur sensibilité aux

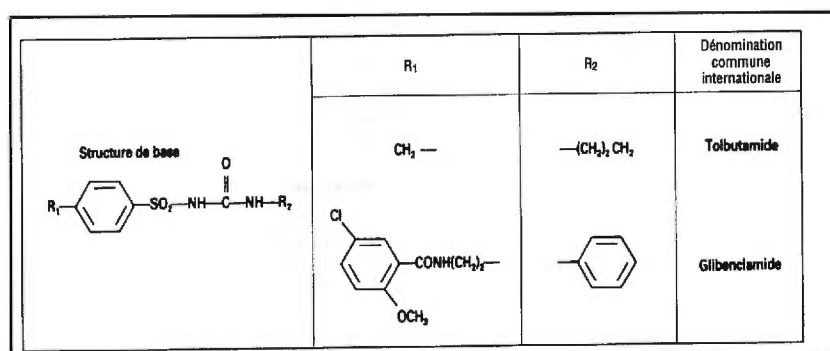


Figure 1.9 Structure chimique des sulphonylurés. Adapté de Landry et Gies (1994)

sulphonylurés (Figure 1.9). Cet effet semble hautement spécifique pour ces canaux. De plus, il existe toute une gamme d'activateur des K_{ATP} incluant la lemakalime, le pinacidil, le nicorandil et plusieurs autres(12).

1.1.5.2.5 Les canaux potassiques à rectification entrante (K_{IR})

On sait maintenant que les gènes codants pour les canaux potassiques à rectification entrante forment une nouvelle famille de gènes, la famille des K_{IR} (79,196). Ces gènes codent des protéines de 370 à 500 acides aminés. Ces protéines ont deux passages transmembranaires (m1 et m2) séparé par une région très conservée qui formera le pore ionique et attribuera la sélectivité du canal au

potassium. Quatre sous-unités K_{IR} formeront le pore ionique(388). Six sous-familles de K_{IR} (2.0 à 6.0) ont été identifiées jusqu'à maintenant. Dans le muscle lisse vasculaire, les sous-unités K_{IR} d'intérêt seront les 2.0. Tel que vu précédemment, les K_{IR} 6.0 contribuent à la structure du canal K_{ATP} .

Les K_{IR} retrouvés dans les cellules musculaires lisses vasculaires sont des canaux potassiques dont la forte rectification entrante semblent être produite par les polyamines intracellulaires. Ces courants K_{IR} contribuent au maintien du potentiel de membrane au repos. À preuve, l'inhibition de ces canaux cause une dépolarisation substantielle de la membrane cellulaire(83).

L'addition extracellulaire de Ba^{2+} bloque de façon très efficace les courants K_{IR} (119). De plus, des concentrations physiologiques de Ca^{2+} et de K^+ bloquent des courants potassiques à rectification entrante dans les cellules musculaires lisses coronaires de rat(289).

1.1.5.3 Les canaux chlore

Les expériences d'électrophysiologie classiques n'ont jamais réussi à définir aussi clairement les courants chlore comparativement aux courants cationiques. Cependant, des évidences pharmacologiques ont longtemps suggéré que les courants chlore passaient par des canaux spécifiques qui pouvaient être inhibés autant par des substances organiques qu'inorganiques. Ces propriétés des canaux chlore ont été confirmées récemment par l'étude des courants unitaires effectuées sur des cellules isolées.

La distribution des ions chlore dans le muscle lisse est très différente des autres types cellulaires. Le potentiel d'équilibre du chlore se retrouve autour de -20 à -30 mV soit beaucoup plus positif que le potentiel de membrane au repos(5,50). Conséquemment, l'ouverture de canaux chlore membranaires favorise une sortie d'ions chlore, amenant la membrane vers le potentiel d'équilibre du chlore, conduisant ainsi à une dépolarisation de la membrane cellulaire(5,50).

En se basant sur les propriétés fonctionnelles comme la dépendance aux variations de potentiel membranaire et aux agonistes, la conductance, la sélectivité, la cinétique d'activation et d'inactivation ainsi que la sensibilité aux différents bloqueurs, les canaux chlore ont pu être divisés en deux grands groupes, soit sensibles au voltage ou activés par le calcium(96,111). Les canaux chlore sensibles au voltage peuvent être subdivisés en trois sous-classes à savoir sensibles à la dépolarisation, sensibles à l'hyperpolarisation et les canaux chlore *bell-shaped voltage-dependent*. Seuls les canaux chlore sensibles à la dépolarisation et sensibles au calcium ont été identifiés dans le tissu musculaire lisse vasculaire(201).

Plusieurs agents pharmacologiques peuvent être utilisés pour l'étude des canaux chlore. Quoique leurs effets soient généralement limités aux courants chlore, peu de ces agents montrent une sélectivité pour un seul sous-type de canal. On peut classer ces inhibiteurs en organique et inorganique. On connaît plusieurs composés organiques tels le AC9, des dérivés stilbènes (DIDS et SITS), l'IAA-94

et l'acide niflumique. Les composés inorganiques sont des anions (Br^- , NO_3^- , I^-) ou des cations (H^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+})(201,206).

1.1.5.3.1 Les canaux chlore sensibles à la dépolarisation

Ces courants chlore d'une conductance variant entre 45 à 61pS ont surtout été caractérisés dans les cellules musculaires squelettiques en culture(35). Ces canaux sont actifs au potentiel de repos de la membrane. Ceci leur confère une implication dans la forte perméabilité au chlore mesurée dans les muscles squelettiques(35). Dans les muscles lisses vasculaires, on connaît peu leur rôle.

1.1.5.3.2 Les canaux chlore activés par le calcium ($I_{\text{cl}(\text{Ca})}$)

Les $I_{\text{cl}(\text{Ca})}$ ont été identifiés dans les cellules musculaires lisses isolées de plusieurs tissus vasculaires et non vasculaires(10,393,402). Ces $I_{\text{cl}(\text{Ca})}$ sont souvent activés par des substances contractiles. Dans le muscle lisse vasculaire, la noradrénaline et l'endothéline stimulent ces courants chlore (10,149,277). Ces caractéristiques des courants $I_{\text{cl}(\text{Ca})}$ suggèrent l'implication de ces courants dans la vasoconstriction.

On connaît encore peu les détails structuraux des canaux chlore sensible au calcium dans les muscles lisses vasculaires quoiqu'un canal chlore sensibles au calcium ait été purifié et cloné à partir de cellules épithéliales bronchiques de boeuf(65).

1.1.5.3.3 Les canaux chlore à haute conductance

Ces canaux tiennent leur nom de leur conductance très élevée qui est de

plus de 200pS. Ces canaux ont été les premiers à être décrits au niveau unitaire. Cependant, on connaît encore peu leurs caractéristiques. Quelques évidences suggèrent leur implication dans la contraction musculaire lisse vasculaire(206).

1.1.5.4 Les canaux sodiques

Dans plusieurs cellules musculaires lisses, les canaux sodiques dépendants du voltage semblent être impliqués dans la phase ascendante du potentiel d'action (179). Il apparaît maintenant évident que les canaux sodiques sensibles au voltage soient distribués dans la plupart des tissus musculaires lisses y compris dans les grandes artères de conductance telle l'aorte de rat(33,201).

La description de la structure des canaux sodiques provient principalement d'études faites sur les cellules nerveuses(15), musculaires squelettiques(348) et cardiaques(338). De façon générale, le canal sodique est composé de quatre répétitions de six segments (S1 à S6). Notons que chacun des segments S4 possède une région sensible au voltage. Le pore ionique serait quant à lui formé par les feuillets β entre les segments S5 et S6(201).

On connaît encore mal la contribution exacte des canaux sodiques dans la contraction du muscle lisse vasculaire. Par contre, deux types de courants sodiques sont distribués dans le muscle lisse vasculaire(201). Un premier courant lent, peu sensible à la tétrodothoxine et un deuxième rapide et sensible à la tétrodothoxine(201). D'après Muraki *et al.*(243) ce second courant rapide serait impliqué dans l'induction du potentiel d'action puisqu'il s'active à très faible

dépolarisation et s'inactive très rapidement.

1.1.6 Les kinases et les phosphatases

La contraction musculaire lisse vasculaire implique toute une gamme de processus de phosphorylation-déphosphorylation de protéines. Les kinases et les phosphatases possèdent un certain nombre de caractéristiques communes. En effet, la réaction de phosphorylation se fait sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine car le transfert du phosphate γ de l'ATP ne peut se faire que sur un hydroxyle alcoolique ou phénolique. Elles possèdent en outre un certain nombre de domaines communs catalytiques, soit les sites de liaisons de l'ATP, de reconnaissance, de liaison et de phosphorylation du substrat. Le reste de la structure est quant à lui très variable. Notons que la régulation des kinases est très importante puisqu'une kinase active a invariablement un effet. Derniers détails, un même substrat peut être phosphorylé sur plusieurs sites, par une ou plusieurs kinases et une kinase peut phosphoryler plusieurs substrats(91).

1.1.6.1 Les sérine/thréonine kinases

1.1.6.1.1 Les protéine kinases C

L'implication des protéine kinases C dans la contraction vasculaire est particulièrement complexe. Les premières évidences d'une implication des protéine kinases C dans la contraction musculaire lisse émanent de l'effet contractile des esters de phorbol(53,173,174). Par contre, les protéine kinases C font aussi partie intégrante des mécanismes de rétro-contrôle négatif favorisant

l'arrêt du processus contractile. Citons par exemple, la désensibilisation du récepteur AT_{1A} par les protéine kinases C(303). La complexité des effets de ces kinases découle en partie de la diversité des isoenzymes constituant la famille des protéine kinases C(211).

La famille des protéine kinases C est actuellement constituée d'au moins 10 isoenzymes regroupées en deux groupes soit dépendantes et indépendantes du calcium(145,260,262). Les protéine kinases C dépendantes du calcium comprennent quatre isoenzymes soit α , βI , βII et γ (188,211). Les protéine kinases C indépendantes du calcium se divisent en deux sous-groupes comprenant d'une part les isoenzymes δ , ϵ , η et θ (272,274,275) et d'autre part les isoenzymes ζ et ι (7,273,314). L'utilisation d'anticorps spécifiques a permis d'identifier les sous-types α , β , δ , ϵ , et ζ dans le muscle lisse(181,215).

La comparaison de la séquence d'acides aminés des protéine kinases C dépendantes du calcium indique qu'elles peuvent être divisées en cinq régions variables (V1-V5) et quatre régions constantes ou conservées (C1-C4)(Figure

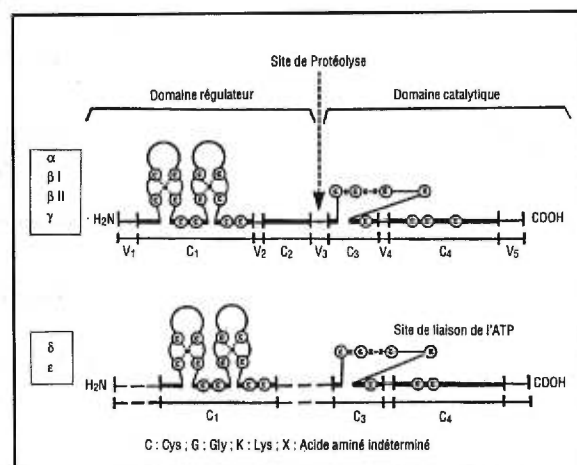


Figure 1.10 Structure des principales protéine kinases de type C. Adapté de Landry et Gies (1994)

1.10). La région V3 contient un site spécifique de clivage par les protéases. Le domaine de régulation contient les sites de liaison pour le calcium, les phospholipides et le DAG (ou les esters de phorbol)(183). Les sites de liaison du DAG situés sur le domaine C1 sont des structures en doigt de zinc(143,242). On retrouve sur le domaine catalytique le site de liaison de l'ATP et le site actif. Le site catalytique isolé(PKM)(159) est constitutivement actif. De fait, on retrouve sur la région C1 une région très similaire aux régions flanquants les sérines et thréonines phosphorylables des substrats des protéine kinases C. Il s'agit en fait d'un pseudosubstrat recouvrant le site catalytique de l'enzyme. La liaison de deux molécules de DAG (ou d'ester de phorbol) induit un changement de conformation de l'enzyme libérant le site catalytique du pseudosubstrat et permettant la phosphorylation des substrats(139). La structure des isoenzymes indépendantes du calcium est relativement semblable à celles dépendantes du calcium si ce n'est que

la région C2 est absente.

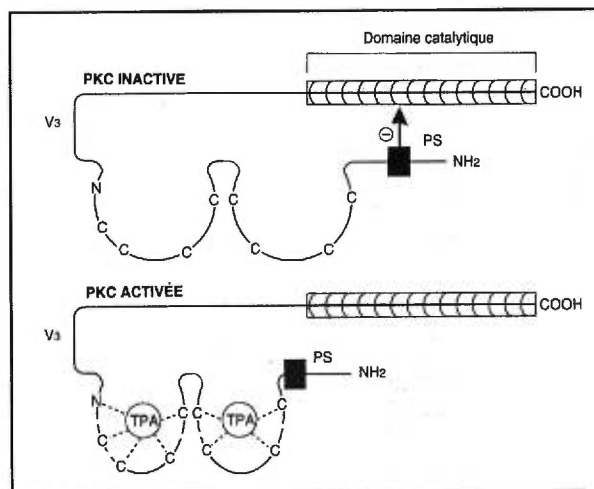


Figure 1.11 Mécanisme de régulation de l'activité des protéine kinases C. Adapté de Landry et Gies (1994).

Les plus récentes données sur l'implication des protéine kinases C dans la contraction musculaire lisse vasculaire suggèrent deux rôles distincts des ces kinases (362).

La production de DAG

favoriserait la translocation de l'enzyme cytosolique à la membrane plasmique libérant ainsi son site catalytique. L'enzyme liée à la membrane phosphorylerait plusieurs substrats impliqués dans la régulation de l'influx calcique(362). Par exemple, l'activité des canaux calciques de type L sera grandement potentialisée suite à leur phosphorylation par les protéine kinases C(102). Ce premier rôle des protéine kinases C favorise les mécanismes contractiles de la fibre musculaire. La protéine kinase C présente dans la membrane sera éventuellement protéolysée libérant ainsi la PKM dans le cytosol. Cette dernière ira phosphoryler plusieurs constituants de l'appareil contractile. Des évidences *in vitro* suggèrent que le rôle des protéine kinases C à ce niveau irait à l'encontre du processus contractile, favorisant un retour aux conditions de repos de la fibre musculaire(362).

Plusieurs modulateurs de l'activité des protéine kinases C ont été utilisés dans l'étude des mécanismes de signalisation cellulaire. Les activateurs les mieux caractérisés sont sans contredit les esters de phorbol(137). Plusieurs inhibiteurs peuvent être utilisés dans l'étude des protéine kinases C. Citons le H7 ainsi que la staurosporine(137). Par contre, ces inhibiteurs se lient au site de liaison de l'ATP qui est une séquence très conservée parmi les kinases diminuant ainsi grandement leur sélectivité(293).

1.1.6.1.2 La kinase des chaînes légères de myosine(KCLM)

Une des pièces maîtresses du casse-tête assurant la régulation de la contraction du muscle lisse est sans contredit la KCLM. En effet, cette kinase

hautement spécifique pour les chaînes légères (LC_{20}) de la myosine II (son seul substrat) est régulée de façon très fine lors du cycle contraction-relaxation du muscle lisse (Figure 1.12).

De nombreux efforts ont été déployés afin de déterminer la structure de la KCLM. L'enzyme contient un domaine catalytique, un site de liaison du complexe Ca^{2+} -CaM, un site d'auto-inhibition, un site de liaison de l'actine, un site de liaison pour la myosine ainsi que pour l'ATP et finalement des sites de phosphorylation par différentes protéine kinases(361).

La KCLM contient une région homologue à la séquence entourant la sérine

19 de la LC_{20} . Il a

donc été suggéré que cette région puisse agir comme pseudosubstrat(278).

Ainsi, au repos, l'enzyme se replie de telle façon que le pseudosubstrat se lie au site de liaison du substrat. Il semble que

la liaison du complexe

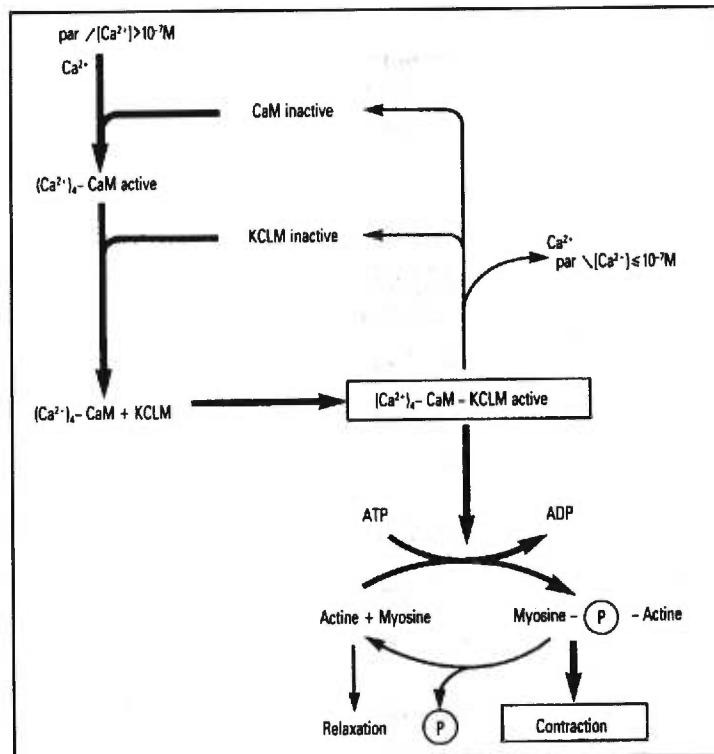


Figure 1.12 Illustration du rôle de la KCLM dans le processus de contraction du muscle lisse. Adapté de Landry et Gies (1994)

Ca^{2+} -CaM favorise la libération du site de liaison du substrat permettant ainsi l'activité de l'enzyme(278). L'affinité de la KCLM pour le complexe Ca^{2+} -CaM sera grandement diminuée suite à la phosphorylation de la kinase. Deux sites de phosphorylation ont été décrits. Le site physiologiquement significatif est une sérine dans le site de liaison du complexe Ca^{2+} -CaM(222). La phosphorylation de ce site diminue la sensibilité de la phosphorylation de la LC_{20} au calcium. *In vitro*, ce site est phosphorylable par la protéine kinase A, par la Ca^{2+} -CaM Kinase II et par la protéine kinase C(123,152,259). Le second site est situé du côté C-terminal du site de liaison du complexe. Ce site peut être phosphorylé par la PKG(137). La KCLM est impliquée directement au niveau de l'appareil contractile. En effet, suite à sa stimulation par le complexe Ca^{2+} -CaM, la KCLM phosphoryle la sérine en position 19 de la LC_{20} libérant ainsi les têtes de myosine et provoquant l'interaction actine-myosine de la contraction musculaire(137).

1.1.6.2 Les tyrosine kinases

Le premier gène encodant une protéine capable de phosphoryler des résidus tyrosines sur plusieurs substrats a été identifié dans le virus tumorigénique du sarcome de Rouss ($\text{pp60}^{\text{v-src}}$) au début des années 80(60,147). Cette découverte a stimulé l'intérêt pour les tyrosine kinases comme élément important dans les voies de signalisation cellulaire.

Plusieurs enzymes à activité tyrosine kinase ont été identifiées et ainsi plusieurs voies de signalisation intracellulaire ont pu être décrites. Ces enzymes

peuvent être des récepteurs à activité tyrosine kinase, des tyrosine kinases associées à la membrane plasmique ou cytosoliques. Quelques voies tyrosine kinase ont été

particulièrement bien étudiées et on connaît

plusieurs composantes de ces voies. Une des voies tyrosine kinase majeures étant

impliquées dans plusieurs types de réponses cellulaires est la voie des MAP kinases

(Figure 1.13). Cette voie débute par le déplacement du GDP par le GTP sur la

protéine Ras, rendant cette dernière active. Cette

activation de Ras est catalysée par le complexe GRB2-Shc-Sos. Ras activée phosphoryle la protéine MEK sur deux sérines distinctes via une protéine Raf. La protéine MEK (sérine/thréonine et tyrosine kinase) phosphoryle principalement deux sérine/thréonine kinases soit ERK-1 et ERK-2 desquelles découlent plusieurs réponses cellulaires(279). La voie des FAKs a aussi été bien décrite. La

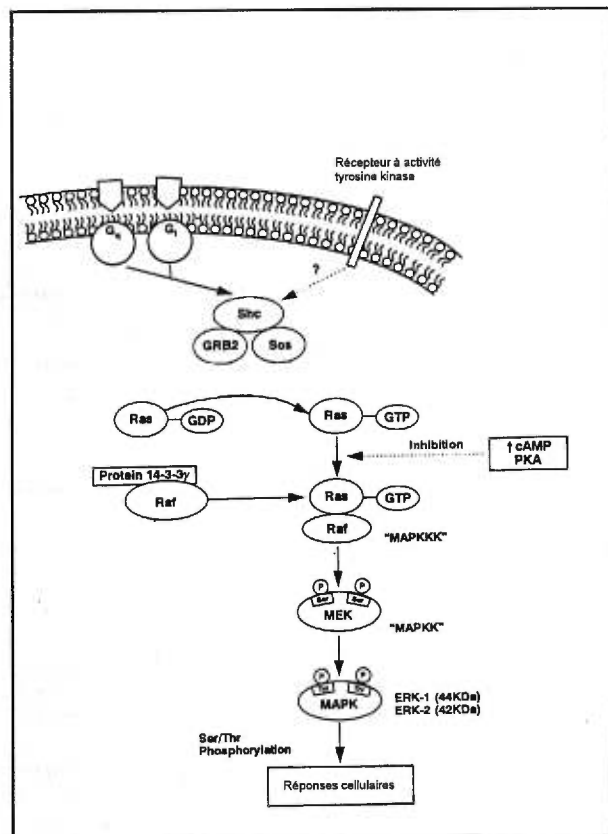


Figure 1.13 Illustration de la voie des MAP kinases. Adapté de Douglas and Ohlstein (1997)

phosphorylation et ainsi l'activation des FAKs via des tyrosine kinases de la famille des c-Src favorise la phosphorylation de protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette. La paxilline représente la cible type des FAKs et est impliquée dans les changements morphologiques cellulaires(394). Finalement, la famille des c-Src kinases comprend environ 14 protéines encodées par 9 gènes différents. Dans le muscle lisse vasculaire, seulement deux sous-types de c-Src sont présentes soit Fyn et c-Src(37). Ces tyrosine kinases associées à la membrane ont plusieurs rôles connus tels l'activation des phospholipases C γ (224), l'activation de la voie des FAKs(311) et l'activation de canaux ioniques(141). Finalement, citons la voie JAK/STAT qui mène principalement à l'expression des gènes de réponse précoce tels que c-fos et c-jun(44).

On croit que des tyrosine kinases autres que les récepteurs à activité tyrosine kinase pourraient jouer un rôle dans la contraction vasculaire. Plusieurs études faites sur des cellules en culture suggèrent que l'angiotensine II(94), la vasopressine, la bombésine et l'endothéline-1 stimulent la phosphorylation de résidus tyrosines(94,395). De plus, certaines données suggèrent une étroite relation entre la modulation des mouvements de calcium et d'autres ions dans les cellules musculaires lisses vasculaires et la phosphorylation de résidus tyrosines(374).

Plusieurs substances pharmacologiques peuvent être utilisées dans l'étude des voies enzymatiques tyrosine kinase. De façon générale, les inhibiteurs utilisés sont des substances de faible poids moléculaire telles que la génistéine, les

tyrphostines ou l'erbstatin(186,213). Ces substances sont généralement assez sélectives pour les tyrosine kinases et démontrent peu d'effets sur les sérine/thréonine kinases(76). Par contre, elles ne sont pas totalement sans effets non-spécifiques. Quelques évidences suggèrent des effets antagonistes de la génistéine sur certains récepteurs en particulier sur les récepteurs à la sérotonine (370). De plus, la génistéine semble inhiber en partie l'activité des phosphodiésterases de l'AMPc quoique cet effet semble avoir peu d'influence sur la contraction(8,23). L'effet des tyrphostines est particulièrement lent à apparaître et ces substances sont très instables(31,140). Les sous-produits de la dégradation des tyrphostines sont des substances actives pouvant potentiellement interférer avec les mécanismes de la contraction(285). Malgré tout, les inhibiteurs des tyrosine kinases restent des substances tout à fait valables qui ont permis et permettront encore de mieux comprendre l'implication des voies tyrosine kinases dans plusieurs mécanismes cellulaires.

1.1.6.3 Les sérine/thréonine phosphatases

Le caractère réversible des réactions de phosphorylation de protéines est maintenant reconnu comme étant un mécanisme important du contrôle des réponses cellulaires, y compris la contraction musculaire lisse.

Les sérine/thréonine phosphatases peuvent être divisées en deux groupes selon qu'elles déphosphorylent la sous-unité β (Type I) ou α (Type II) de la phosphorylase kinase(59). Les phosphatases de type I peuvent être subdivisées en

I-1 ou I-2 selon leur sensibilité respective à deux petites protéines, les inhibiteurs 1 et 2(59). La famille des phosphatases de type II sera quant à elle subdivisée en trois enzymes distinctes, soit PP-2A, PP-2B et PP-2C(59).

On dénombre plusieurs protéine phosphatases dans le muscle lisse vasculaire impliquées dans un nombre quasi incalculable de déphosphorylation de nombreuses protéines. Cependant, la description détaillée de ces mécanismes dépasse largement le cadre de cette thèse.

1.1.7 Régulation de l'interaction actine-myosine dans la contraction du muscle lisse vasculaire

On retrouve un dernier niveau de régulation de la contraction musculaire lisse directement au niveau de l'interaction entre la myosine phosphorylée et les filaments d'actine. Plusieurs observations ont permis d'identifier des protéines régulatrices associées aux filaments d'actine. Premièrement, les autres types de muscles possèdent tous des protéines associées à leurs filaments d'actine. Notons par exemple le complexe troponine du muscle squelettique des vertébrés. Deuxièmement, on retrouve dans la littérature des évidences suggérant une dissociation entre le degré de phosphorylation de la myosine et la tension générée dans le muscle lisse. Ainsi, on pense que d'autres mécanismes régulateurs seraient impliqués dont les protéines associées aux filaments fins seraient des candidates potentielles. Finalement, les microfilaments isolés de muscle lisse contiennent, en plus de l'actine et de la tropomyosine, des protéines de respectivement 84 et 87

kDa soit la calponine et la caldesmone.

1.1.7.1 La caldesmone

La caldesmone est une protéine qui a été isolée à partir de plusieurs tissus autant musculaire que non musculaire et qui de plus a été très bien caractérisée au cours des années. La protéine purifiée interagit avec l'actine, la myosine(150) et la tropomyosine(115) selon un processus indépendant du calcium. En présence de calcium, la caldesmone interagit avec la calmoduline(137).

La caldesmone du muscle lisse vasculaire est une protéine très allongée mesurant environ 74 par 1,9nm(116). Des études protéolytiques et de mutagénèse ont démontré que la molécule pouvait être divisée en trois domaines. Tout d'abord un domaine N-terminal où l'on retrouve le site de liaison de la myosine, une région centrale et finalement la portion C-terminale contenant les sites de liaison de l'actine, de la calmoduline ainsi que de la tropomyosine(137).

L'effet principal de la caldesmone semble être l'inhibition de l'activité ATPasique de la myosine(256) et ce, par compétition avec la myosine pour son site de liaison sur l'actine(126,136). In vitro, il a été bien démontré que la caldesmone pouvait être phosphorylée par plusieurs kinases telles la Ca^{2+} -CaM kinase II(151), la protéine kinase C(336), la caséine kinase II(371) ainsi que par les MAP kinases(55). De façon générale, la phosphorylation de la caldesmone diminue son affinité pour l'actine et la myosine. Par exemple, la phosphorylation en sérine 73 et thréonine 83 par la caséine kinase II bloque complètement la liaison de la

myosine(257). La phosphorylation de plusieurs sites de la partie C-terminale de la caldesmone par la cdc2 kinase inhibe la liaison de l'actine(2). Finalement, l'inhibition de l'actomyosine par la caldesmone est fortement diminuée par la phosphorylation de sites C-terminaux de cette dernière par la protéine kinase C ou la Ca^{2+} -CaM kinase II(256,336). La contribution des mécanismes de phosphorylation de la caldesmone a pu être observé dans toute une variété de préparation intacte de muscle lisse(2,3). Cependant, dans la plupart des cas, les sites de phosphorylation n'ont pu être démontrés et donc, les enzymes impliquées n'ont pu être identifiées.

1.1.7.2 La calponine

La calponine est une protéine exprimée presque exclusivement dans les tissus musculaires lisses(109). La calponine purifiée se lie principalement à l'actine, à la tropomyosine ainsi qu'au complexe Ca^{2+} -CaM(332). Cependant, seule l'interaction calponine-actine semble avoir une signification physiologique.

La calponine est une molécule allongée de 18nm. Sa structure primaire est constituée d'une chaîne polypeptidique unique(323). Des études protéolytiques ou de clivage chimique ont démontrée le site de liaison de l'actine dans une région comprise entre les résidus 145 et 182 de la protéine(230,379).

Dans le muscle au repos, les concentrations intracellulaires de calcium sont basses, la myosine est déphosphorylée, les têtes de myosine sont détachées de l'actine, le muscle est relâché. Dans cet état, la calponine associée avec les

filaments d'actine pourrait inhiber le faible cycle de formation de ponts induit par les états constitutifs de phosphorylation de la myosine(378). Suite à une stimulation du muscle, le $[Ca^{2+}]_i$ augmente et la KCLM est activée. La myosine phosphorylée a en elle-même une très faible activité ATPasique qui sera par contre fortement augmentée par la présence d'actine(137). Cependant, la calponine liée à l'actine exercera un effet inhibiteur important sur ce phénomène(378). L'inhibition exercée par la calponine sera levée par sa phosphorylation par la Ca^{2+} -CaM kinase II et la protéine kinase C(378). Ces effets seront renversés par l'action de la phosphatase 2A(137).

1.1.8 L'endothélium vasculaire

La lumière interne des artères est tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales. Plusieurs substances vasoactives sont synthétisées et libérées de cet endothélium. Ces substances vasoactives agiront sur la contractilité des cellules musculaires lisses vasculaires en se liant à des récepteurs membranaires ou à des enzymes cytosoliques. Plusieurs de ces substances sont vasodilatatrices telles que le monoxyde d'azote, la substance hyperpolarisante et la prostaglandine I_2 . Par contre, l'endothéline ou la thromboxane A_2 sont de puissants vasoconstricteurs. Toutes ces substances autant relaxante que contractile sont libérées suite à l'activation des cellules endothéliales par un agoniste ou par les forces de cisaillement créées par l'écoulement du sang dans l'artère. Cette influence majeure de l'endothélium sur la réponse contractile des vaisseaux explique la destruction

systematique de ce tissu dans les études visant les voies de signalisation de la cellule musculaire lisse, comme celles présentées dans cette thèse.

1.2 Les peptides vasoconstricteurs

1.2.1 La vasopressine

1.2.1.1 Synthèse et libération

La vasopressine est un nonapeptide exprimé principalement dans la région magnocellulaire du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus sous forme d'une préprohormone transformée dans l'appareil de Golgi en préhormone. La préhormone est stockée dans des vésicules de neurosécrétion qui migrent à travers de longs axones partants du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et aboutissant à la neurohypophyse. Durant cette migration vers la terminaison axonale, la préhormone est scindée d'une part en vasopressine, d'autre part en une protéine inactive appelée neurophysine et finalement en une glycoprotéine de 39 acides aminés (Figure 1.14). Les trois sous-produits sont libérés conjointement dans le réseau capillaire de l'hypophyse postérieure selon un processus d'exocytose classique dépendant du calcium(315). La synthèse magnocellulaire ainsi que la libération de la vasopressine est stimulée principalement par une élévation d'osmolarité sanguine ainsi que par une chute de pression/volume sanguin(110,315). Des osmorécepteurs du noyau supra optique de l'hypothalamus détectent des variations d'osmolarité sanguine entre 2 et 20%(315). Ces variations d'osmolarité modifient le volume cellulaire des osmorécepteurs provoquant des potentiels d'action membranaires qui favorisent ainsi la migration et l'exocytose. De plus la détection d'une chute de volume sanguin par les tensiorécepteurs de

l'oreillette gauche diminue les influx inhibiteurs allant de l'oreillette gauche à l'hypothalamus. Ces influx nerveux passent par le nerf vague vers la formation réticulaire du tronc cérébral et de là, vers les noyaux supra optiques de l'hypothalamus. Une chute de pression sanguine captée par les barorécepteurs carotidiens et aortiques entraîne une forte libération de vasopressine(315). Plusieurs neuropeptides modulent la libération de vasopressine(315). Ainsi l'acétylcholine, l'angiotensine II, la bradykinine, l'histamine et le neuropeptide Y stimulent cette libération. De plus, la noradrénaline, les prostaglandines, la dopamine, le GABA, la sérotonine et la substance P ont tous été démontrés comme de puissants modulateurs de la libération de vasopressine.

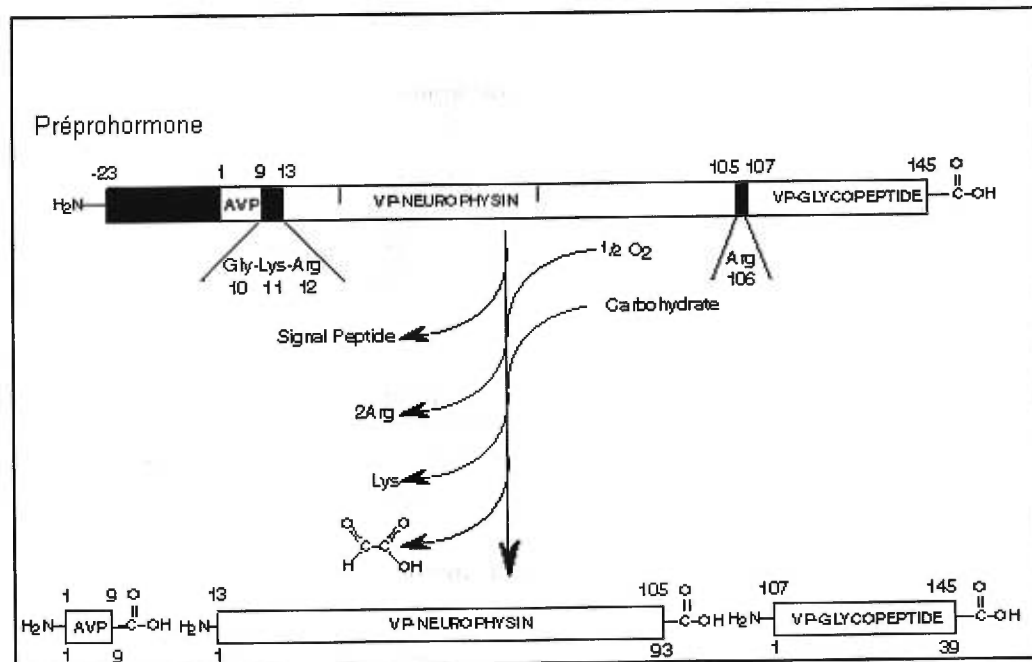


Figure 1.14 Illustration de la synthèse de vasopressine à partir de sa préprohormone. Adapté de Goodman & Gilman's (1995).

La vasopressine se lie à deux types de récepteur soit les récepteurs V_1 et V_2 (308). Les récepteurs V_1 , couplés aux protéines G_q (342), se subdivisent en deux sous-types soit V_{1a} (241) et V_{1b} (328). Le récepteur V_{1a} a été localisé au niveau du système nerveux central et en périphérie. En effet, le V_{1a} est présent sur les cellules musculaires lisses vasculaires, les plaquettes, les hépatocytes, les neurones et beaucoup d'autres types cellulaires(132). La contraction du muscle lisse vasculaire produite par la vasopressine serait exclusivement réservée au récepteur de type V_{1a} . On retrouve le sous-type V_{1b} au niveau de l'adénohypophyse où il est impliqué dans la régulation de la libération de l'hormone corticotrope. Finalement, le récepteur V_2 (70), couplé positivement à l'adénylate cyclase via une protéine G_s , se retrouve au niveau du tubule collecteur du néphron et médie les effets antidiurétiques de la vasopressine(315).

1.2.1.2 La vasopressine et la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires

Le couplage entre le récepteur V_{1a} à la vasopressine et une protéine G_q hétérotrimérique a été bien démontré(113,341,342). Une augmentation rapide de $[Ca^{2+}]_i$ suit la liaison de l'hormone à son récepteur(342). Le calcium impliqué dans cette élévation initiale de la $[Ca^{2+}]_i$ semble provenir des sources intracellulaires ainsi que d'un influx calcique du milieu extracellulaire(342). La corrélation temporelle entre la libération de Ca^{2+} des sources intracellulaires et l'augmentation d' IP_3 et de DAG suggère un rôle primordial de la voie phospholipase- IP_3 dans la

réponse produite par le récepteur V_{1a} (342). Cette augmentation rapide et transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$ est suivie d'une phase soutenue due, semble-t-il, exclusivement à un influx calcique du milieu extracellulaire(341,342). Des évidences suggèrent un rôle des voies de la phospholipase A_2 (47,342) et de la phospholipase D(342) dans la contraction produite par la vasopressine. Cependant, la plupart de ces observations ont été effectuées dans la lignée immortelle A7r5 et n'ont pas encore été corroborées dans des vaisseaux sanguins entiers. En outre, même si l'identification de la vasopressine remonte à plus de 100 ans(271), la compréhension des mécanismes de signalisation cellulaire menant à la contraction du muscle lisse produite par ce peptide n'est pas encore complète.

1.2.2 L'angiotensine II

1.2.2.1 Synthèse et libération

L'angiotensine II est un octapeptide formé via une voie biochimique impliquant deux enzymes soit la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine(310). Une chute de volume sanguin est rapidement détectée par des barorécepteurs auriculaires cardiaques et aortiques ainsi que par l'appareil juxtaglomérulaire au niveau du tubule distal rénal. Les barorécepteurs, via le système nerveux sympathique, et l'activation de l'appareil juxtaglomérulaire stimulent la libération de rénine de l'artériole afférente glomérulaire. La rénine scinde l'angiotensinogène en angiotensine I laquelle est convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Figure 1.15). L'enzyme de

conversion de l'angiotensine est présente dans le plasma et au niveau

tissulaire(255,320). Il a été bien

démonstré que les tissus

pulmonaires représentaient la

principale source d'enzyme de

conversion de l'angiotensine

tissulaire(255). On sait

maintenant que les cellules

endothéliales des vaisseaux

pulmonaires sont le site majeur

de régulation de l'entrée

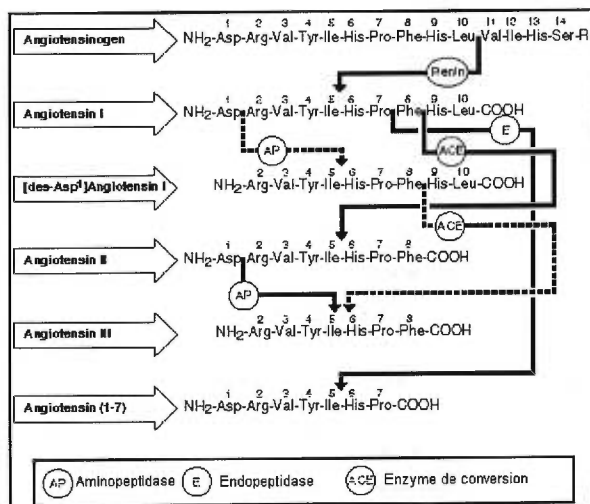


Figure 1.15 Illustration du métabolisme de l'angiotensine II. Adapté de Goodman & Gilman's (1995)

d'angiotensine II dans la circulation(296).

Les effets de l'angiotensine II sont médiés par deux sous-types de récepteur, AT₁ et AT₂, tel que démontré par l'utilisation d'antagonistes non-peptidiques sélectifs soit le losartan (AT₁) et le PD123319 (AT₂)(343). Le récepteur AT_{1A} a été cloné en 1991 par deux équipes indépendantes(246,302). La protéine synthétisée de l'expression du gène du récepteur AT_{1A} contient 359 acides aminés. Chez les rongeurs, un second sous-type de récepteur AT₁ a été identifié soit le sous-type AT_{1B}(167,178,301) qui ne se retrouve qu'au niveau de la neurohypophyse.

1.2.2.2 L'angiotensine II et la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires

L'angiotensine II, comme plusieurs autres vasoconstricteurs, favorise le métabolisme des IP_s via l'activation des phospholipases C et provoque la mobilisation de calcium dans le milieu intracellulaire. Bkaily *et al.*(34) ont démontré que l'angiotensine II active des courants calciques sensibles au voltage dans l'artère mésentérique de hamster. Il a été bien démontré que les courants entrants stimulés par l'angiotensine II décline rapidement par suite d'une désensibilisation du récepteur(52). Les effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II sont uniquement médiés via les récepteurs de type AT_{1A}.

1.2.3 L'endothéline

1.2.3.1 Synthèse et libération

L'endothéline est un peptide vasoconstricteur composé de 21 acides aminés contenant deux ponts bisulfures. L'endothéline a été identifiée initialement par Yanagisawa *et al.*(387) dans une culture de cellules endothéliales bovines. Maintenant, on connaît trois isopeptides caractérisés structurellement et pharmacologiquement soit les endothéline-1, -2 et -3 (158), exprimées par trois gènes différents. Suite au clonage d'une banque d'ADNc d'endothéline-1, les séquences d'acides aminés des préendothélines-1, -2 et -3 ont été décrites. Elles sont composées de 211, 145 et 138 acides aminés respectivement. Les préendothélines sont clivées par une endopeptidase en *big* endothélines

composées respectivement de 38, 38 et 41 acides aminés. Les *big* endothélines n'ont virtuellement aucun effet en comparaison des endothélines matures (1/140). Sous l'effet de l'enzyme de conversion de l'endothéline, les peptides matures physiologiquement actifs sont libérés(306,307). La synthèse et la libération des endothélines est sous le contrôle de plusieurs facteurs. Par exemple le TGF- β , l'IL-1, le TNF- α , le PAF, l'endotoxine, la bradykinine, l'angiotensine II, la vasopressine ainsi que les forces de cisaillement favorisent la libération de l'endothéline-1(120,387). Ces phénomènes de synthèse et de libération implique des voies de signalisation classique tel les phosphoinositides, la protéine kinase C ainsi qu'une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ à l'intérieur de la cellule endothéliale(85). Cet influx calcique se ferait principalement via des courants calciques capacitifs. Les peptides natriurétiques de type A et B en plus du monoxyde d'azote inhibent la libération et la synthèse de l'endothéline.

Des études pharmacologiques ont permis de classier les récepteurs à l'endothéline en deux sous-types. Le récepteur ET_A ($ET-1=ET-2>ET-3$) serait responsable de la vasoconstriction, de la bronchoconstriction, de la contraction du myomètre, il médierait les effets inotropes positifs de l'endothéline ainsi que la prolifération cellulaire. Arai *et al.*(11) ont cloné l'ADNc encodant le récepteur ET_A à partir de tissu pulmonaire bovin. Le récepteur ET_B quant à lui démontre une affinité comparable aux trois endothélines et médie la relaxation vasculaire endothélium-dépendante et les effets anti-plaquettaires de l'endothéline. Le

récepteur ET_B a été récemment cloné à partir de tissu pulmonaire de rat(299).

1.2.3.2 Effets de l'endothéline sur les cellules musculaires lisses vasculaires

L'endothéline favorise la contraction du muscle lisse vasculaire(387). Les endothélines stimulent le métabolisme des IP₃, activent des ROCs et stimulent l'activité de canaux calciques sensibles au voltage(114,316,387). La stimulation du récepteur ET_A par l'endothéline-1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires produit une augmentation biphasique du calcium intracellulaire tel que démontré en utilisant du quin-2 ou du fura-2. Une première libération transitoire semble être corrélée avec la production d'IP₃ et la libération du calcium intracellulaire(317). La seconde phase, beaucoup plus lente et soutenue correspondrait à un influx calcique provenant du milieu extracellulaire(335). Il a été démontré que la contraction produite par l'endothéline pouvait être fortement inhibée par la nicardipine et complètement éliminée par l'absence de calcium dans le milieu extracellulaire(41,73,216,387) et ce dans plusieurs tissus vasculaires incluant l'aorte de rat. Par contre d'autres études ont démontré que la contraction de l'aorte de rat produite par l'endothéline était insensible aux bloquants calciques(14). Dans les cellules de la souche A7r5, Van Renterghem *et al.*(356) ont démontré que les potentiels d'action induits par la présence d'endothéline étaient bloqués par la présence d'isradipine quoique la réponse mécanique à l'endothéline n'étaient que partiellement affectée. L'endothéline semble avoir des effets sur plusieurs autres courants ioniques dans le muscle lisse vasculaire. Il a été démontré

que l'endothéline inhibait les courants potassiques dépendants de l'ATP(239) et activait des courants potassiques sensibles au calcium(353).

In vivo, l'endothéline-1 à faible dose (<0,3nmol/kg) produit une chute transitoire de pression artérielle. À plus forte dose (1nmol/kg), l'endothéline-1 produit une réponse biphasique soit une chute de pression artérielle moyenne suivit d'une réponse vasopressive.

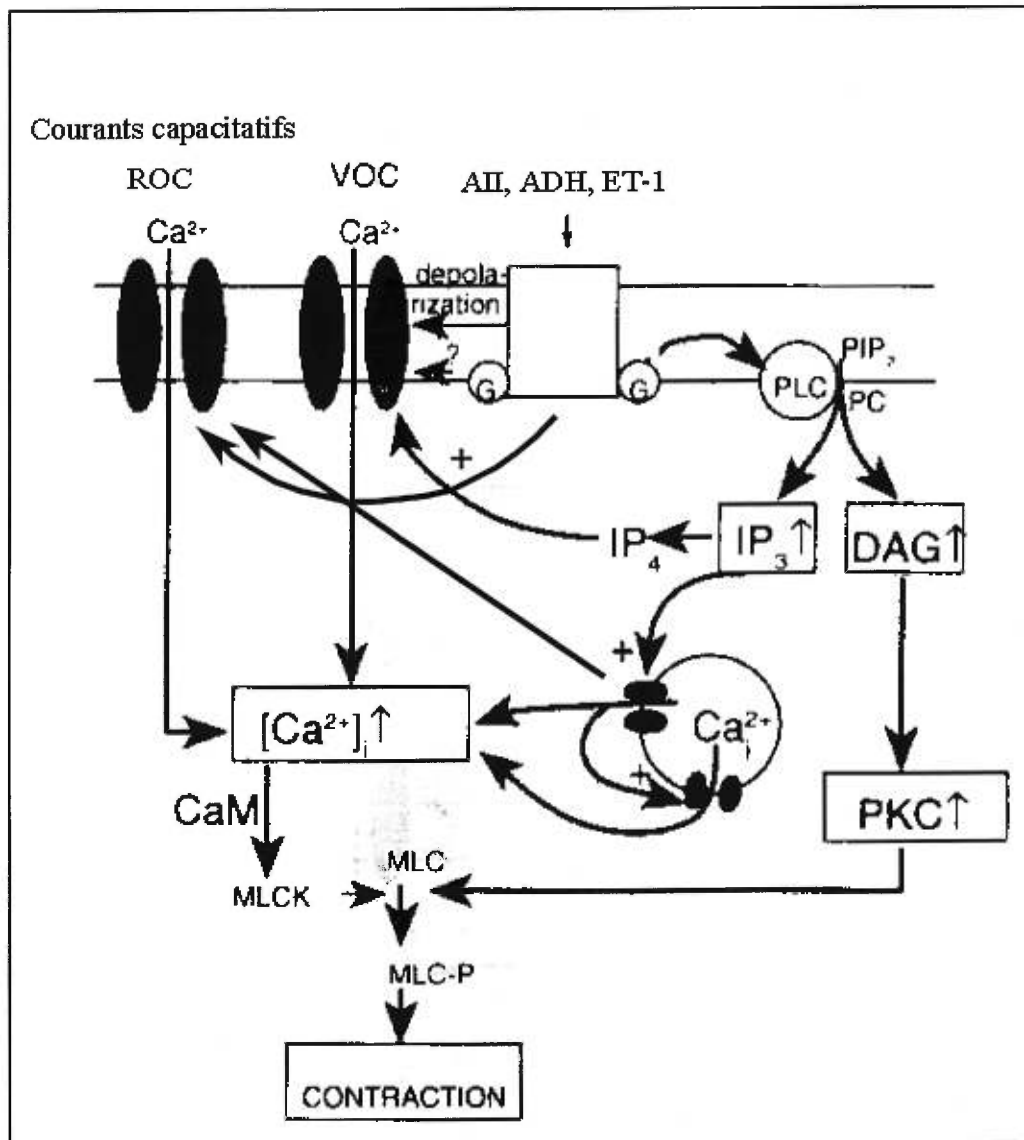


Figure 1.16: Schéma récapitulatif des voies de signalisation menant à la contraction du muscle lisse vasculaire. Adapté de Rubanyi and Polokoff (1994).

1.3 Hypothèses de travail

1.3.1 Implication des tyrosine kinases dans la vasoconstriction produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1

On sait depuis 1983 que le vanadate, un puissant inhibiteur des tyrosine phosphatases, provoque la contraction de vaisseaux de boeuf et de lapin(95). Suite à cette découverte, il a été démontré que certains facteurs de croissance, qui agissent sur des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, provoquent la contraction des aortes de rat(24,244). Depuis la fin des années 1980, on sait que des substances vasoactives telles la vasopressine, la bombésine, l'angiotensine II ou l'endothéline-1 favorisent la phosphorylation de résidus tyrosines dans différents types cellulaires tels les 3T3(395), les plaquettes humaines(117), les cellules mésangiales(94) ainsi que dans les cellules musculaires lisses en culture(351). Présentement, le travail fait sur l'étude de ces voies tyrosine kinases est phénoménal principalement dans les domaines de la prolifération et de la croissance cellulaire. L'explosion de ce domaine de recherche découle en grande partie des implications physiopathologiques de ces voies tyrosine kinases telles que le remodelage, autant vasculaire(124) que cardiaque(330). Certaines études ont démontré que la contraction du tissu musculaire lisse non-vasculaire à différents agents contractiles était inhibée par des inhibiteurs des tyrosine kinases(135). L'implication des tyrosine kinases lors de la vasoconstriction produite par

différents agents vasoactifs tels la sérotonine(370), la noradrénaline(77), la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (77) a été suggérée. Par contre, l'implication de tyrosine kinases dans les vasoconstrictions produites par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 n'a pas été démontrée. De plus, la localisation exacte de ces tyrosine kinases dans la séquence des mécanismes de signalisation cellulaire reste à être éclaircie. Des indices suggèrent que certains courants ioniques pourraient être diminués par des inhibiteurs des tyrosine kinases. En effet, dans des cellules aortiques de rat en culture, l'activation de courants potassiques produite par l'angiotensine II et la noradrénaline est inhibée par la génistéine(77). Des courants potassiques stimulés par l'acétylcholine via son récepteur muscarinique de type 1 ont aussi été inhibés par la génistéine(142).

1.3.2 Implication et modulation par les tyrosine kinases de différents canaux ioniques lors de la vasoconstriction produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1

1.3.2.1 Les canaux calciques

La vasopressine, l'angiotensine II ainsi que l'endothéline-1 produisent une contraction artérielle en stimulant leur récepteur V_{1a} (341), AT_{1a} (304) et ET_A (367) respectifs qui sont tous couplés à des protéines Gq(226,267,342). L'activation de ces récepteurs stimule l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et en DAG par le biais de la phospholipase C de type β vraisemblablement(45,226,287,304,341,342). Le DAG stimule l'activité de la protéine kinase C tandis que l' IP_3 favorise la libération du

calcium des sources intracellulaires produisant une élévation rapide et probablement transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$. Un important influx calcique suit, jouant un rôle dans la phase soutenue de la contraction(1,287,341,342). Quoique l'implication des courants calciques de type L ait été bien démontrée(201), on connaît peu les processus de modulation de ces canaux calciques membranaires lors de la contraction induite par des peptides vasoactifs. Certains indices suggèrent que des tyrosine kinases pourraient être impliquées dans cette modulation de l'activité des courants calciques(203,210,374).

1.3.2.2 Les canaux chlore

La dépolarisation membranaire de plusieurs cellules excitables implique l'activation de canaux chlore(86,149). La noradrénaline(10,16,276,277), l'angiotensine II(28,48,194,270), la vasopressine(194,354) et l'endothéline-1(149,334,354) stimulent des courants chlore dans plusieurs types cellulaires tels les cellules mésangiales et les cellules musculaires lisses vasculaires. L'activation de courants chlore dans la contraction produite par l'endothéline-1 a été bien démontrée dans l'aorte de rat(149) ainsi que dans la micro circulation rénale(334). Cependant, il n'a pas été démontré que la vasoconstriction produite par la vasopressine et l'angiotensine II impliquait des canaux chlore. De plus, on connaît peu la relation fonctionnelle entre les canaux chlore et certaines composantes des voies de signalisation cellulaire lors de la contraction produite par les peptides vasoactifs.

1.3.3.3 Les canaux potassiques dépendants de l'ATP

Les canaux potassiques jouent un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire(251,373). L'activation de canaux potassiques produit une hyperpolarisation qui diminue la probabilité d'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage, diminuant la concentration de calcium intracellulaire et ainsi favorisant la relaxation du muscle lisse(125). Des évidences pharmacologiques suggèrent que plusieurs vasodilatateurs endogènes produisent leur relaxation en activant des K_{ATP} . Le glibenclamide, un bloqueur des K_{ATP} inhibe la relaxation vasculaire induite par l'adénosine(18,57,248), la prostacycline(40,169,249) ainsi que par les prostaglandines E_2 et D_2 (40). De plus, il a été démontré que certains vasoconstricteurs endogènes pouvaient aussi moduler l'activité des K_{ATP} . En effet des études de *patch clamp* ont démontré que la vasopressine(223), l'endothéline(239) ainsi que l'angiotensine II(238) bloquaient des courants K_{ATP} dans des cellules isolées d'artères coronaires de porc. La contribution de l'inhibition de ces canaux K_{ATP} dans la réponse contractile à ces peptides n'a pas été démontrée dans des artères intactes.

1.4 Objectifs général et spécifiques

Le but général poursuivi par ce travail est d'étudier par une approche fonctionnelle certains mécanismes biochimiques de signalisation cellulaire menant à la vasoconstriction induite par la vasopressine, l'angiotensine II ainsi que l'endothéline-1.

Plus spécifiquement, les protocoles expérimentaux faisant l'objet de cette thèse visaient à:

1-Évaluer la contribution des tyrosine kinases lors de la contraction de l'aorte de rat produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1.

2-Évaluer le rôle des canaux calciques de type L comme cibles potentielles des tyrosine kinases lors de la contraction de l'aorte de rat produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1.

3-Évaluer la contribution des canaux chlore et potassiques dépendants de l'ATP ainsi que leur rôle potentiel comme cible des tyrosine kinases lors de la contraction de l'aorte de rat produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1.

CHAPITRE 2: PHARMACOLOGICAL STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN
TYROSINE KINASES AND CALCIUM CHANNELS IN RAT AORTA

2.1 Abstract

Relation between tyrosine kinases and L-type calcium channels activity during the contraction of rat aortas induced by vasoactive agents was investigated. Thoracic rat aortas were excised, cut in 4-mm rings, denuded from their endothelium and mounted in 20ml-organ chambers. Maximal contraction induced by application of vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 was reduced in the presence of 10 μ M genistein, a tyrosine kinase inhibitor, but phenylephrine and KCl-induced contractions were not. In the presence of nifedipine 10 μ M, an L-type calcium channel blocker, the angiotensin-II, vasopressin- and endothelin-1-induced maximal contraction were reduced. Moreover, the inhibitory effect of genistein on the vasopressin and endothelin-1 was severely diminished. The present results suggest that vasoconstriction of aortic smooth muscle mediated by vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 involves tyrosine kinases and influx of external Ca²⁺ through L-type calcium channels. Moreover a close relation between tyrosine kinases and L-type calcium channels occurs in vasopressin and endothelin-1-induced contraction.

2.2 Introduction

Vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 produce arterial contraction

by acting on their respective Gq-linked (341,342) V_{1a} (170), AT_1 (304) and ET_A (367) receptors. Ligand binding then activates the phospholipase C (226,304,341,342) which catalyses the breakdown of PIP_2 into diacylglycerol and IP_3 , respectively(26,45,341,342). Diacylglycerol stimulates protein kinase C, while IP_3 mediates the release of free calcium from intracellular pools, producing a rapid and transient increase in intracellular calcium concentration (1,287,341,342). In addition, calcium ion influx that follows has been also shown to play an important role in the sustained contraction induced by these vasoactive agents(176,342) and most of this influx is believed to occur through voltage-dependent calcium channels(34,133,356). However, the link between vasopressin, angiotensin II or endothelin-1 receptor activation and calcium influx is still unclear. Mechanisms like receptor-operating channels or direct coupling between Gq-protein and calcium channels(267) have been proposed.

In parallel with the signalling pathway described above, angiotensin II, vasopressin and other vasoconstrictor agents are known to stimulate tyrosine phosphorylation in different cell types, including vascular smooth muscle cells (94,351,395). Moreover, Hollenberg *et al.*(244), as well as Berk *et al.* (24), showed that growth factors like EGF can induce vascular contraction. It is now well recognized that several vasoconstrictor agents, including vasopressin and angiotensin II, require tyrosine kinase activity to produce contraction of smooth muscles(77,297,370,389,390). On the other hand, the exact contribution of tyrosine

kinases within the intracellular signalling cascade following activation of these above mentioned receptors has not been clearly demonstrated.

The aim of the present study was to investigate the involvement of tyrosine kinases in the vasopressin-, angiotensin II- and endothelin-1-induced constriction of rat aortas, and to evaluate the relation between tyrosine kinases and influx of Ca^{2+} through L-type calcium channels in these vasoconstrictor processes.

2.3 Material and methods

2.3.1 Vessel preparation

The investigation was performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care, and approved by our Institutional Animal Care Committee. The experiments were performed on thoracic aortas from male Sprague-Dawley rats weighing 250-350g. The animals were narcotised under a CO_2 -enriched atmosphere until a complete loss of consciousness and promptly decapitated. The thorax were opened and the aortas carefully excised. The vessels were cleaned of all fat and connective tissue and cut in 4-mm rings. Endothelium was removed mechanically by inserting one arm of a fine forceps into the lumen and rolling back and forth ten times on a gauze soaked with physiological solution. The preparations were then mounted into 20-ml organ baths filled with Krebs-Henseleit buffer of the following millimolar composition: NaCl 118, KCl 4, CaCl_2 2.5, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1, NaHCO_3 24, D-glucose 11. The solution was constantly gassed with 95% O_2 -5% CO_2 and warmed at 37°C. The preparations were

then connected to a strain gauge (GRASS FT03, ASTRO-MED Inc) and isometric tension was recorded on a data acquisition system (BIOPAC Systems, Santa Barbara, USA). Rings were stretched to an optimal 4g resting tension, as determined with repeated 20 mM KCl contractions. Removal of the endothelium was confirmed by the absence of relaxation with the addition of 1 μ M acetylcholine to KCl (20mM) precontracted rings. The preparations were allowed to stabilize for 30 min before the beginning of experimentation. Each ring was used for a single dose-response curve. The effect of drugs were compared in parallel with rings obtained from the same aorta.

2.3.2 Statistical analysis

Values represent the mean \pm SE. Dose-response curves were analysed by a curve-fitting analysis program (Allfit for Windows[®]) in order to compare slope factor, EC₅₀ and maximal response(71). Interaction between treatments was assessed by performing a factorial analysis of variance (Systat[®] for Windows[®]) on maximal responses: a significant F ratio for the interaction indicating the absence of additivity, and a non-significant F ratio suggesting additivity of both treatments. Probability values (P) smaller than 0.05 were considered significant.

2.3.3 Drugs

Stock solutions of [Arg⁸]-vasopressin (Sigma Aldrich Canada, Oakville, Ont., Canada) 0.234mM and endothelin-1 (RBI, Natick, Maine, USA) 0.2mM were prepared in acetic acid 0.2N containing BSA 0.1%. A stock solution of angiotensin

II (Sigma) 1mM was prepared in Krebs-Henseleit buffer and carefully kept at -20°C until use. All other drugs were prepared as 10mM stock solutions: phenylephrine (ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA), acetylcholine (Sigma) in distilled water, genistein (ICN) in dimethyl sulphoxide (DMSO) 100%, and nifedipine (Sigma) in ethanol 95%. Final concentration of DMSO and ethanol in the baths were 0.14% and 0.095%, respectively, and did not affect contraction. All subsequent dilutions were made in water or buffer.

2.4 Results

None of the treatments described below had any effect on the curve-fitted EC_{50} for all the vasoconstrictor agents used in the present study (data not shown).

In a first series of experiments, dose-response curves to phenylephrine (0.01nM-10 μM) and KCl (1-56mM) were performed in the presence or absence of the tyrosine kinase inhibitor, genistein, at 10 μM . In control conditions, phenylephrine induced a maximal contraction of rat aortas of $2.69 \pm 0.10\text{g}$. The contraction strength was not modified in the presence of genistein ($2.41 \pm 0.07\text{g}$, $P > 0.05$, Figure 2.1). Similarly, KCl-induced contractions were not affected by the tyrosine kinase inhibitor (2.26 ± 0.09 vs $2.15 \pm 0.12\text{g}$, $P > 0.05$, Figure 2.1).

In a second set of experiments, the effect of genistein on vasoactive peptides was tested. Maximal contraction to vasopressin ($2.92 \pm 0.12\text{g}$) was significantly (22%) reduced by tyrosine kinase inhibition with genistein ($2.29 \pm 0.13\text{g}$, $P < 0.001$, Figure 2.2). Maximal contraction to angiotensin-II

(2.09 ± 0.25 g) was also significantly (50%) reduced by genistein (1.06 ± 0.2 g, $P < 0.001$, Figure 2.3). Likewise, endothelin-1-induced contraction (2.96 ± 0.1 g) was impaired by genistein (2.26 ± 0.17 g, $P < 0.001$, Figure 2.4).

In the last series of experiments, we tested the possible action of tyrosine kinase on external Ca^{2+} influx required for contraction, and especially a possible tyrosine kinase-mediated action on L-type calcium channels. The effect of genistein on dose-response curves to vasopressin (0.01-100nM), angiotensin II (0.01-100nM) and endothelin-1 in either the presence or absence of the L-type calcium channel blocker nifedipine (10 μ M) was assessed. Nifedipine reduced the maximal contraction produced by vasopressin (1.19 ± 0.05 g, $P < 0.001$, Figure 2.2) as well as the inhibitory effect of genistein (0.99 ± 0.06 g, Figure 2.2): both treatments were not additive. Indeed, genistein reduced vasopressin-induced maximal contraction by around 22% in the absence of nifedipine (from 2.92 ± 0.12 g to 2.29 ± 0.13 g, Figure 2.2). However, in the presence of nifedipine, genistein only reduced maximal vasopressin-induced contraction by 16% (from 1.19 ± 0.05 g to 0.99 ± 0.06 g, Figure 2.2). L-type calcium channel blockade with nifedipine (10 μ M) also reduced endothelin-1-induced maximal contraction of rat aortas (1.57 ± 0.14 g, $P < 0.001$, Figure 2.4). Moreover, the inhibitory effect of genistein that was around 23% (2.96 ± 0.1 g to 2.26 ± 0.17 g, Figure 2.4) was impaired in the presence of nifedipine and only reduced maximal contraction by less than 10% (from 1.57 ± 0.14 g to 1.40 ± 0.18 g, Figure 2.4). This suggests that both treatments were not

additive. Angiotensin II-induced maximal contraction of rat aortas was severely impaired by nifedipine (0.57 ± 0.05 g, $P < 0.001$, Figure 2.3). However, genistein was still partly potent in the presence of nifedipine reducing the maximal contraction by 38% (from 0.57 ± 0.05 g to 0.35 ± 0.03 g, Figure 2.3) as compared with 50% in the absence of nifedipine.

2.5 Discussion

In the present study, we demonstrated that vasopressin-, angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat aortas was reduced following tyrosine kinase inhibition with genistein. It is generally accepted that genistein at $10 \mu\text{M}$ specifically inhibits tyrosine phosphorylation by tyrosine kinases (8,135,370,386). Moreover, the tyrosine kinase inhibition with genistein did not change KCl-induced vasoconstriction, ruling out non-specific effects of genistein on vascular contraction or on L-type calcium channels. Phenylephrine-induced contraction was not affected by tyrosine kinase inhibition under the present conditions, which contrasts with the study of Di Salvo *et al.*, (77) performed with dog carotid arteries and guinea-pig mesenteric microvessels. On the other hand, Jinsi *et al.*, (175) have shown that tyrosine kinases are involved in α_2 - but not α_1 -induced contraction of rabbit aortas. It is now accepted that inhibition of tyrosine phosphatase using vanadate induces vascular contraction (95). Later on, two studies demonstrated independently that growth factors were able to produce vascular contraction (24,244). Several studies since then showed that bombesin, vasopressin,

endothelin, angiotensin II, serotonin and norepinephrine can produce tyrosine phosphorylation within different cell types including Swiss 3T3(395), human platelets(117), mesangial(94), as well as vascular smooth muscle cells(351). In addition, Yang *et al.*(389) showed that genistein and tyrphostins were able to inhibit angiotensin II- and PGF_{2 α} -induced contraction of gastric smooth muscles. Soon after, the contribution of tyrosine kinases in the contractile response to angiotensin II(297), α -adrenergic and muscarinic agonists(77), and serotonin(370) was confirmed in vascular tissue.

Blockade of L-type calcium channels with nifedipine markedly reduced aorta contraction induced by vasopressin, angiotensin II, and endothelin-1, confirming the importance of calcium influx through these channels in the contraction process of blood vessels. The calcium required for agonist-induced vasoconstriction comes from two sources: from the extracellular milieu through opening of voltage-operated channels, or from intracellular sources composed of IP₃-sensitive(26) and insensitive pools(191). Calcium influx through L-type voltage-operated calcium channels is believed to be the most important mechanism in vasopressin, angiotensin II and endothelin-1-induced contractions, particularly during the sustained phase, as opposed to the initial transient phase.

In the present study, inhibition of calcium influx with nifedipine reduced genistein-induced inhibition of vasopressin and endothelin-1-induced vascular contraction. These results show that tyrosine kinase inhibitors have no effect on

contraction when L-type channels are blocked, strongly suggesting that tyrosine kinase activation by vasoconstrictor peptides may enhance influx of Ca^{2+} through L-type calcium channels. However, it seemed not to be the case with angiotensin II while genistein was still partly potent in the presence of nifedipine. There is evidence that tyrosine kinase inhibition diminishes L-type calcium channel activity. Wijetunge *et al.* (374) showed that tyrosine kinase inhibitors reduced L-type currents in smooth muscle cells from rabbit ear arteries. Moreover, genistein and tyrphostins inhibited bradykinin-induced internal calcium release in human fibroblasts(210). Finally, Hollenberg *et al.*(203) showed that vascular contraction induced by tyrosine phosphatase inhibitors was sensitive to L-type calcium channel blockade.

In conclusion, tyrosine kinases are involved in vasopressin- angiotensin II- and endothelin-1 but not phenylephrine- or KCl-induced sustained contraction of rat aortas. Moreover, L-type calcium channels seem to be modulated by tyrosine kinase activity linked to vasopressin and endothelin-1 receptors.

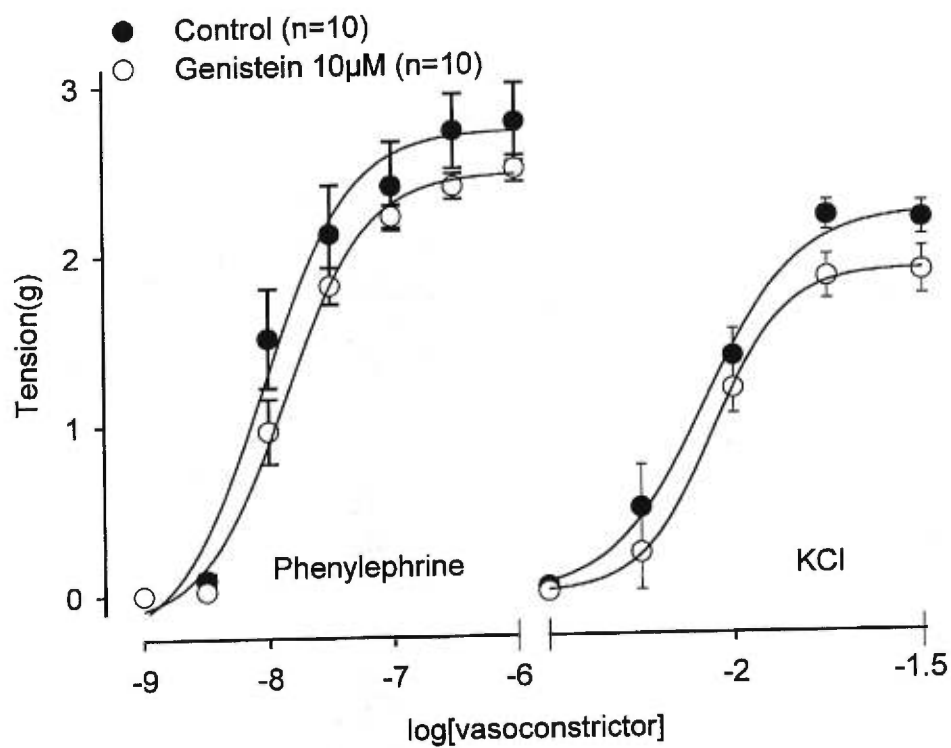


Figure 2.1: Maximal response evaluated by fitting dose-response curves to phenylephrine (0.01nM-10µM, left) and KCl (1-56mM, right) in the absence (closed circles) or presence of tyrosine kinase inhibitor genistein (open circles). Phenylephrine and KCl-induced contraction was not affected by the tyrosine kinase inhibitor

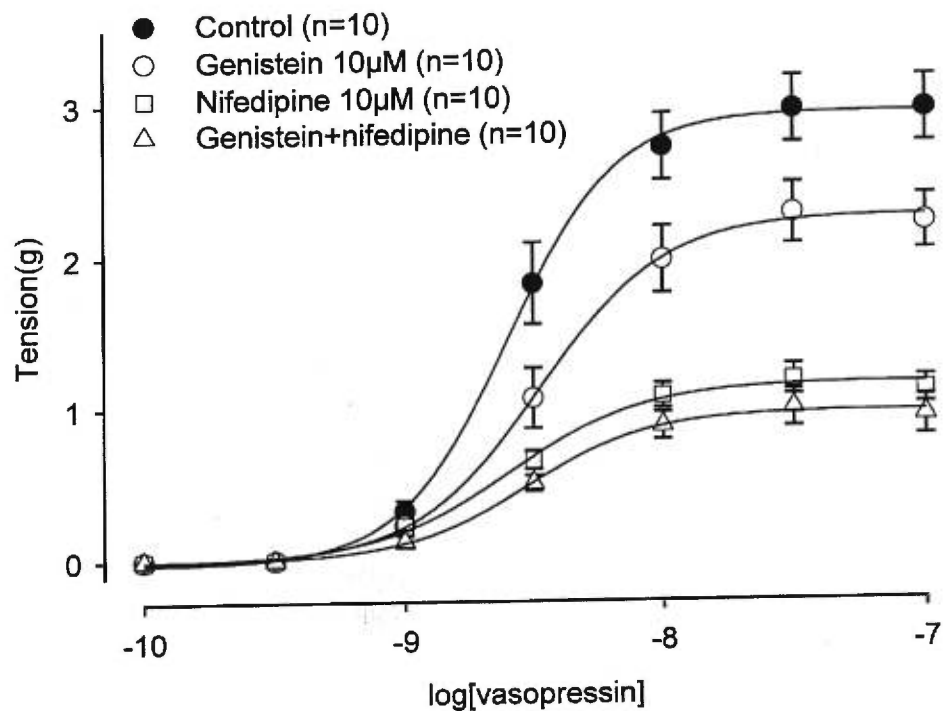


Figure 2.2: Dose-response curves to vasopressin under control conditions (close circles), in the presence of genistein (open circles), nifedipine (open squares) or both nifedipine and genistein given together (open triangles). Maximal response evaluated by curve-fitting was reduced by genistein ($P < 0.001$), nifedipine ($P < 0.001$) and the combined treatment ($P < 0.001$) in a non-additive fashion.

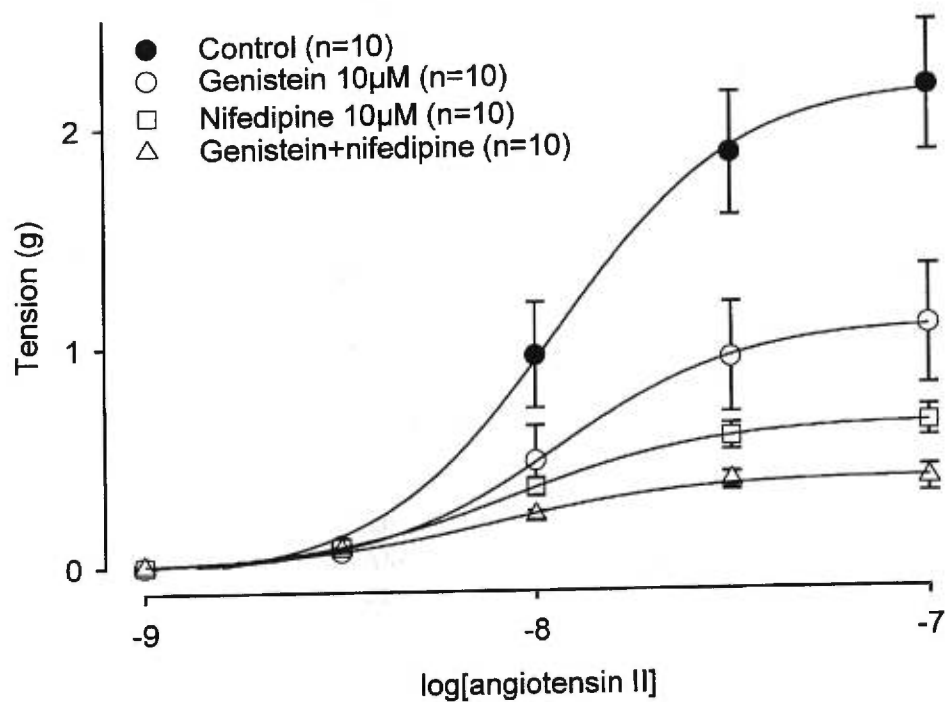


Figure 2.3: Dose-response curves to angiotensin II under control conditions (close circles), in the presence of genistein (open circles), nifedipine (open squares) or both nifedipine and genistein given together (open triangles). Maximal response evaluated by curve-fitting was reduced by genistein ($P < 0.001$), nifedipine ($P < 0.001$) and the combined treatment ($P < 0.001$) in an additive fashion.

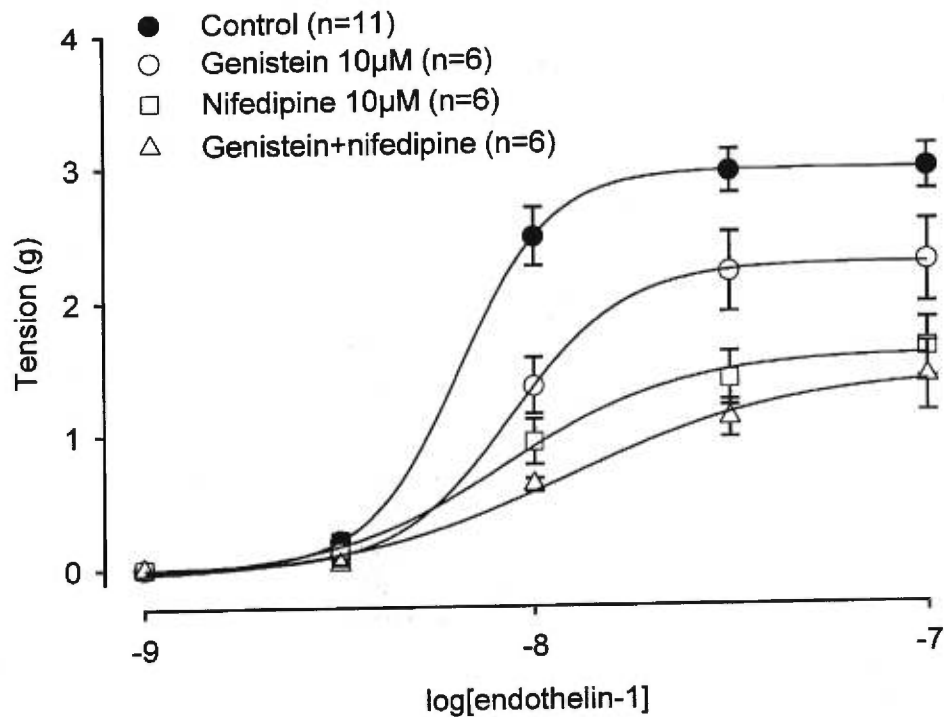


Figure 2.4: Dose-response curves to endothelin-1 under control conditions (close circles), in the presence of genistein (open circles), nifedipine (open squares) or both nifedipine and genistein given together (open triangles). Maximal response evaluated by curve-fitting was reduced by genistein ($P < 0.001$), nifedipine ($P < 0.001$) and the combined treatment ($P < 0.001$) in a non-additive fashion.

CHAPITRE 3: PHARMACOLOGICAL STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN
CHLORIDE CHANNELS AND TYROSINE KINASES IN THE CONTRACTILE RESPONSE
OF RAT AORTA

3.1 Abstract

The interaction between chloride channel blockade and tyrosine kinase inhibition in the vasoconstriction produced by vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 was studied. All experiments were performed using rat thoracic aortas cut in 4-mm rings, denuded from their endothelium and mounted into 20-ml organ baths. Treatment with the chloride channel blocker indanyloxiacetic acid (IAA-94, 30 μ M) did not affect the maximal response induced by KCl (1-56mM). IAA-94 as well as tyrosine kinase inhibition with genistein (10 μ M) reduced the maximal response to vasopressin and endothelin-1 in a poorly additive fashion. However, genistein was still partly potent in the presence of IAA-94 to inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction. These results suggest that chloride channels are involved in the vasopressin-, angiotensin II- and endothelin-1 but not in KCl-induced contraction of rat aorta. Moreover, tyrosine kinases were shown to interact with chloride channels in endothelin-1 and vasopressin-induced contractions suggesting a close relation between these two components of the signaling pathways.

3.2 Introduction

Vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 produce contraction of

vascular smooth muscles through stimulation of their respective V_{1a} (170), AT_1 (304) and ET_A receptors(367). Activation of these Gq-linked receptors is accompanied by a rapid, transient phase of vascular contraction following activation of phospholipase C(226,304,341) and breakdown of PIP_2 into diacylglycerol and IP_3 (26,226). Diacylglycerol stimulates protein kinase C while IP_3 mediates the release of calcium from intracellular pools (1,226,287,341). These transient events are followed by a long lasting sustained phase characterised mainly by extracellular calcium influx(176,342) through voltage-dependent calcium channels(34,133,356). In addition, it is widely accepted that all these peptides cause cell membrane depolarisation(161,397).

Activation of chloride channels on the surface of many excitable cells is involved in cellular depolarisation(86,149). Noradrenaline(10,16,276,277), angiotensin II(28,48,194,270), vasopressin(194,236,354) and endothelin-1(149,334) activate chloride channels in many cell types including mesangial(194,270), A7r5(354) as well as vascular smooth muscle cells(10,149,270,277). Moreover, it has been reported that endothelin-1-induced vasoconstriction involves chloride currents in the rat aorta(149) and in the renal microcirculation(334). However, this mechanism has not been clearly demonstrated in vasopressin- and angiotensin II-induced contraction of intact blood vessels. Moreover, relationship between chloride channels and other components of the vasoconstrictor signaling pathways has not been clearly

established

It is now generally accepted that many vasoactive agents including vasopressin and angiotensin II produce vascular contraction through, at least in part, tyrosine kinase stimulation (77,175,204). However, this mechanism has not been described in endothelin-1-induced vasoconstriction. Moreover, it has been shown that modulation of ionic channels, mostly L-type calcium channels, may occur following tyrosine kinase activation by vasoactive agents(210). The relationship between tyrosine kinases and chloride channel activity following stimulation of smooth muscles with vasoactive peptides has not been studied.

The aim of the present study was to investigate the involvement of chloride channels and their relation with tyrosine kinases in the vasopressin-, angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat aortas.

3.3 Material and methods

3.3.1 Vessels preparation

The investigation was performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care, and approved by our Institutional Animal Care Committee. The experiments were performed on thoracic aortas from male Sprague-Dawley rats weighing 250-300g. The animals were narcotised under a CO₂-enriched atmosphere until a complete loss of consciousness and promptly decapitated. The thoraces were opened and the aortas carefully excised. The vessels were cleaned of all fat and connective tissue and cut in 4-mm rings.

Endothelium was removed mechanically by inserting one arm of a fine forceps into the lumen and rolling back and forth ten times on a gauze soaked with physiological solution. The preparations were then mounted into 20-ml organ baths filled with Krebs-Henseleit buffer of the following millimolar composition: NaCl 118, KCl 4, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1, NaHCO₃ 24, D-glucose 11. The solution was continuously gassed with 95%O₂-5%CO₂ and warmed at 37°C. The preparations were then connected to a strain gauge (Grass FT03, Astro-Med Inc) and isometric tension was recorded on a data acquisition system (BIOPAC Systems, Santa Barbara, USA). Rings were stretched to an optimal 4g resting tension, as determined with repeated 20 mM KCl contractions. Removal of the endothelium was confirmed by the absence of relaxation with the addition of 1 µM acetylcholine to KCl (20mM) precontracted rings. The preparations were allowed to stabilize for 30 min before the beginning of experimentation. Each ring was used for a single dose-response curve. The effect of drugs were compared in parallel with rings obtained from the same aorta.

3.3.2 Experimental protocols

In a first series of experiments, cumulative dose-response curves to KCl (1-56mM) were performed in the presence or absence of the chloride channel blocker indanyloxyacetic acid (IAA-94, 30µM). Secondly, the effect of IAA-94 on cumulative dose-response curves to vasopressin (0.01-100nM), angiotensin II (0.01-100nM) and endothelin-1(0.01-100nM) was studied in the presence or

absence of the tyrosine kinase inhibitor genistein (10 μ M).

3.3.3 Statistical analysis

Values represent the mean \pm s.e.mean. Dose-response curves were analysed with a curve-fitting analysis program (Allfit for Windows[®]) which allows the comparison of slope factor, EC₅₀ and maximal response between several curves (71). Interaction between treatment with IAA-94 and genistein was assessed with a two way factorial analysis of variance (Systat[®] for Windows[®]) on maximal responses and EC₅₀ values. With this statistical design, a significant F ratio for the interaction indicates the non-additivity of both treatments. Likewise, a non-significant F ratio for the interaction suggests additive effects. Probability values (P) smaller than 0.05 were considered significant.

3.3.4 Drugs

Stock solutions of [Arg⁸]-vasopressin (Sigma Aldrich Canada, Oakville, Ont., Canada) 0.234mM and endothelin-1 0.2mM (RBI, Natick, Maine, USA) were prepared in acetic acid 0.2N containing BSA 0.1%. A stock solution of angiotensin II (Sigma) 1mM was prepared in Krebs-Henseleit buffer and carefully kept at -20^oC until use. All other drugs were prepared as 10mM stock solutions: acetylcholine (Sigma) in distilled water, genistein (RBI) in dimethyl sulphoxide (DMSO) 100% and IAA-94 (RBI) in ethanol 95%. All subsequent dilutions were made in water or buffer. Final concentration of DMSO and ethanol in the baths was 0.14 and 0.3%, respectively. To test the effect of these drug vehicles,

cumulative dose-response curves to vasopressin, angiotensin II, endothelin-1 and KCl in the presence of 0.14% DMSO and 0.3% ethanol were also performed.

3.4 Results

The effect of drug vehicles was first tested. DMSO did not affect the contractile response of rat aortic rings to any of the vasoconstrictors studied (data not shown). Ethanol slightly, but not significantly, reduced the sensitivity of aortic rings to KCl (data not shown). Therefore, with KCl-induced contraction, vehicle-treated rings were used as controls and compared with IAA-94-treated rings. Ethanol (0.3%) only reduced the contraction to endothelin-1 (data not shown). Corrections were made by subtraction of the ethanol effect to ethanol-free contractions.

The chloride channel blocker had no effect on KCl-induced contraction (Figure 3.1).

Vasopressin-induced maximal contraction (2.57 ± 0.12 g under control conditions, $n=9$, Figure 3.2) was reduced by genistein (1.96 ± 0.10 g, $P < 0.001$, $n=9$, Figure 3.2) and by IAA-94 (1.76 ± 0.06 g, $P < 0.001$, $n=9$, Figure 3.2). The effect of genistein on maximal response to vasopressin was reduced (1.54 ± 0.09 g, $P < 0.001$, $n=9$, Figure 3.2) in the presence of IAA-94 suggesting a poorly additive effect of both treatments. Indeed, genistein reduced maximal response to vasopressin by 24% in the absence and by 22% in the presence of IAA-94 (Figure 3.2). IAA-94-treated rings were found to be less sensitive to vasopressin as shown by an

increased EC_{50} ($\log[EC_{50}]$ of -8.93 ± 0.06 and -8.61 ± 0.04 in control and IAA-94-treated conditions respectively, $P=0.002$, Figure 3.2). In contrast, genistein did not affect the sensitivity of aortic rings to vasopressin ($\log[EC_{50}]=-8.77\pm 0.07$, $P=0.323$) and did not interfere with the effect of IAA-94 on vasopressin EC_{50} ($\log[EC_{50}]=-8.37\pm 0.07$ in rings treated with both IAA-94 and genistein, $P<0.001$, Figure 3.2).

Angiotensin II-induced maximal contraction ($2.25\pm 0.17g$ under control conditions, $n=10$, Figure 3.3) was markedly reduced by genistein ($1.10\pm 0.17g$, $P<0.001$, $n=10$, Figure 3.3) and IAA-94 ($0.76\pm 0.11g$, $P=0.002$, $n=10$, Figure 3.3). Genistein was still partly potent in the presence of IAA-94 ($0.43\pm 0.08g$, $P<0.001$, $n=10$) suggesting that both treatments were partly additive. In fact, genistein reduced angiotensin II-induced maximal contraction by 51 and 43% in the presence or the absence of IAA-94 respectively. Neither IAA-94 nor genistein affected the sensitivity of rings to angiotensin II (Figure 3.3).

Finally, endothelin-1-induced maximum contraction ($2.01\pm 0.06g$, $n=9$, Figure 3.4) was reduced by genistein ($1.13\pm 0.14g$, $P<0.001$, $n=9$, Figure 3.4) and IAA-94 ($1.82\pm 0.16g$, $P<0.002$, $n=10$, Figure 3.4). Genistein lost its potency ($1.51\pm 0.16g$, $P<0.001$, $n=10$, Figure 3.4), a reduction of 17% in the presence of IAA-94 as compared with 43% in the absence of IAA-94 suggesting that both treatments were not additive. Moreover, EC_{50} was increased by IAA-94 indicating that rings were less sensitive to endothelin-1 ($\log[EC_{50}]$ of -8.18 ± 0.04 and

-7.82±0.08, in control and IAA-94 treated conditions respectively, P=0.004, Figure 3.4). Similarly, rings treated with both treatments were found to be less sensitive to endothelin-1 (log[EC₅₀] of -7.76±0.09, P=0.001, Figure 3.4).

3.5 Discussion

In the present study, the chloride channel blocker IAA-94 reduced the maximal contraction to vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 without affecting that of KCl. The non-additive effect of chloride channel blockade and tyrosine kinase inhibition on vasopressin and endothelin-1-induced contraction suggests a close relation between tyrosine kinase activation and chloride efflux stimulated by these peptides in rat aorta.

Vasopressin-, angiotensin II-, and endothelin-1-induced contractions of vascular tissues share numerous similarities. Binding to their respective receptors rapidly stimulates phospholipase C(226,304,341) through a G-protein catalysing the breakdown of PIP₂ into IP₃ and diacylglycerol(26,356). Diacylglycerol activates protein kinase C while IP₃ mediates the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. Calcium entry follows these transient events, ensuring a sustained contraction(176,342,356,387). In many vascular tissues including rat aortas, vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 have been shown to induce membrane depolarisation which could be one of the events stimulating L-type calcium channel activity(161,351,387). The exact sequence of events leading to membrane depolarisation has not been clearly demonstrated yet. In some cases, release of

intracellular calcium may activate calcium-activated chloride channels(187,194,270,277). On the other hand, it is possible that chloride channels could be directly involved in cell depolarisation leading to activation of L- and/or T-type calcium channels (194,321,354).

Several types of chloride channels have been described. One of the most important chloride channel is the calcium-activated chloride channel (86,194,270,277). These channels have been identified in several cell types including mesangial cells(194,270), rat lacrymal gland cells(86), venous myocytes(277) and arterial myocytes(10). They have been shown to play an important role in the vascular contraction induced by noradrenaline (10,16,220,276,277) and endothelin-1(149,187,334). Other chloride channels, different from the latter type, have also been identified in rat aortic smooth muscle cells(321), mesangial cells(194) and A7r5 cells(354). Several organic and inorganic chloride channel blockers are available. However, none of these appears to exhibit a particular selectivity for one type of chloride channel (201). Therefore, identification of the chloride channel type based on the response to blockers is hazardous. The results of the present study suggest that IAA-94-sensitive chloride channels play an important role in the contractile response of rat aorta to vasopressin, angiotensin II and endothelin-1.

Several studies reported that bombesin, vasopressin, endothelin-1, angiotensin II, serotonin and noradrenaline can produce tyrosine phosphorylation

within different cell types including Swiss 3T3(395,396), human platelets (117), mesangial(94) as well as vascular smooth muscle cells (224,351). In addition, it was shown that tyrosine kinases were important in vasopressin-, angiotensin II-, serotonin- as well as α -adrenergic and muscarinic agent-induced vascular contraction(77,175,204). In the present study, genistein was used to investigate the contribution of tyrosine kinases in vasopressin- and angiotensin II-induced contraction of rat aortas because of its well established efficacy (77,112,204,234). In addition, it is generally accepted that genistein at 10 μ M specifically inhibits tyrosine phosphorylation by tyrosine kinases (8,135,386). Genistein reduced the maximal response to vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 without any modification in sensitivity to these vasoconstrictors.

In the present study, the experimental design, by comparing the effect of IAA-94 and genistein given separately and in combination, allows the evaluation of the interaction between chloride channels and tyrosine kinases. The effect of chloride channel blockade and tyrosine kinase inhibition in vasopressin and endothelin-1-induced contraction were poorly additive suggesting a close relation between chloride channel activity and tyrosine kinases. Although highly speculative, phosphorylation of chloride channels by tyrosine kinases, or any other kinases downstream, could provide an explanation to this close relation. This however remains to be established. Moreover, this interaction was not seen in the angiotensin II-induced contraction.

The present study showed that KCl-induced contraction of rat aortas was not affected by IAA-94, ruling out non-specific effects of the chloride blocker on vascular contraction or on L-type calcium channels. In addition, it has already been reported that tyrosine kinase inhibitors do not affect KCl-induced contraction of rat aortas (Dumont, E.C. and Lamontagne D., unpublished results).

3.6 Conclusion

Tyrosine kinases as well as IAA-94-sensitive chloride channels are involved in vasopressin-, angiotensin II-, and endothelin-1-induced contraction of rat aortas. Moreover, the non-additive effect of tyrosine kinase inhibition and chloride channel blockade suggests a close relation between chloride channels and tyrosine kinases activity in the vasopressin and endothelin-1-induced vascular contraction.

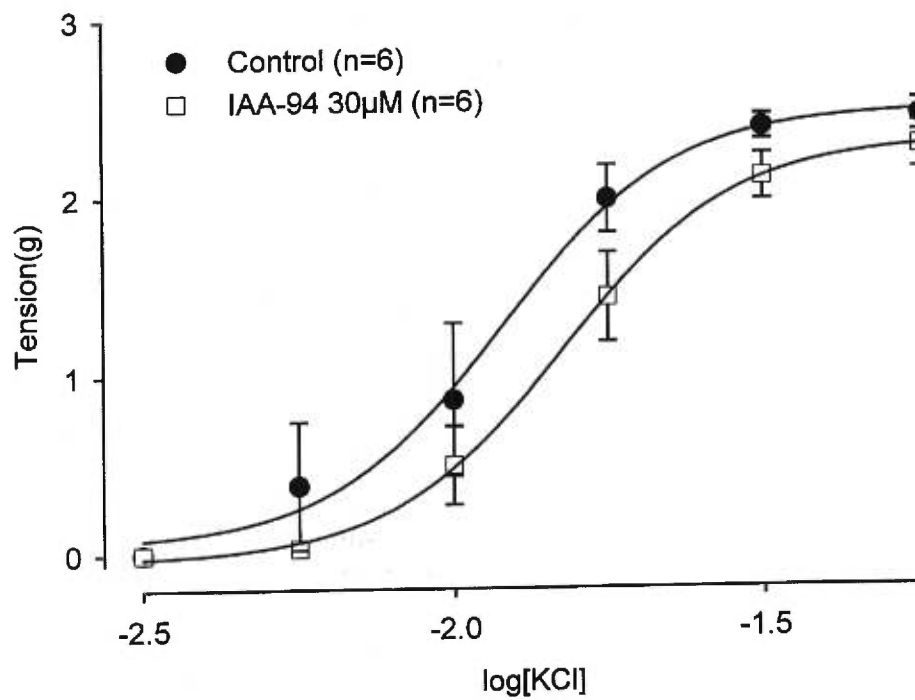


Figure 3.1: Dose-response curves to KCl under control conditions (closed circles) or in the presence of IAA-94 (open squares). These curves were found to be statistically comparable.

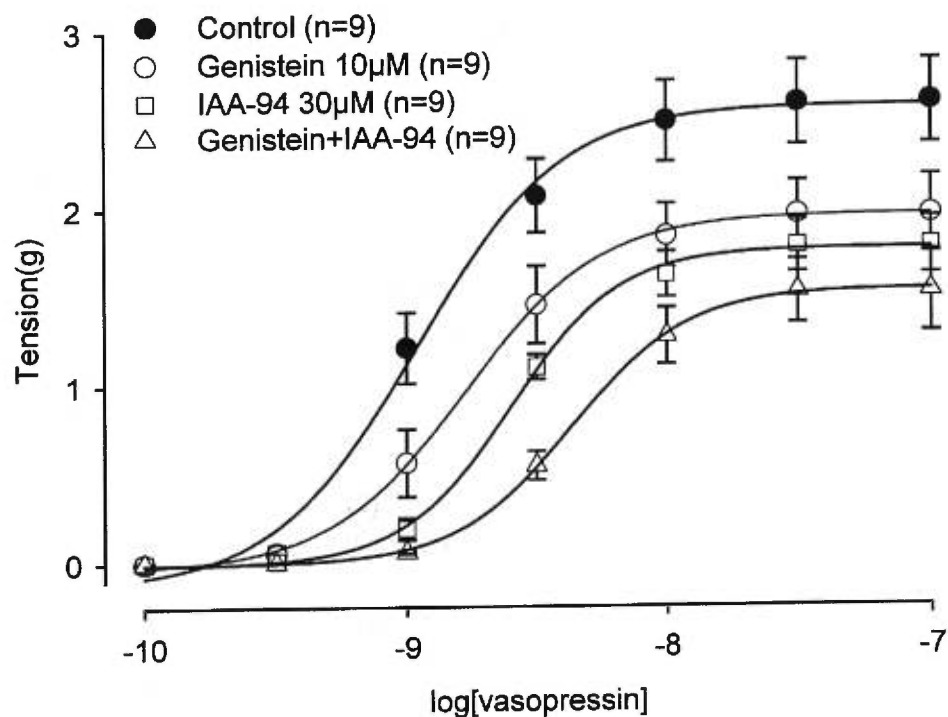


Figure 3.2: Dose-response curves to vasopressin under control conditions (close circles), in the presence of IAA-94 (open squares), genistein (open circles) or both IAA-94 and genistein given together (open triangles). Maximal response evaluated by curve-fitting was reduced by IAA-94 ($P < 0.001$), genistein ($P < 0.001$) and the combined treatment ($P < 0.001$) in a poorly additive fashion. The EC_{50} was reduced by IAA-94 in the presence ($P < 0.001$) or the absence of genistein ($P = 0.002$) in poorly additive fashion. Genistein did not affect the EC_{50} .

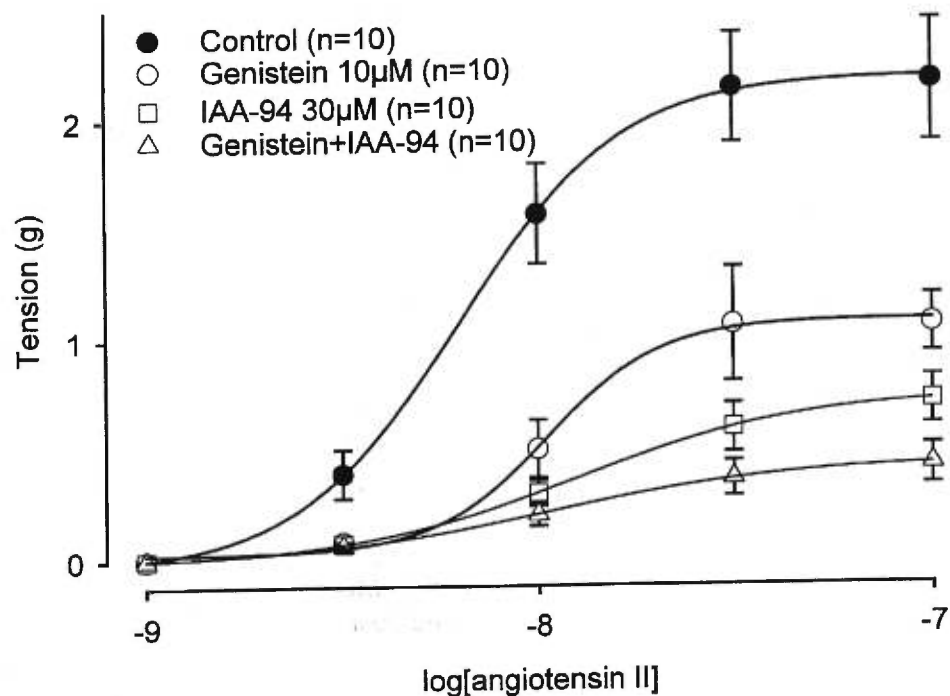


Figure 3.3: Dose-response curves to angiotensin II under control conditions (close circles), in the presence of genistein (open circles), IAA-94 (open squares) or both genistein and IAA-94 given together (open triangles). Maximal response evaluated by curve-fitting was reduced by IAA-94 ($P=0.002$), genistein ($P<0.001$) and combined treatment ($P<0.001$) in an additive fashion. The EC_{50} was not significantly affected by IAA-94 or genistein.

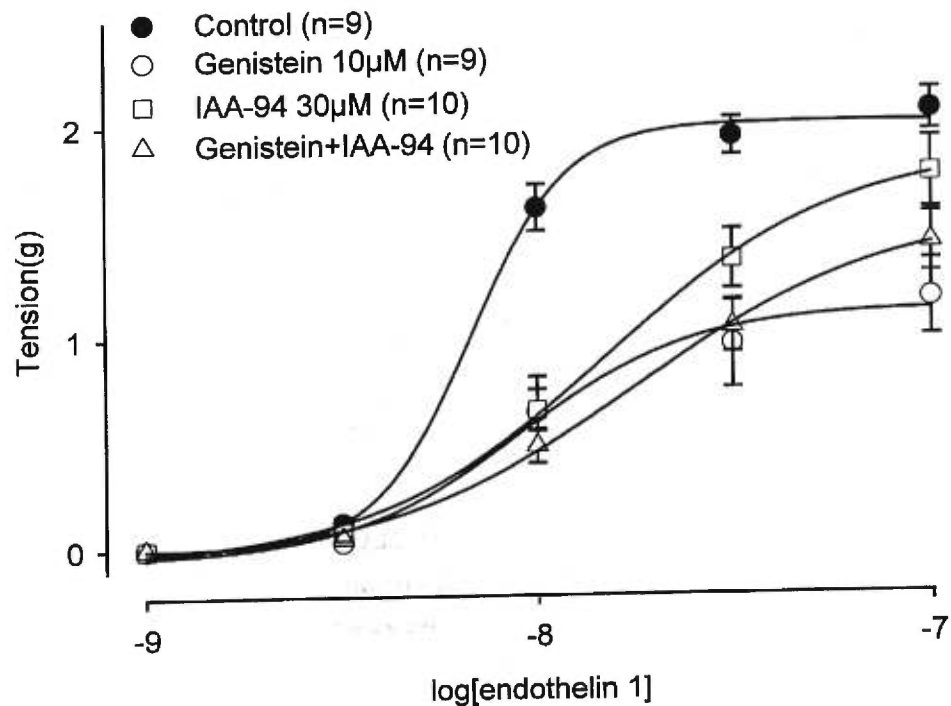


Figure 3.4: Dose-response curves to endothelin-1 under control conditions (closed circles), in the presence of genistein (open circles), IAA-94 (open squares) or both genistein and IAA-94 given together (open triangles). Maximal response evaluated by curve-fitting was reduced by IAA-94 ($P=0.002$), genistein ($P<0.001$) and the combined treatment ($P<0.001$) in a non-additive fashion. IAA-94 ($P=0.004$) and the combined treatment ($P=0.001$) attenuated sensitivity of rings to endothelin-1.

CHAPITRE 4: NO ROLE OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS IN THE
VASOCONSTRICTION PRODUCED BY VASOPRESSIN

4.1 Abstract

The contribution of ATP sensitive potassium channel (K_{ATP} channel) blockade in the vasoconstriction produced by vasopressin was studied. All experiments were performed using rat thoracic aorta cut in 4 mm rings, denuded from their endothelium and mounted into 20 ml organ baths. Glibenclamide (0.01-10 μ M), a K_{ATP} channel antagonist, did not induce any measurable contraction, nor did it reduce the maximum contraction induced by vasopressin and phenylephrine. The specific inhibition of lemakalim-induced (a K_{ATP} channel activator) relaxation by vasopressin was investigated. Lemakalim (0.01-0.3 μ M) relaxed both vasopressin (0.1 μ M) and phenylephrine (0.3 μ M) precontracted vessels. However, in contrast to what would be expected from K_{ATP} blockade by vasopressin, rings precontracted with vasopressin were more sensitive to the relaxant action of lemakalim, compared to phenylephrine precontracted vessels ($\log[EC_{50}]$ of -7.82 ± 0.01 and -7.10 ± 0.02 , respectively, $p < 0.05$). Dose-response curves to papaverine (3 μ M-30 μ M) in rings precontracted with vasopressin and phenylephrine were comparable. When aortic rings were pretreated with lemakalim (0.1 μ M), the maximum active tension induced by vasopressin was reduced (2.68 ± 0.23 in control conditions vs 0.62 ± 0.08 g on pretreated vessels, $p < 0.001$), whereas that

by phenylephrine was slightly increased. In order to explain the stronger relaxant action of lemakalim against vasopressin-induced constriction, the contribution of calcium influx through L-type calcium channels in the constriction of aortic rings to vasopressin and phenylephrine was compared. Nifedipine (0.1nM-30 μ M) was more potent (lower EC₅₀ and higher maximal response) in vasopressin (0.1 μ M) precontracted vessels, compared to phenylephrine (0.3 μ M). In conclusion, vasoconstriction produced by vasopressin does not involve blockade of K_{ATP} channels in the isolated rat aorta. The more potent relaxant action of lemakalim in vasopressin precontracted vessels, compared to phenylephrine, can be explained by a higher dependency of vasopressin-induced vasoconstriction on calcium influx through voltage-sensitive calcium channels and, consequently, membrane potential.

4.2 Introduction

Potassium channels, which determine cell membrane potential, play an important role in the control of vascular tone(251,264,373). Hyperpolarization following potassium channel activation reduces the probability for opening voltage-gated Ca²⁺ channels, resulting in lessened calcium influx and smooth muscle relaxation(284). Pharmacological evidences suggest that several endogenous vasodilators produce their relaxant action through the activation of specific potassium channels: the ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels). Glibenclamide, a K_{ATP} channel antagonist, has been shown to reduce the

vasodilation induced by adenosine(18,57,168,248), prostacyclin (40,169,249), and prostaglandins E₂ and D₂(40). Besides vasodilators, some vasocontractile peptides can also modulate the activity of K_{ATP} channels. Recent patch clamp studies have demonstrated that vasopressin(359) and endothelin(239) block an ATP-sensitive potassium current in smooth muscle cells isolated from porcine coronary arteries. However, the contribution of K_{ATP} channel blockade in the contractile response to these peptides has never been tested in an intact preparation. Therefore, the aim of this study was to assess the contribution of K_{ATP} channel blockade in the vasoconstriction of large conductance arteries induced by vasopressin.

4.3 Methods

4.3.1 Vessel preparation

The experiments were performed on porcine and canine circumflex coronary arteries, and on thoracic aortas taken from male Sprague-Dawley rats (300-350g). For coronary arteries, the proximal section of circumflex arteries, between the origin and the first branch, was used. The vessels were cut in 4 mm rings after being cleaned out of all fat and conjunctive tissue. The endothelium was removed mechanically by inserting one arm of a fine forceps into the lumen and then rolling back and forth ten times on a gauze soaked with physiological solution. The rings were then mounted into 20 ml organ baths filled with Krebs-Henseleit buffer of the following millimolar composition: NaCl 118, KCl 4, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1, NaHCO₃ 24, D-Glucose 11. The solution was gassed

with 95% O₂, 5% CO₂ and warmed at 37⁰ C. The preparations were then connected to strain gauge (Grass FT03) and isometric tension was recorded on a Grass (model 79) polygraph. The preparations were stretched to an optimal 4 g resting tension, as determined with repeated KCl 20 mM contractions. The injection of 1 μM acetylcholine (rat aortas and canine coronary arteries) or 0.01 μM bradykinin (porcine coronary arteries) on 20 mM precontracted rings did not induce any relaxation, confirming the absence of a functional endothelium. The preparations were allowed to stabilize 30 min before experimentations. All preparations were constricted with 1 μM phenylephrine in the absence of any other drug. All subsequent constriction were expressed as a percent response of that standard constriction. Each ring was used for a single dose-response curve. The effects of drugs were compared in parallel with rings obtained from the same aorta.

4.3.2 Statistical analysis

Values represent the mean ± SEM. Dose-response curves were analyzed using a curve-fitting analysis program(71). Probability less than 0.05 (p<0.05) were considered statistically different.

4.3.3 Drugs

A stock solution of [Arg⁸]-vasopressin (Sigma St-Louis, MO, USA) 0.231 mM was prepared in acetic acid 0.2 N containing BSA 0.1%. Papaverine solution (papaverine hydrochloride) was obtained from Frosst, Canada. All other drugs were prepared as 10 mM stock solutions: lemakalim (Smithkline Beecham

Pharmaceuticals) was dissolved in 70% ethanol, phenylephrine (ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio) and acetylcholine (Sigma) were dissolved in water, glibenclamide (ICN) was prepared in DMSO, and nifedipine (Sigma) in 95% ethanol. All subsequent dilutions of drugs were made in water, with the exception of glibenclamide which was dissolved in Krebs-Henseleit buffer. All experiments with nifedipine were performed with tubes and tissue baths protected from light.

4.4 Results

Vasopressin (0.01 to 300nM) did not induce any measurable constriction of porcine coronary arterial rings. In contrast, these rings constricted strongly with 20 mM KCl ($4.13 \pm 0.89\text{g}$, $n=4$) and with the thromboxane receptor agonist, U-46619 (300nM, $6.38 \pm 0.13\text{g}$, $n=2$). Similar results were obtained with canine coronary arteries: no constriction was observed with vasopressin (0.01 to 300 nM), despite normal constriction to 20mM KCl ($3.55 \pm 0.2\text{g}$, $n=10$).

Rat thoracic aortas, which constricted strongly to vasopressin, were used throughout the rest of the study. The contractile effect of K_{ATP} channel blockade on relaxed aortic rings was first studied. Glibenclamide (0.01 to 10 μM) added alone did not induce any constriction (data not shown). Furthermore, pretreatment of aortic rings with 1 μM glibenclamide did not reduce the maximal contractile responses of either vasopressin or phenylephrine (fig. 4.1). In these rings, the efficacy of glibenclamide was confirmed by the absence of relaxation when 0.1 μM

lemakalim was added at the end of the dose-response curves to the vasoconstrictors (data not shown). The specific antagonistic effect of vasopressin on the relaxation induced by the K_{ATP} channel opener, lemakalim, was assessed in a second experimental series. Phenylephrine was used as a control vasoconstrictor. Vasopressin ($0.1\mu\text{M}$) and phenylephrine ($0.3\mu\text{M}$) induced comparable active tension (2.96 ± 0.28 and 3.07 ± 0.22 g, respectively, $n=6$). Lemakalim (0.01 to $0.3\mu\text{M}$) relaxed completely vasopressin and phenylephrine precontracted rings (fig. 4.2). However, lemakalim relaxed vasopressin precontracted rings at lower concentrations, compared to phenylephrine ($\log[EC_{50}]$ of -7.82 ± 0.01 and -7.10 ± 0.02 , respectively, $p<0.05$, $n=6$). In contrast, the relaxation of vasopressin and phenylephrine precontracted rings by papaverine (3 to $300\mu\text{M}$) was not statistically different (fig. 4.2).

The stronger relaxant action of lemakalim against vasopressin-induced constriction was confirmed in a third experimental series. Pretreatment of rings with lemakalim ($0.01\mu\text{M}$) reduced markedly the maximum contractile response to vasopressin (fig. 4.3). In contrast, the dose-response curve to phenylephrine in lemakalim pretreated rings was shifted to the right, without any reduction in maximal response (fig. 4.3).

The contribution of calcium influx through L-type calcium channels in the constriction of aortic rings by vasopressin and phenylephrine was compared in a fourth experimental protocol. Dose-response curves to nifedipine (0.1nM to $10\mu\text{M}$)

were performed in aortic rings precontracted with vasopressin (0.1 μ M) and phenylephrine (0.3 μ M). Compared to phenylephrine precontracted rings, the dose-response curve to nifedipine in vasopressin precontracted vessels was shifted to the left (fig. 4.4, log[EC₅₀] of -7.86 ± 0.03 vs -7.52 ± 0.06 , $p < 0.05$, $n = 12$). The maximum response to nifedipine was also significantly enhanced in vasopressin ($98.5 \pm 1.5\%$), compared to phenylephrine precontracted rings ($69.8 \pm 5.1\%$, fig. 4.4).

4.5 Discussion

In the present study, we assessed the contribution of ATP sensitive potassium channel blockade in the vasoconstrictor effect of vasopressin in an intact vessel preparation. Besides vasoconstriction, vasopressin can induce endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in cerebral (63,329,344) and pulmonary arteries(87), as well as in the human forearm (331). K_{ATP} channels are not involved in the endothelium-dependent vasodilation induced by vasopressin(84). In the present study, all preparations were denuded from their endothelium in order to observe the pure contractile effect of vasopressin. Vasopressin has been shown to block K_{ATP} channels in a patch clamp study performed in smooth muscle cells isolated from porcine coronary arteries (359). This blockade was a direct effect of vasopressin from outside the cell membrane, not mediated by vasopressin receptors(359). Rings isolated from porcine coronary arteries were considered for the present study. However, vasopressin did not

constrict these rings, suggesting the absence of vasopressin receptor in these vessels. This observation also suggests that, if vasopressin blocks K_{ATP} channels, these channels are not basally active in porcine coronary arteries. The lack of constrictor effect of vasopressin in porcine coronary vessels was not species-specific, since similar results were observed in canine coronary arteries.

Rings isolated from rat thoracic aortas were strongly constricted by vasopressin. This constriction could result either from a receptor-mediated effect, or from blockade of basally active K_{ATP} channels. To verify the latter, the contractile effect of the K_{ATP} channel blocker, glibenclamide, on resting rat aortic rings was studied. Glibenclamide, at concentration ten times higher than that required to block the relaxation to lemakalim, did not induce any constriction. Furthermore, pretreatment with glibenclamide did not reduce the maximal contractile response to vasopressin and phenylephrine. These data suggest that ATP sensitive potassium channels are not basally active in these vessels.

Since blockade of K_{ATP} channels would depolarize smooth muscle cells and increase vascular tone only if these channels are active, the K_{ATP} channel opener, lemakalim, was used in our preparations. Dose-response curves to vasopressin and phenylephrine were performed in vessels in which K_{ATP} channels have been activated with lemakalim. The rationale of this experiment was the following: if vasopressin blocks K_{ATP} channels, this peptide would be more potent, compared to phenylephrine, in lemakalim pretreated rings. The opposite effect was observed:

constriction to vasopressin was not enhanced, but depressed compared to phenylephrine. Dose-response curves to lemakalim performed in vasopressin and phenylephrine precontracted rings confirmed that the relaxation to lemakalim was more pronounced in vasopressin precontracted vessels. These data taken together suggest that vasopressin does not block ATP sensitive potassium channels in rat aortic rings.

The interpretation of the present results assumes that both glibenclamide and lemakalim act selectively on K_{ATP} channels. However, the potassium channel openers pinacidil(108) and cromakalim(108,295) have been shown to increase the open probability of Ca^{2+} -activated potassium channels: this effect being blocked by glibenclamide. Other mechanisms involved in smooth muscle relaxation by potassium channel openers have been suggested(284). Despite this lack of selectivity, lemakalim and glibenclamide are the most potent modulators of K_{ATP} channels and are still valuable tools.

Vasopressin and phenylephrine, at the concentrations used in the present study, precontracted the aortic rings to a similar tension. Furthermore, papaverine, which acts independently of K_{ATP} channels(40,248), relaxed both vasopressin and phenylephrine precontracted vessels in a similar manner. Therefore, the higher sensitivity of vasopressin precontracted vessels to lemakalim suggests differences in the mechanism of constriction between vasopressin and the α_1 -agonist phenylephrine. Lemakalim, through the activation of K_{ATP} channels, hyperpolarizes

smooth muscle cells thus affecting mostly the activity of voltage-gated Ca^{2+} channels. To explain the stronger action of lemakalim against vasopressin-induced constriction, it was hypothesized that influx of extracellular Ca^{2+} , through L-type voltage-gated Ca^{2+} channels, was more important in the constrictor effect of vasopressin, as oppose to α_1 -agonists which would depend more on Ca^{2+} released from internal stores. To verify this hypothesis, dose-response curves to nifedipine, an L-type voltage-gated Ca^{2+} channels blocker, were performed. The more potent relaxant effect of nifedipine in vasopressin precontracted vessels, compared to phenylephrine, confirmed the importance of calcium influx through dihydropyridine-sensitive L-type channels in the contractile response to vasopressin.

The mechanisms by which vasopressin could activate L-type calcium channels are unknown. Other peptides, such as endothelin(158) or angiotensin II(34) have been shown to increase L-type calcium currents in whole-cell patch clamp experiments. It is unclear whether this effect involves second messengers or not. It has been recently reported that vasopressin increases a depolarizing Cl^- current in vascular smooth muscle cells(354). However the contribution of this depolarizing current in activation of voltage-gated calcium channels needs to be verified.

In conclusions, our data are incompatible with K_{ATP} channel blockade by vasopressin in the isolated rat aorta. On the other hand, the stronger action of

lemakalim and nifedipine against vasopressin-induced constriction suggests that influx of extracellular Ca^{2+} through L-type voltage-gated Ca^{2+} channels is more important in vasopressin constrictor effect, compared to phenylephrine.

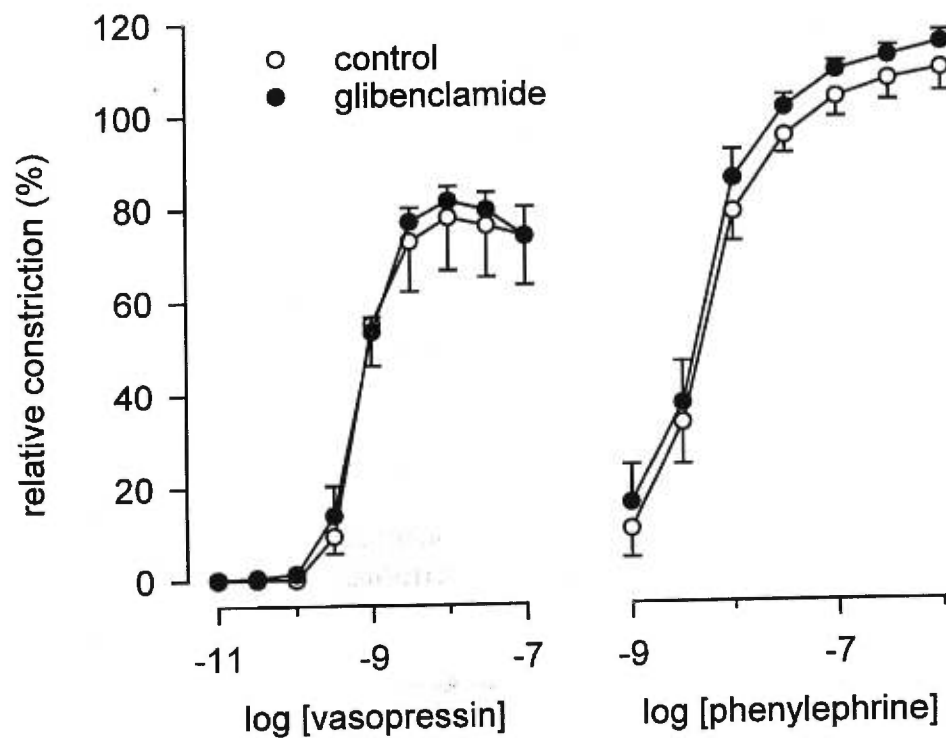


Figure 4.1: Dose-response curves to vasopressin (left panel), and to phenylephrine (right panel) under control conditions (open circles), and in the presence of $1\mu\text{M}$ glibenclamide (closed circles). The ordinate indicates the constriction relative to a standard $1\mu\text{M}$ phenylephrine constriction performed in the absence of any other drug. These curves were found to be statistically comparable.

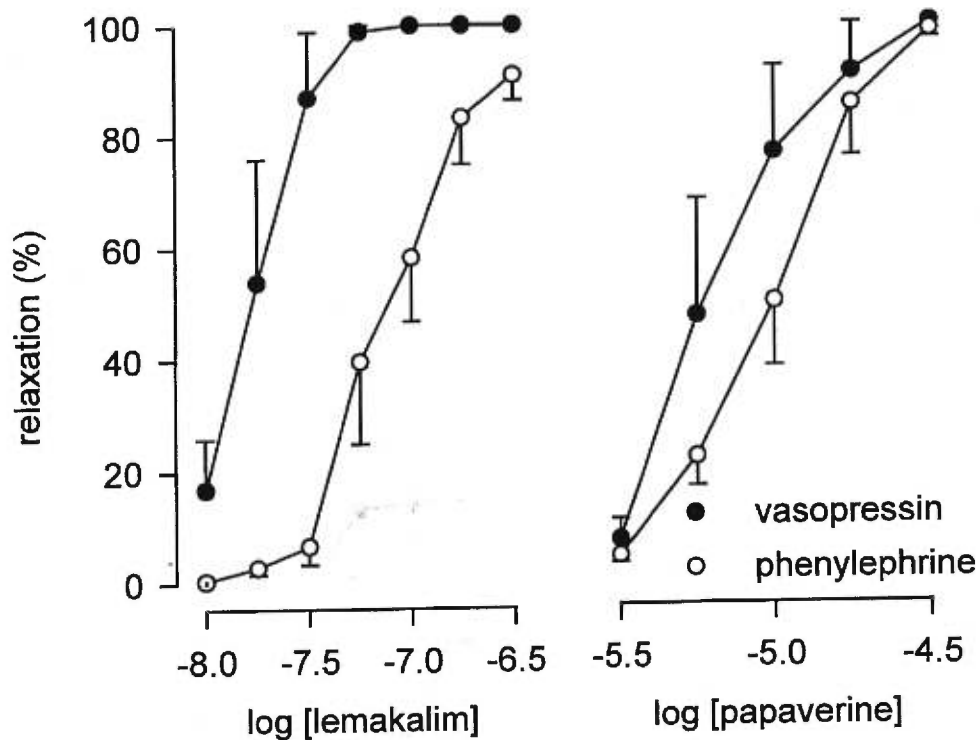


Figure 4.2: Relaxation of phenylephrine-induced ($0.3\mu\text{M}$, open circles) and vasopressin-induced ($0.1\mu\text{M}$, closed circles) tension as a function of the logarithm of lemakalim concentration (left panel) and papaverine concentration (right panel). Lemakalim was more potent in vasopressin precontracted vessels compared to phenylephrine ($\log[\text{EC}_{50}]$ of -7.82 ± 0.01 and -7.10 ± 0.02 , respectively, $p < 0.05$, $n=6$).

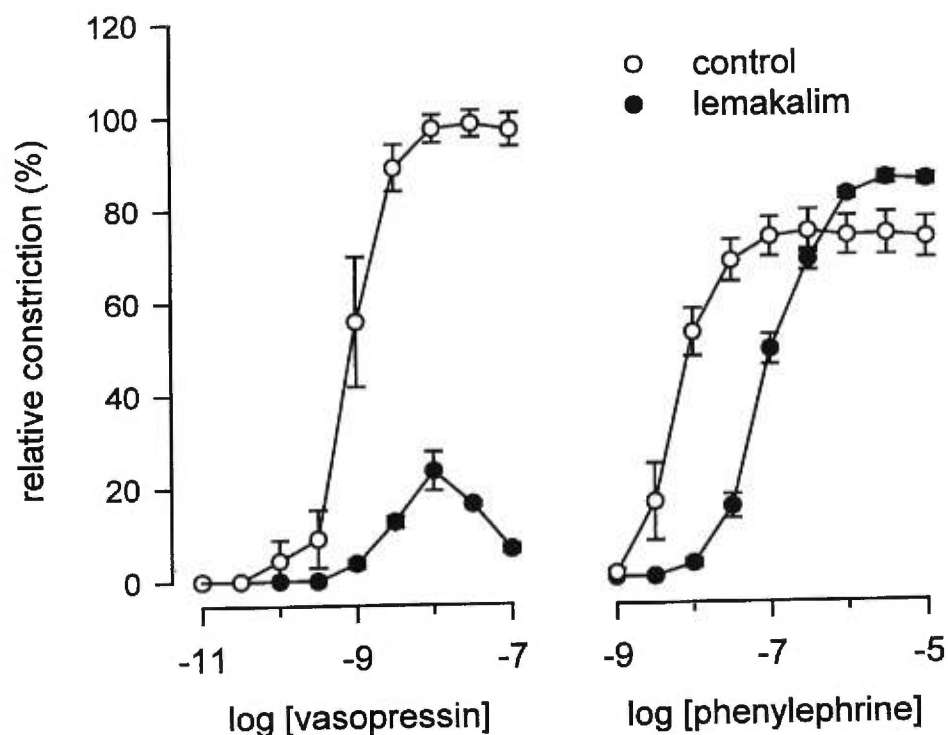


Figure 4.3: Dose-response curves to phenylephrine under control conditions (open circles), and in the presence of 0.1 μM lemakalim (closed circles). The ordinate indicates the constriction relative to a standard 1 μM phenylephrine constriction performed in the absence of any other drug. Lemakalim markedly reduced the maximum contractile response to vasopressin ($p < 0.05$, $n = 6$). The dose-response curve to phenylephrine was shifted to the right in lemakalim pretreated vessels ($\log[\text{EC}_{50}]$ of -7.06 ± 0.02 in pretreated vessels and -8.22 ± 0.02 in control conditions, $p < 0.05$, $n = 6$).

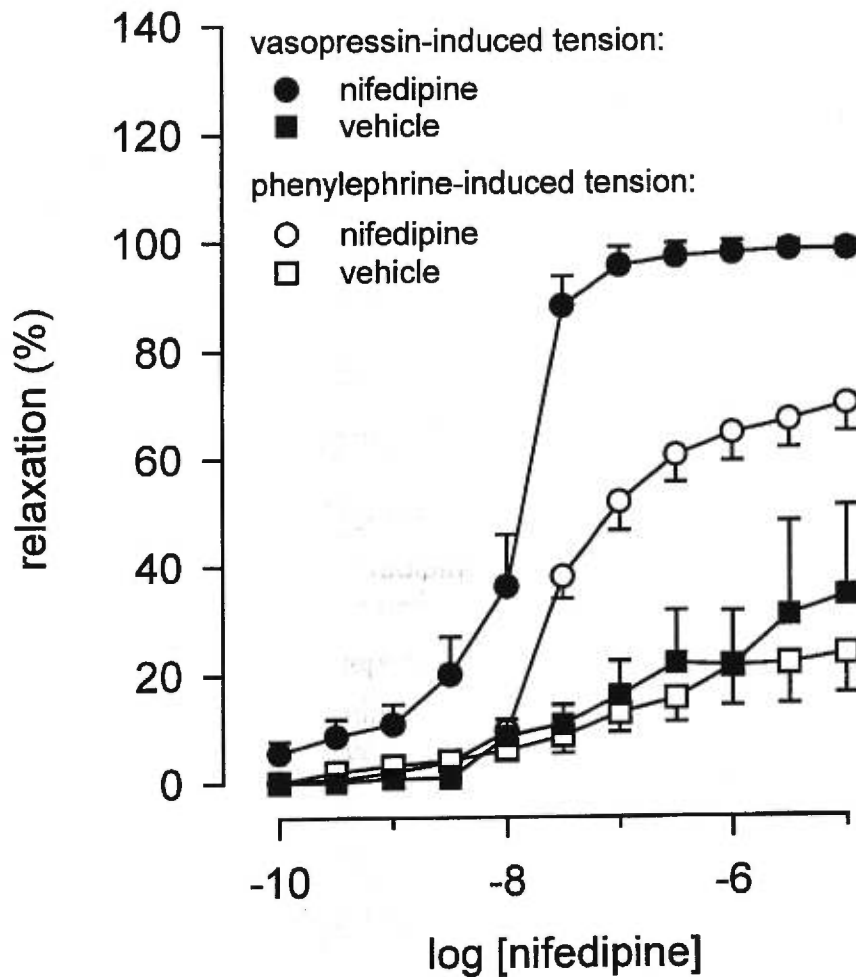


Figure 4.4: Relaxation of phenylephrine-induced ($0.3\mu\text{M}$, open symbols) and vasopressin-induced ($0.1\mu\text{M}$, closed symbols) tension as a function of the logarithm of nifedipine concentration. The dose-response curve to nifedipine (circles) was shifted to the left in vasopressin precontracted vessels ($\log[\text{EC}_{50}]$ of -7.86 ± 0.03 vs -7.52 ± 0.06 in phenylephrine precontracted vessels, $p<0.05$, $n=12$). The maximum response to nifedipine was enhanced in vasopressin precontracted rings ($98.5\pm 1.5\%$ vs $69.8\pm 5.1\%$, $p<0.05$, $n=12$). The effect of nifedipine vehicle (squares, $n=5$) tested in a separate series was found to be comparable in vasopressin and phenylephrine pre-contracted rings.

CHAPITRE 5: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Les résultats de ces travaux suggèrent une contribution d'enzymes de type tyrosine kinase lors de la contraction de l'aorte de rat produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1. En effet, l'inhibition de tyrosine kinases à l'aide d'un agent pharmacologique spécifique, la génistéine, atténue les contractions maximales produites par ces peptides. La génistéine n'a eu aucun effet sur les contractions produite par un agoniste α 1-adrénergique, la phényléphrine, écartant par le fait même un effet non-spécifique de l'inhibiteur des tyrosine kinases sur l'interaction agoniste-récepteur. De plus, la contraction produite par dépolarisation de la membrane plasmique n'a pas été modifiée par la génistéine. Ceci démontre d'une part que cet inhibiteur des tyrosine kinases n'affecte pas la contraction vasculaire de façon non spécifique et d'autre part, qu'il ne bloque pas les canaux calciques sensibles au voltage.

Les cibles exactes de ces tyrosine kinases impliquées dans la contraction du muscle lisse vasculaire sont peu connues et très peu d'études ont tenté d'identifier ces cibles dans des modèles expérimentaux autres que les cellules isolées. Nous proposons une étroite relation entre l'activité des tyrosine kinases et de certains courants ioniques lors de la contraction produite par la vasopressine et l'endothéline-1. Ces travaux représentent les premières démonstrations fonctionnelles de cibles potentielles des tyrosine kinases lors de la contraction musculaire lisse vasculaire produite par des peptides.

Ces résultats confirment l'importance des canaux calciques de type L lors de la contraction vasculaire produite par des peptides endogène. En effet, la nifédipine, un bloquant des canaux calciques de type L atténue les contractions produites par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1. De plus, ces données suggèrent un mécanisme de modulation des canaux calciques de type L par des tyrosine kinases lors de la contraction artérielle produite par des peptides endogènes. En effet, le blocage des canaux calciques de type L par la nifédipine abolie en partie l'atténuation par la génistéine de la réponse contractile produite par la vasopressine et l'endothéline-1.

La contraction de l'aorte de rat produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 est fortement inhibée par un traitement à l'IAA-94, un bloquant des canaux chlore, suggérant une contribution de courants chlore dépolarisants. De plus, nous avons démontré que ces canaux chlore sensibles à l'IAA-94 étaient potentiellement modulés par des tyrosine kinases lors de la contraction artérielle produite par des peptides endogènes. En effet, la présence d'IAA-94 a atténué en partie le potentiel inhibiteur de la génistéine lors de la contraction produite par la vasopressine et l'endothéline-1.

Finalement, les courants potassiques dépendants de l'ATP ne contribuent pas à la contraction produite par la vasopressine et l'endothéline-1. Ces courants potassiques ne peuvent donc pas constituer une cible des tyrosine kinases lors de la contraction musculaire lisse tel que suggéré par la littérature.

5.1 Voies tyrosine kinases du muscle lisse vasculaire

L'utilisation d'un inhibiteur non-spécifique des tyrosine kinases renseigne peu sur la nature exacte de la ou des voies tyrosine kinases impliquées dans la contraction vasculaire. Cependant, la littérature suggère quelques voies spécifiquement mises en jeu par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 dans le muscle lisse vasculaire.

5.1.1 Voies tyrosine kinases mises en jeu par la vasopressine dans le muscle lisse vasculaire

On connaît encore peu les voies tyrosine kinases mises en jeu par la vasopressine. Les quelques voies caractérisées semblent principalement impliquées dans les actions hypertrophiques de la vasopressine.

La vasopressine stimule des voies MAP kinase et ultimement ERK-1 et 2 via l'activation de protéine kinases C(195). L'activation des ERKs est détectable deux minutes suivant le stimulus, atteint une valeur maximale entre 5 et 10 minutes et retourne à des niveaux de base en moins de 30 minutes(195). La vasopressine active aussi rapidement les voies JAKs dans les cellules musculaires lisses en culture vraisemblablement selon un mécanisme indépendant des protéine kinases C. Par contre, il semble que cette activation des voies JAKs par la vasopressine nécessiterait la présence de calcium(130). Des études récentes suggèrent un rôle des voies FAK kinases(292) ainsi qu'une activation des tyrosine kinase de la famille des c-Src(291) dans la signalisation du récepteur V_{1a} à la vasopressine.

5.1.2 Voies tyrosine kinases mises en jeu par l'angiotensine II dans le muscle lisse vasculaire

La liaison de l'angiotensine II à son récepteur membranaire de type AT_{1A} favorise l'activité de nombreuses voies tyrosine kinases dans le muscle lisse vasculaire.

Il semble que la voie des c-Src kinases joue un rôle important dans la signalisation du récepteur AT_{1A} (164). Dans les cellules musculaires lisses vasculaires on retrouve les sous-types Fyn et c-Src. L'activation de ces tyrosine kinases mène d'une part à l'activation des phospholipases C de type γ (224) et d'autre part à l'activation des voies MAP kinase(310). L'activation de la voie JAK/STAT a été bien démontrée suite à la stimulation du récepteur AT_{1A} dans les cellules musculaires lisses vasculaires. L'angiotensine II active spécifiquement JAK2 et TYK2 favorisant ainsi la phosphorylation des protéines STAT 113 et 91(29,225) menant à l'expression des facteurs de transcription précoce. L'angiotensine II stimule les protéine kinases de la famille des FAKs(281). Les FAKs ainsi activées sont transloquées au site focal d'adhésion où leurs substrats, la paxilline(208) et le $p130^{CAS}$ (309) seront phosphorylés favorisant ainsi une réorganisation du cytosquelette.

5.1.3 Voies tyrosine kinases mises en jeu par l'endothéline-1 dans le muscle lisse vasculaire

Les voies tyrosine kinases stimulées par le récepteur ET_A ont été largement

étudiées depuis quelques années. Dans les cellules mésangiales, de multiples voies impliquants des tyrosine kinases (voies des MAP kinases, des S6 kinase et des c-Src kinase) s'activent en réponse à l'endothéline-1(318,365).

Dans les cellules musculaires lisses vasculaires une voie a été particulièrement bien décrite, la voie des MAP kinases. En effet, suite à la stimulation du récepteur ET_A , on observe une phosphorylation de Shc. La voie classique des MAP kinases se met en branle menant ultimement à la stimulation des ERK 1 et 2 et à des réponses cellulaires variées(78).

5.2 Effecteurs mis en jeu par les tyrosine kinases lors de la contraction vasculaire

De récentes études faites sur des préparations de cellules musculaires lisses en culture suggèrent quelques hypothèses permettant de spéculer sur les voies tyrosine kinases potentielles ainsi que leurs effecteurs impliqués dans la contraction du muscle lisse vasculaire.

Il y a quelques années, Liu et Sturek(217) avaient bien démontré que les tyrosine kinases n'affectaient pas la libération de calcium sensible à l' IP_3 ou à la ryanodine. Par contre, Jayaraman *et al.*(171) ont démontré que le récepteur à l' IP_3 pouvait être phosphorylé sur des résidus tyrosine sans établir de lien avec la contraction. De plus, une voie intéressante suggèrent que les phospholipases $C\gamma 1$ pourraient être responsables de cette phosphorylation(224). De plus, plusieurs évidences suggèrent que la phospholipase $C\gamma$ serait entièrement responsable de la

production d'IP₃ et de DAG. En fait dans les cellules musculaires lisses en culture, on note une absence de phospholipases Cβ1 alors que le sous-type γ y est omniprésent. Cependant, cette alternative reste hypothétique puisqu'une étude récente de Di Salvo et Raatz Nelson(75) ne corrobore pas cette implication de la phospholipase Cγ1 dans les cellules de la lignée A10.

Les MAP kinases seraient impliquées dans la contraction vasculaire en phosphorylant la caldesmone libérant ainsi les sites de liaison de la myosine sur l'actine(2,3). La sérotonine(368), la noradrénaline(182) ainsi que l'angiotensine II(82) activent les MAP kinases. L'inhibition des MAP kinases avec le PD098059 diminue la contraction produite par la sérotonine(368) et l'angiotensine II(106). De plus, l'équipe de Shiffrin propose une implication de ces voies MAP kinases lors de l'augmentation de calcium intracellulaire ainsi que de pH intracellulaire provoqué par la présence d'angiotensine II(346). Par contre, cette contribution des MAP kinases reste hypothétique puisque les travaux de Watts *et al.* ont déjà démontré une dissociation entre cette voie MAP kinase et la contraction produite par l'angiotensine II(369).

Le cytosquelette est reconnue pour participer activement à la contraction du muscle lisse vasculaire(190). Le rôle des tyrosine kinases dans les processus d'organisation de l'actine est bien reconnue dans plusieurs types cellulaires y compris les muscles lisses vasculaires. Les protéines de type FAK ainsi que les c-Src kinases sont importantes dans les processus impliquant le cytosquelette. Le

rôle exacte du cytosquelette dans la contraction du muscle lisse est peu connu mais il semble qu'une interaction importante pourrait se faire entre le cytosquelette et l'appareil contractile contribuant ainsi à la phase soutenue de la contraction du muscle lisse vasculaire(121).

On sait que le récepteur AT_{1A} peut être phosphorylé sur des résidus tyrosine en présence d'angiotensine II et que cette phosphorylation pourrait être impliquée dans le signal généré par le récepteur(225). La tyrosine 302 semble jouer un rôle crucial puisque la mutation de cette tyrosine diminue l'interaction entre le récepteur et la protéine G en plus d'atténuer la production d' IP_3 (148,205).

Il semble finalement que les tyrosine kinases soient impliquées directement dans les mécanismes de sensibilisation de l'appareil contractile au calcium. Une étude a démontré que la génistéine pouvait interférer avec l'effet contractile du calcium dans des préparations perméabilisées d'artères mésentériques de rat(345).

5.2.1 Canaux calciques de type L

Par une approche fonctionnelle nous avons démontré que les canaux calciques de type L pouvaient être des cibles potentielles de régulation par les tyrosine kinases lors de la contraction produite par la vasopressine et l'endothéline-1.

Dans le contexte où les tyrosine kinases s'avèreraient des modulateurs de l'activité des canaux calciques de type L, la famille des c-Src kinases représente une candidate potentielle de cette modulation. En effet, l'application intracellulaire

de c-Src kinase augmente les courants calciques dans l'artère de l'oreille de lapin selon un processus indépendant des protéine kinases C(375). De plus, l'utilisation d'un peptide contenant un motif activateur des c-Src kinase active les courants calciques(376). Dans la même optique, on sait que la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques de type L peut être phosphorylée en présence de PDGF et qu'elle peut être co-immunoprécipitée avec des c-Src kinases ou des FAKs(141) suggérant ainsi une modulation du canal L par des tyrosine kinases via une phosphorylation de tyrosines sur la sous-unité $\alpha 1$.

Cependant, quoique suggérant fortement une modulation du canal L par les tyrosine kinases, nos résultats peuvent aussi découler d'une implication du calcium dans l'activité des tyrosine kinases puisqu'ils ne démontrent qu'une relation entre deux mécanismes. De fait, certaines tyrosine kinases pourraient être activées par des augmentations de calcium intracellulaire. Ce mécanisme a été démontré lors de l'activation de tyrosine kinases produite par l'angiotensine II dans des cellules musculaires lisses en culture(144) ou par l'endothéline-1 dans des cellules mésangiales(62). De plus, Steusloff *et al.*(327) ont démontré une augmentation de phosphorylation de résidus tyrosines dans des muscles lisses perméabilisés et Rembold et Weaver(286) ont démontré plus récemment que la phosphorylation de résidus tyrosine induite par l'histamine dans les carotides porcines était dépendante du calcium. Cependant, Ward *et al.*(366) ont aussi démontré que la phosphorylation de tyrosine induite par la noradrénaline n'était pas inhibée par le

blocage de l'influx calcique.

5.2.2 Canaux chlore

Notre approche fonctionnelle nous a permis de démontrer la contribution de canaux chlore lors de la contraction produite par des peptides vasoconstricteurs endogènes. De plus, nous démontrons une forme de régulation de l'activité de ces canaux soit via l'activité de tyrosine kinases.

La contribution des canaux chlore dans la contraction produite par la noradrénaline a été démontré il y a une dizaine d'année(10). Plus récemment, l'équipe de Goligorsky a démontré que la contraction artérielle de petits vaisseaux de résistance produite par l'endothéline-1 était sensible à l'IAA-94(334). Cependant, la contribution de canaux chlore lors de la contraction produite par la vasopressine et l'angiotensine II n'a jamais été démontré avant nos études. L'étude de l'activité des canaux chlore est encore limitée par le manque de sélectivité des agents pharmacologiques modulant ces canaux. On connaît encore peu les caractéristiques spécifiques des canaux chlores impliqués dans la contraction artérielle. L'identification de ces canaux est primordiale dans la compréhension de la mécanique contractile. Plusieurs types de canaux chlore peuvent être potentiellement impliqués. Des canaux chlore indépendant du calcium pourraient être impliqués dans la dépolarisation de la membrane plasmique et favoriser l'activité des canaux calciques de type L. Par contre, on peut penser que des canaux chlore sensibles au calcium soient activés plus tardivement, i.e. suite à

l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire afin de maintenir la membrane dépolarisée de façon soutenue. À cet effet, leur modulation par les tyrosine kinases deviendrait un processus important dans une réponse plus tardive. Cependant, très peu de données, outre nos études, sont présentement disponibles quant à la relation entre les voies tyrosine kinases et l'activité des canaux chlore.

5.2.3 Canaux K_{ATP}

Nous avons démontré qu'il ne semblait pas y avoir de courants potassiques K_{ATP} dans les myocytes vasculaires de l'aorte de rat au repos. En effet, la présence d'une concentration efficace de glibenclamide n'a pas affecté le tonus vasculaire. Cette observation permettait de mettre en doute l'hypothèse selon laquelle les peptides vasoactifs comme la vasopressine et l'endothéline-1 pouvaient bloquer ces courants

K_{ATP} , favoriser l'accumulation de charges positives dans la cellule et ainsi provoquer une dépolarisation membranaire menant à une

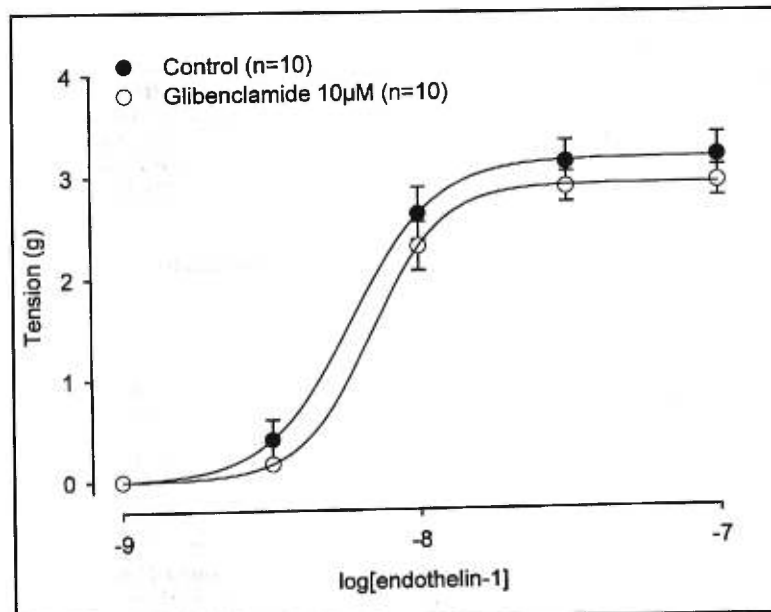


Figure 5.1: Courbes action-dose à l'endothéline-1 en absence (cercles pleins) et en présence de glibenclamide (cercles ouverts). Ces deux courbes sont statistiquement comparables.

vasoconstriction. De fait, nous n'avons mesuré aucune interaction pharmacologique entre le glibenclamide et la vasopressine ou l'endothéline-1 (Figure 5.1) lors de la contraction de l'aorte de rat. De plus, nous n'avons pas observé une inhibition plus marquée de la vasopressine comparativement à la phényléphrine sur l'effet de la lémakalime suggérant encore que les K_{ATP} ne sont pas modulés par des peptides endogènes, du moins dans l'aorte de rat. Nos résultats contrastent avec les observations réalisées en électrophysiologie sur des modèles de myocytes vasculaires isolés. En effet, dans ces conditions, la vasopressine et l'endothéline-1 appliquées du côté extracellulaire de la membrane étaient capables de bloquer un courant potassique de type K_{ATP} (239,359).

Il semble que dans les grandes artères de conductance, les courants K_{ATP} ne soient impliqués que dans la vasodilatation. Ces canaux étant bloqués par des concentrations physiologiques d'ATP sont, selon toute vraisemblance, inactifs dans une cellule musculaire au repos. Lors d'une stimulation des mécanismes contractiles, la cellule utilise son ATP, les concentrations d'ATP baisse et les canaux K_{ATP} s'activent favorisant un retour aux conditions de repos. De plus, les vasodilatateurs endogènes sont capables d'activer ces canaux. Un rôle potentiel de ces courants K_{ATP} dans les processus vasoconstricteurs, quoiqu'ayant été observés en électrophysiologie, étaient peu probable. De fait, on croit qu'il pourrait découler des modifications phénotypiques importantes que subissent les myocytes vasculaires autant en culture primaire qu'en lignées immortelles.

Quelques évidences suggèrent un rôle des tyrosine kinases dans la modulation de l'activité des canaux potassiques. En effet la génistéine et la lavendustine A augmentent l'activité des courant potassiques sensibles au calcium dans des études de canaux isolés effectuées sur des cellules musculaires lisses en culture(383). De plus, Ogata *et al.*(266) a démontré un effet de la génistéine sur les courants potassiques dépendants de l'ATP. Cependant, nos résultats laissent croire que ces mécanismes ne seraient pas impliqués dans la contraction vasculaire.

5.3 Conclusions

Nos études démontrent la contribution de tyrosine kinases dans la contraction de l'aorte de rat produite par la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline-1. De plus, nos résultats représentent les premières évidences fonctionnelles de cibles des tyrosine kinases lors de la vasoconstriction. De fait, l'activité des canaux calciques de type L ainsi que des canaux chlore sensibles à l'IAA-94 semble en relation étroite avec les tyrosine kinases. Finalement, nous démontrons que les canaux potassiques sensibles à l'ATP ne sont pas impliqués dans la contraction de l'aorte de rat.

5.4 Perspectives

Les résultats de cette étude ouvrent la voie à plusieurs champs d'investigation. On connaît maintenant des inhibiteurs ayant des cibles beaucoup plus précises dans les voies qui impliquent des tyrosine kinases. Par exemple, le PP1 pour la famille de c-*Src* ou le PD98059 pour les MEKs pourraient être utilisés

pour identifier la ou les composantes des voies impliquant des tyrosine kinases responsables de la modulation des canaux ioniques lors de la contraction vasculaire.

Des études subséquentes devront aussi viser à comprendre en quelles circonstances un même peptide ou une même voie tyrosine kinase peut mener à des réponses finales différentes à savoir une contraction ou une croissance cellulaire. À cet effet, des considérations temporelles devront être tenues pour compte i.e. déterminer l'implication d'une exposition plus ou moins prolongée de la cellule musculaire lisse au peptide. De plus, le principe de communication croisée avec les facteurs de croissance pourrait représenter un élément de réponse supplémentaire. De fait, quelques études commencent à suggérer des relations étroites entre l'activité des récepteurs à sept domaines transmembranaires et les récepteurs aux facteurs de croissance(68,214).

Ces travaux ont été financés par le CRM, le FRSQ, le FCAR, la FMC et le GRSNA.

Bibliographic

1. Abdel-Latif AA. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol.Rev.* 1986;38:227-72.
2. Adam LP, Haeberle JR, Hathaway DR. Phosphorylation of caldesmon in arterial smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 1989;264:7698-703.
3. Adam LP, Milio L, Brengle B, Hathaway DR. Myosin light chain and caldesmon phosphorylation in arterial muscle stimulated with endothelin-1. *J.Mol.Cell. Cardiol.* 1990;22:1017-23.
4. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995;268:423-6.
5. Aickin CC, Brading AF. Towards an estimate of chloride permeability in the smooth muscle of guinea-pig vas deferens. *J.Physiol. (Lond)* 1983;336:179-97.

6. Akaike N, Kanaide H, Kuga T, Nakamura M, Sadoshima J, Tomoike H. Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J.Physiol. (Lond)* 1989;416:141-60.
7. Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K, Ohno S. A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J.Biol.Chem.* 1994;269:12677-83.
8. Akiyama T, Ishiba J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S-I, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J.Biol.Chem.* 1987;262:5592-5.
9. Amedee T, Large WA. Microelectrode study on the ionic mechanisms which contribute to the noradrenaline-induced depolarization in isolated cells of the rabbit portal vein. *Br.J.Pharmacol.* 1989;97:1331-7.
10. Amédée T, Large WA, Wang Q. Characteristics of chloride currents activated by noradrenaline in rabbit ear artery cells. *J. Physiol. (Lond)* 1990;428:501-16.

11. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990;348:730-2.
12. Ashcroft FM, Gribble FM. Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Neurosci.* 1998;21:288-94.
13. Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* 1990;2:197-214.
14. Auguet M, Delaflotte S, Chabrier PE, Pirotzky E, Clostre F, Braquet P. Endothelin and Ca⁺⁺ agonist Bay K 8644: different vasoconstrictive properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988;156:186-92.
15. Barchi RL. Probing the molecular structure of the voltage-dependent sodium channel. *Annu. Rev. Neurosci.* 1988;11:455-95.
16. Baron A, Pacaud P, Loirand G, Mironneau C, Mironneau J. Pharmacological block of Ca²⁺-activated Cl⁻ current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch.* 1991;419:553-8.

17. Bean BP, Sturek M, Puga A, Hermsmeyer K. Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs. *Circ.Res.* 1986;59:229-35.
18. Belloni FL, Hintze TH. Glibenclamide attenuates adenosine-induced bradycardia and coronary vasodilatation. *Am.J.Physiol.* 1991;261:H720-H727.
19. Benham CD. ATP-activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells dissociated from rabbit ear artery. *J.Physiol. (Lond)* 1989;419:689-701.
20. Benham CD, Bolton TB, Byrne NG, Large WA. Action of externally applied adenosine triphosphate on single smooth muscle cells dispersed from rabbit ear artery. *J.Physiol. (Lond)* 1987;387:473-88.
21. Benham CD, Tsien RW. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 1987;328:275-8.
22. Benham CD, Tsien RW. Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. *J.Physiol. (Lond)* 1988;404:767-84.

23. Beretz A, Anton R, Stockett JC. Flavanoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia* 1978;34:1054-5.
24. Berk BC, Brock TA, Webb RC, Taubman MB, Atkinson WJ, Gimbrone MA, Jr., Alexander RW. Epidermal growth factor, a vascular smooth muscle mitogen, induces rat aortic contraction. *J.Clin.Invest.* 1985;75:1083-6.
25. Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J.Physiol. (Lond)* 1997;499:291-306.
26. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-21.
27. Berven LA, Hughes BP, Barritt GJ. A slowly ADP-ribosylated pertussis-toxin-sensitive GTP-binding regulatory protein is required for vasopressin-stimulated Ca^{2+} inflow in hepatocytes. *Biochem.J.* 1994;299:399-407.
28. Bescond J, Bois P, Petit-Jacques J, Lenfant J. Characterization of an angiotensin-II-activated chloride current in rabbit sino-atrial cells. *J.Membr.Biol.* 1994;140:153-61.

29. Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. *J.Biol.Chem.* 1994;269:31443-9.
30. Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M. Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett.* 1985;191:181-5.
31. Bilder GE, Krawiec JA, McVety K, Gazit A, Gilon C, Lyall R, Zilberstein A, Levitzki A, Perrone MH, Schreiber AB. Tyrophostins inhibit PDGF-induced DNA synthesis and associated early events in smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 1991;260:C721-C730
32. Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 1992;71:1069-72.
33. Bkaily G, Sperelakis N, Kuriyama H, editors. Ion channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells. New York: Elsevier; 1991; Receptors and second messenger modulation of Ca^{2+} and K^{+} channels activity in vascular smooth muscle cells. p. 185-198.
34. Bkaily G, Peyrow M, Sculptoreanu A, Jacques D, Chahine M, Regoli D,

- Sperelakis N. Angiotensin II increases I_{Si} and blocks I_K in single aortic cell of rabbit. *Pflugers Arch.* 1988;412:448-50.
35. Blatz AL, Magleby KL. Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys.J.* 1983;43:237-41.
36. Bleasdale JE, Bundy GL, Bunting S, Fitzpatrick FA, Huff RM, Sun FF, Pike JE. Inhibition of phospholipase C dependent processes by U-73122. *Adv.Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 1989;19:590-3.
37. Bolen JR, Rowley RB, Spana C, Tsygankov AY. The src family of tyrosine kinases in hematopoietic signal transduction. *FASEB J.* 1992;6:3403-9.
38. Bonnet P, Rusch NJ, Harder DR. Characterization of an outward K^+ current in freshly dispersed cerebral arterial muscle cells. *Pflugers Arch.* 1991;418:292-6.
39. Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F. The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.*

1990;267:153-6.

40. Bouchard J-F, Dumont E, Lamontagne D. Evidence that prostaglandins I₂, E₂, and D₂ may activate ATP sensitive potassium channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc.Res.* 1994;28:901-5.
41. Boulanger CM, Nakashima M, Olmos L, Joly G, Vanhoutte PM. Effects of the Ca²⁺ antagonist RO 40-5967 on endothelium- dependent responses of isolated arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1994;23:869-76.
42. Brayden JE. Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp.Pharmacol.Physiol.* 1996;23:1069-76.
43. Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992;256:532-5.
44. Briscoe J, Kohlhuber F, Muller M. JAKS and STATS branch out. *Trends Cell. Biol.* 1996;6:336-40.
45. Brock TA, Rittenhous SE, Powers C, Ekstein LS, Gimbrone MAJ, Wayne Alexander R. Phorbol ester and 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol inhibit angiotensin activation of phospholipase C in cultured vascular smooth

- muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1985;260:14158-62.
46. Bryant HJ, Harder DR, Pamnani MB, Haddy FJ. In vivo membrane potentials of smooth muscle cells in the caudal artery of the rat. *Am.J.Physiol.* 1985;249:C78-C83.
 47. Byron KL. Vasopressin stimulates Ca^{2+} spiking activity in A7r5 vascular smooth muscle cells via activation of phospholipase A_2 . *Circ.Res.* 1996;78:813-20.
 48. Carmines PK. Segment-specific effect of chloride channel blockade on rat renal arteriolar contractile responses to angiotensin II. *Am.J.Hypertens.* 1995;8:90-4.
 49. Cassel D, Pfeuffer T. Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1978;75:2669-73.
 50. Casteels R. The distribution of chloride ions in the smooth muscle cells of the guinea-pig's taenia coli. *J.Physiol. (Lond)* 1971;214:225-43.
 51. Catterall WA. Functional subunit structure of voltage-gated calcium

- channels. *Science* 1991;253:1499-500.
52. Chardonnens D, Lang U, Capponi AM, Vallotton MB. Comparison of the effects of angiotensin II and vasopressin on cytosolic free calcium concentration, protein kinase C activity, and prostacyclin production in cultured rat aortic and mesenteric smooth muscle cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1989;14(Suppl.6):S39-S44
53. Chatterjee M, Tejada M. Phorbol ester-induced contraction in chemically skinned vascular smooth muscle. *Am.J.Physiol.* 1986;251:C356-C361
54. Chen C, Wagoner PK. Endothelin Induces a Nonselective Cation Current in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ.Res.* 1991;69:447-54.
55. Childs TJ, Watson MH, Sanghera JS, Campbell DL, Pelech SL, Mak AS. Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by mitogen-activated protein (MAP) kinase and expression of MAP kinase in differentiated smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1992;267:22853-9.
56. Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels.

Diabetes 1996;45:1439-45.

57. Clayton FC, Hess TA, Smith MA, Grover GJ. Coronary reactive hyperemia and adenosine-induced vasodilation are mediated partially by a glyburide-sensitive mechanism. *Pharmacology* 1992;44:92-100.
58. Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 1997;18:827-38.
59. Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu.Rev.Biochem.* 1989;58:453-508.
60. Collett MS, Erikson RL. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1978;75:2021-4.
61. Coronado R, Morissette J, Sukhareva M, Vaughan DM. Structure and function of ryanodine receptors. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 1994;266:C1485-C1504.
62. Coroneos EJ, Kester M, Maclouf J, Thomas P, Dunn MJ. Calcium-

regulated protein tyrosine phosphorylation is required for endothelin-1 to induce prostaglandin endoperoxide synthase-2 mRNA expression and protein synthesis in mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997;8:1080-90.

63. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Endothelial L-arginine pathway and relaxations to vasopressin in canine basilar artery. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1993;264:H413-H418.
64. Creed KE. Functionnal diversity of smooth muscle. *Br.Med.Bull.* 1979;35:243-7.
65. Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov II, Arrate MP, Berdiev BK, Benos DJ, Fuller CM. Cloning of an epithelial Cl⁻ channel from bovine trachea. *J.Biol.Chem.* 1995;270:31016-26.
66. Curtis BM, Catterall WA. Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage- sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1985;82:2528-32.
67. Dart C, Standen NB. Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J.Physiol. (Lond)*

1993;471:767-86.

68. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. A role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996;379:557-60.
69. De Jongh KS, Merrick DK, Catterall WA. Subunits of purified calcium channels: a 212-kDa form of alpha 1 and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of an independent beta subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:8585-9.
70. De Keyzer Y, Auzan C, Lenne F, Beldjord C, Thibonnier M, Bertagna X, Clauser E. Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett.* 1994;356:215-20.
71. De Léan A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am.J.Physiol.* 1978;235:E97-E102.
72. Declerck I, Himpens B, Droogmans G, Casteels R. The alpha 1-agonist phenylephrine inhibits voltage-gated Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery. *Pflugers Arch.* 1990;417:117-9.

73. Deng LY, Schiffrin EL. Calcium Dependence of Effects of Endothelin on Rat Mesenteric Microvessels. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1991;69:798-804.
74. Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* 1991;5:2068-77.
75. Di Salvo J, Raatz Nelson S. Stimulation of G-protein coupled receptors in vascular smooth muscle cells induces tyrosine kinase dependent increases in calcium without tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma-1. *FEBS Lett* 1998;422:85-8.
76. Di Salvo J, Semenchuk LA, Lauer J. Vanadate-induced contraction of smooth muscle and enhanced protein tyrosine phosphorylation. *Arch.Biochem.Biophys.* 1993;304:386-91.
77. Di Salvo J, Steusloff A, Semenchuk L, Satoh S, Kolquist K, Pfitzer G. Tyrosine kinase inhibitors suppress agonist-induced contraction in smooth muscle. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1993;190:968-74.
78. Douglas SA, Ohlstein EH. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J.Vasc.Res.* 1997;34:152-64.

79. Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1995;5:268-77.
80. Doyle VM, Ruegg UT. Vasopressin induced production of inositol trisphosphate and calcium efflux in a smooth muscle cell line. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1985;131:469-76.
81. Droogmans G, Declercq I, Casteels R. Effect of adrenergic agonists on Ca^{2+} -channel currents in single vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 1987;409:7-12.
82. Duff JL, Berk BC, Corson MA. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 1992;188:257-64.
83. Edwards FR, Hirst GD, Silverberg GD. Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J.Physiol. (Lond.)* 1988;404:455-66:455-66.
84. Eichinger MR, Russ RD, Walker BR. Potassium channels are not involved in vasopressin-induced vasodilation in the rat lung. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1994;266:H491-H495.

85. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, Shichiri M, Marumo F. Cellular Mechanism of Endothelin-1 Release by Angiotensin and Vasopressin. *Hypertension* 1991;18:165-70.
86. Evans MG, Marty A. Calcium-dependent chloride currents isolated cells from rat lacrimal glands. *J.Physiol.(Lond)* 1986;378:437-60.
87. Evora PRB, Pearson PJ, Schaff HV. Arginine vasopressin induces endothelium-dependent vasodilatation of the pulmonary artery: V_1 -receptor-mediated production of nitric oxide. *Chest* 1993;103:1241-5.
88. Exton JH. Phospholipase D. *Biochim.Biophys.Acta* 1998;1436:105-15.
89. Fasolato C, Hoth M, Penner R. A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J.Biol.Chem.* 1993;268:20737-40.
90. Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S, Snyder SH. Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature* 1989;342:87-9.
91. Féger J. Landry Y, Gies J-P, editors. *Pharmacologie moléculaire*. Paris:

- arnette; 1993; 9, Les protéines-kinases et protéine-phosphatases(Ser, Thr).
p. 203-36.
92. Finch EA, Turner TJ, Goldin SM. Calcium as a co-agonist of inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release. *Science* 1991;252:443-6.
93. Fohr KJ, Scott J, Ahnert-Hilger G, Gratzl M. Characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release from permeabilized endocrine cells and its inhibition by decavanadate and p-hydroxymercuribenzoate. *Biochem. J.* 1989;262:83-9.
94. Force T, Kyriakis JM, Avruch J, Bonventre JV. Endothelin, vasopressin, and angiotensin II enhance tyrosine phosphorylation by protein kinase C-dependent and -independent pathways in glomerular mesangial cells. *J.Biol.Chem.* 1991;266:6650-6.
95. Fox AAL, Borchard U, Neumann M. Effects of vanadate on isolated vascular tissue: biochemical and functional investigations. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1983;5:309-16.
96. Franciolini F, Petris A. Chloride channels of biological membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 1990;1031:247-59.

97. Freeman EJ, Chisolm GM, Tallant EA. Role of calcium and protein kinase C in the activation of phospholipase D by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 1995;319:84-92.
98. Freeman EJ, Tallant EA. Vascular smooth-muscle cells contain AT₁ angiotensin receptors coupled to phospholipase D activation. *Biochem.J.* 1994;304:543-8.
99. Friedman ME, Suarez-Kurtz G, Kaczorowski GJ, Katz GM, Reuben JP. Two calcium currents in a smooth muscle cell line. *Am.J.Physiol.* 1986;250:H699-H703.
100. Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor. *Neuron* 1997;19:723-33.
101. Galione A. Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium. *Science* 1993;259:325-6.
102. Galizzi J-P, Qar J, Fosset M, Van Renterghem C, Lazdunski M. Regulation of calcium channels in aortic muscle cells by protein kinase C activators (diacylglycerol and phorbol esters) and by peptides (vasopressin and

- bombesin) that stimulate phosphoinositide breakdown. *J.Biol.Chem.* 1987;262:6947-50.
103. Ganitkevich VY, Isenberg G. Stimulation-induced potentiation of T-type Ca^{2+} channel currents in myocytes from guinea-pig coronary artery. *J.Physiol. (Lond)* 1991;443:703-25.
104. Ganitkevich VY, Shuba MF, Smirnov SV. Inactivation of calcium channels in single vascular and visceral smooth muscle cells of the guinea-pig. *Gen.Physiol Biophys.* 1991;10:137-61.
105. Ganitkevich VYa, Isenberg G. Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance of single myocytes from guinea-pig coronary artery. *J.Physiol.(Lond)* 1990;426:19-42.
106. Garcha RS, Sever PS, Hughes AD. Role of Ca^{2+} channels, tyrosine kinase and MAP/ERK kinase (MEK) in angiotensin II-induced contraction in human isolated resistance arteries. *J.Vasc.Res.* 1998;35
107. Gelband CH, Hume JR. Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery. *Circ.Res.* 1992;71:745-58.

108. Gelband CH, McCullough JR. Modulation of rabbit aortic Ca^{2+} -activated K^+ channels by pinacidil, cromakalim, and glibenclamide. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 1993;264:C1119-C1127.
109. Gimona M, Herzog M, Vandekerckhove J, Small JV. Smooth muscle specific expression of calponin. *FEBS Lett.* 1990;274:159-62.
110. Ginsburg M, Heller H. Antidiuretic activity in blood obtained from various parts of the cardiovascular system. *J.Endocrinol.* 1953;9:274-82.
111. Gogelein H. Chloride channels in epithelia. *Biochim.Biophys.Acta* 1988;947:521-47.
112. Gokita T, Miyauchi Y, Uchida MK. Effects of tyrosine kinase inhibitor, genistein, and phosphotyrosine- phosphatase inhibitor, orthovanadate, on Ca^{2+} -free contraction of uterine smooth muscle of the rat. *Gen.Pharmacol.* 1994;25:1673-7.
113. Gopalakrishnan V, Xu Y, Sulakhe PV, Triggle CR, McNeill JR. Vasopressin (V1) receptor characteristics in rat aortic smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1991;261:H1927-H1936.

114. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, Kimura S, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1989;86:3915-8.
115. Graceffa P. Evidence for interaction between smooth muscle tropomyosin and caldesmon. *FEBS Lett.* 1987;218:139-42.
116. Graceffa P, Wang CL, Stafford WF. Caldesmon. Molecular weight and subunit composition by analytical ultracentrifugation. *J.Biol.Chem.* 1988;263:14196-202.
117. Granot Y, Van Putten V, Schrier RW. Vasopressin dependant tyrosine phosphorylation of a 38 kDa protein in human platelets. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1990;168:566-73.
118. Haase H, Karczewski P, Beckert R, Krause EG. Phosphorylation of the L-type calcium channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium. *FEBS Lett.* 1993;335:217-22.
119. Hagiwara S, Miyazaki S, Moody W, Patlak J. Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification

in the starfish egg. *J.Physiol. (Lond)* 1978;279:167-85:167-85.

120. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul.* 1990;1:649-59.
121. Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 1997;19:137-45.
122. Harder DR. Heterogeneity of membrane properties in vascular muscle cells from various vascular beds. *Fed. Proc.* 1983;42:253-6.
123. Hashimoto Y, Soderling TR. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: comparative study of the phosphorylation sites. *Arch.Biochem Biophys.* 1990;278:41-5.
124. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-7.
125. Hecker M, Lückhoff A, Busse R. Modulation of endothelial autacoid

- release by protein kinase C: Feedback inhibition or non-specific attenuation of receptor- dependent cell activation. *J.Cell.Physiol.* 1993;156:571-8.
126. Hemric ME, Chalovich JM. Effect of caldesmon on the ATPase activity and the binding of smooth and skeletal myosin subfragments to actin. *J.Biol.Chem.* 1988;263:1878-85.
127. Hering S, Hughes AD, Timin EN, Bolton TB. Modulation of calcium channels in arterial smooth muscle cells by dihydropyridine enantiomers. *J.Gen.Physiol.* 1993;101:393-410.
128. Hermann-Frank A, Darling E, Meissner G. Functional characterization of the Ca^{2+} -gated Ca^{2+} release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch.* 1991;418:353-9.
129. Hibert M. Landry Y, Gies J-P, editors. *Pharmacologie Moléculaire.* 2 ed. Paris: arnette; 1993; 6, Les récepteurs couplés aux protéines G. p. 119-36.
130. Higashita R, Li L, Van Putten V, Yamamura M, Zarinetchi F, Heasley LE, Nemenoff RA. Ga16 mimics vasoconstrictor action to induce smooth muscle α -actin in vascular smooth muscle cells through a Jun-amino

- terminal kinase dependent pathway. *J.Biol.Chem.* 1997;272:25845-50.
131. Hill TD, Berggren PO, Boynton AL. Heparin inhibits inositol trisphosphate-induced calcium release from permeabilized rat liver cells. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 1987;149:897-901.
132. Hirasawa A, Hashimoto K, Tsujimoto G. Distribution and developmental change of vasopressin V_{1A} and V_2 receptor mRNA in rats. *Eur.J.Pharmacol.Mol.Pharmacol.* 1994;267:71-5.
133. Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Watanabe TX, Kumagai S, Nakajima K, Sakakibara S. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988;154:868-75.
134. Hirst GD, Edwards FR. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol. Rev.* 1989;69:546-604.
135. Hollenberg MD. Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol.Sci.* 1994;15:108-14.
136. Horiuchi KY, Chacko S. Caldesmon inhibits the cooperative turning-on of

the smooth muscle heavy meromyosin by tropomyosin-actin. *Biochemistry* 1989;28:9111-6.

137. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 1996;76:967-1003.
138. Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992;355:353-6.
139. House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 1987;238:1726-8.
140. Hsu CY, Persons PE, Spada AP, Bednar RA, Levitzki A, Zilberstein A. Kinetic analysis of the inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by lavendustin-A and its analogue. *J.Biol.Chem.* 1991;266:21105-12.
141. Hu XQ, Singh N, Mukhopadhyay D, Akbarali HI. Modulation of voltage-dependant Ca^{2+} channels in rabbit colonic smooth muscle cells by c-Src and focal adhesion kinase. *J.Biol.Chem.* 1998;273:5337-42.
142. Huang XY, Morielli AD, Peralta EG. Tyrosine kinase-dependent

suppression of a potassium channel by the G protein-coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *Cell* 1993;75:1145-56.

143. Hubbard SR, Bishop WR, Kirschmeier P, George SJ, Cramer SP, Hendrickson WA. Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* 1991;254:1776-9.
144. Huckle WR, Prokop CA, Dy RC, Herman B, Earp S. Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium-dependent manner. *Mol.Cell. Bio.* 1990;10:6290-8.
145. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 1993;291:329-43.
146. Hughes AD. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J.Vasc.Res.* 1995;32:353-70.
147. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1980;77:1311-5.
148. Hunyady L, Bor M, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ. A conserved NPLFY sequence contributes to agonist binding and signal transduction but is not

- an internalization signal for the type 1 angiotensin II receptor. *J.Biol.Chem.* 1995;270:16602-9.
149. Iijima K, Lin L, Nasjletti A, Goligorsky MS. Intracellular ramification of endothelin signal. *Am.J.Physiol.* 1991;260:C982-C992.
150. Ikebe M, Reardon S. Binding of caldesmon to smooth muscle myosin. *J.Biol.Chem.* 1988;263:3055-8.
151. Ikebe M, Reardon S. Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by calmodulin- dependent protein kinase II. Identification of the phosphorylation sites. *J.Biol.Chem.* 1990;265:17607-12.
152. Ikebe M, Reardon S. Phosphorylation of smooth myosin light chain kinase by smooth muscle Ca^{2+} /calmodulin-dependent multifunctional protein kinase. *J.Biol.Chem.* 1990;265:8975-8.
153. Iles DE, Segers B, Weghuis DO, Suikerbuijk R, Wieringa B. Localization of the gamma-subunit of the skeletal muscle L-type voltage- dependent calcium channel gene (CACNLG) to human chromosome band 17q24 by in situ hybridization and identification of a polymorphic repetitive DNA sequence at the gene locus. *Cytogenet.Cell Genet.* 1993;64:227-30.

154. Imamura Y, Tomoike H, Narishige T, Takahashi T, Kasuya H, Takeshita A. Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs. *Am.J.Physiol.* 1992;263:H399-H404.
155. Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995;270:1166-70.
156. Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 1996;16:1011-7.
157. Inagaki N, Gono T, Seino S. Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel. *FEBS Lett.* 1997;409:232-6.
158. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1989;86:2863-7.
159. Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. Studies on a cyclic

- nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J.Biol.Chem.* 1977;252:7610-6.
160. Inoue R, Kuriyama H. Dual regulation of cation-selective channels by muscarinic and alpha 1- adrenergic receptors in the rabbit portal vein. *J.Physiol. (Lond)* 1993;465:427-48.
161. Inoue Y, Oike K, Nakao K, Kitamura K, Kuriyama H. Endothelin augments unitary calcium currents on the smooth muscle cell membrane of guinea-pig portal vein. *J.Physiol.(Lond)* 1990;423:171-91.
162. Irvine RF. Quantal Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates-a possible mechanism. *FEBS Lett.* 1990;263:5-9.
163. Irvine RF, Letcher AJ, Heslop JP, Berridge MJ. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway--demonstration of $Ins(1,4,5)P_3$ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature* 1986;320:631-4.
164. Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II activates pp60^{c-src} in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1995;77:1053-9.

165. Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J.Biol.Chem.* 1996;271:24321-4.
166. Ito Y, Kozawa O, Tokuda H, Kotoyori J, Oiso Y. Vasopressin induces arachidonic acid release through pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in aortic smooth muscle cells: Independence from phosphoinositide hydrolysis. *J.Cell.Biochem.* 1993;53:169-75.
167. Iway N, Inagami T. Identification fo two subtypes in the rat type 1 angiotensin receptors. *FEBS Lett* 1992;298:257-60.
168. Jackson WF. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1993;265:H1797-H1803.
169. Jackson WF, König A, Dambacher T, Busse R. Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1993;264:H238-H243.
170. Jard S, Gaillard RC, Guillon G, Schoenenberg P, Muller AF, Manning M,

- Sawyer WH. Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol.Pharmacol.* 1986;30:171-7.
171. Jayaraman T, Ondrias K, Ondriasova E, Marks AR. Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* 1996;272:1492-4.
172. Jelsema CL, Axelrod J. Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987;84:3623-7.
173. Jiang MJ, Morgan KG. Intracellular calcium levels in phorbol ester-induced contractions of vascular muscle. *Am.J.Physiol.* 1987;253:H1365-H1371.
174. Jiang MJ, Morgan KG. Agonist-specific myosin phosphorylation and intracellular calcium during isometric contractions of arterial smooth muscle. *Pflugers Arch.* 1989;413:637-43.
175. Jinsi A, Deth RC. Alpha 2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction

- requires a tyrosine kinase. *Eur.J.Pharmacol.* 1995;277:29-34.
176. Johns DW, Sperelakis N. Angiotensin II-depolarization of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.* 1982;66(Suppl.2):II204
177. Jones G, Carpenter G. Regulation of phospholipase C isozymes. *Prog.Growth Factor.Res.* 1992;4:97-106.
178. Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD. Angiotensin II type 1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1992;183:1090-6.
179. Kao CY, McCullough JR. Ionic currents in the uterine smooth muscle. *J.Physiol. (Lond)* 1975;246:1-36.
180. Katada T, Ui M. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1982;79:3129-33.
181. Khalil RA, Lajoie C, Resnick MS, Morgan KG. Ca^{2+} -independent isoforms of protein kinase C differentially translocate in smooth muscle. *Am.J.Physiol.* 1992;263:C714-C719.

182. Khalil RA, Morgan KG. PKC-mediated redistribution of mitogen-activated protein kinase during smooth muscle cell activation. *Am.J.Physiol.* 1993;265:C406-C411.
183. Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishizuka Y. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium- dependent neutral protease (calpain). *J.Biol.Chem.* 1989;264:4088-92.
184. Kitazawa T, Gaylinn BD, Denney GH, Somlyo AP. G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 1991;266:1708-15.
185. Klockner U, Isenberg G. Intracellular pH modulates the availability of vascular L-type Ca²⁺ channels. *J.Gen.Physiol.* 1994;103:647-63.
186. Klohs WD, Fry DW, Kraker AJ. Inhibitors of tyrosine kinase. *Curr. Opin. Oncol.* 1997;9:562-8.
187. Klöckner U, Isenberg G. Endothelin depolarizes myocytes from porcine coronary and human mesenteric arteries through a Ca-activated chloride current. *Pflugers Arch.* 1991;418:168-75.

188. Knopf JL, Lee MH, Sultzman LA, Kriz RW, Loomis CR, Hewick RM, Bell RM. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 1986;46:491-502.
189. Koch WJ, Hui A, Shull GE, Ellinor P, Schwartz A. Characterization of cDNA clones encoding two putative isoforms of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine-sensitive voltage- dependent calcium channel isolated from rat brain and rat aorta. *FEBS Lett.* 1989;250:386-8.
190. Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Murakawa K, Horio T, Takeda T. Inhibition by Atrial and Brain Natriuretic Peptides of Endothelin-1 Secretion After Stimulation with Angiotensin- II and Thrombin of Cultured Human Endothelial Cells. *J.Clin.Invest.* 1991;87:1999-2004.
191. Kondo K, Kozawa O, Takatsuki K, Oiso Y. Ca^{2+} influx stimulated by vasopressin is mediated by phosphoinositide hydrolysis in rat smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1989;161:677-82.
192. Kowalski MT, George PR, Harrison TM, Wray DW, Norman RI. Effects of anti-calcium channel alpha 2-subunit antibodies on calcium flux and 1,4-dihydropyridine binding. *Biochem. Soc.Trans.* 1990;18:890.

193. Krautwurst D, Degtiar VE, Schultz G, Hescheler J. The isoquinoline derivative LOE 908 selectively blocks vasopressin- activated nonselective cation currents in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1994;349:301-7.
194. Kremer SG, Breuer WV, Skorecki KL. Vasoconstrictor hormones depolarize renal glomerular mesangial cells by activating chloride channels. *J.Cell Physiol.* 1989;138:97-105.
195. Kribben A, Li X, Wieder ED, Van Putten V, Schrier RW, Nemenoff RA. AVP-induced activation of MAP kinase in vascular smooth muscle cells is mediated through protein kinase C. *Am.J.Physiol.* 1993;265:C939-C945.
196. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993;362:127-33.
197. Kuga T, Sadoshima J, Tomoike H, Kanaide H, Akaide N, Nakamura M. Actions of Ca^{2+} antagonists on two type of Ca^{2+} channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *Circ.Res.* 1990;67:469-80.

198. Kume S, Muto A, Inoue T, Suga K, Okano H, Mikoshiba K. Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in ventral signaling in *Xenopus* embryos. *Science* 1997;278:1940-3.
199. Kuriyama H. Bülbbring E, Brading AF, Johnes AW, Tomita T, editors. Smooth muscles. An assesement of current knowledge. London: Edward Arnold; 1981;Excitation-contraction coupling in various visceral smooth muscle. p. 171-97.
200. Kuriyama H, Ito Y, Suzuki H, Kitamura K, Itoh T. Factors modifying contraction-relaxation cycle in vascular smooth muscles. *Am.J.Physiol.* 1982;243:H641-H662.
201. Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol.Rev.* 1995;47:387-561.
202. Lacerda AE, Kim HS, Ruth P, Perez-Reyes E, Flockerzi V, Hofmann F, Birnbaumer L, Brown AM. Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine- sensitive Ca^{2+} channel. *Nature* 1991;352:527-30.

203. Laniyonu A, Saifeddine M, Ahmad S, Hollenberg MD. Regulation of vascular and gastric smooth muscle contractility by pervanadate. *Br.J.Pharmacol.* 1994;113:403-10.
204. Laniyonu AA, Saifeddine M, Yang SG, Hollenberg MD. Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of G- protein-linked vascular agonists. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1994;72:1075-85.
205. Laporte SA, Servant G, Richard DE, Escher E, Guillemette G, Leduc R. The tyrosine within the NPXnY motif of the human angiotensin II type 1 receptor is involved in mediating signal transduction but is not essential for internalization. *Mol.Pharmacol.* 1996;49:89-95.
206. Large WA, Wang Q. Characteristics and physiological role of the Ca^{2+} -activated Cl^- conductance in smooth muscle. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 1996;40:C435-C454.
207. Lederer WJ, Nichols CG, Smith GL. The mechanism of early contractile failure of isolated rat ventricular myocytes subjected to complete metabolic inhibition. *J.Physiol. (Lond)* 1989;413:329-49.
208. Leduc L, Meloche S. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of

- the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1995;270:4401-4.
209. Lee HC, Aarhus R, Graeff R, Gurmack ME, Walseth TF. Cyclic ADP ribose activation of the ryanodine receptor is mediated by calmodulin. *Nature* 1994;370:307-9.
210. Lee K-M, Toscas K, Villereal ML. Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced Ca^{2+} entry by tyrosine kinase inhibitors. *J.Biol.Chem.* 1993;268:9945-8.
211. Lee MW, Severson DL. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am.J.Physiol.* 1994;267:C659-C678.
212. Levitan IB. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu.Rev.Physiol* 1994;56:193-212.
213. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995;267:1782-8.
214. Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA. Convergence of angiotensin II

- and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1995;270:12563-8.
215. Liou YM, Morgan KG. Redistribution of protein kinase C isoforms in association with vascular hypertrophy of rat aorta. *Am.J.Physiol* 1994;267:C980-C989
216. Little PJ, Neylon CB, Tkachuk VA, Bobik A. Endothelin-1 and endothelin-3 stimulate calcium mobilization by different mechanisms in vascular smooth muscle. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1992;183:694-700.
217. Liu CY, Sturek M. Attenuation of endothelin-1-induced calcium response by tyrosine kinase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 1996;270:C1825-C1833
218. Liu Y, Geisbuhler B, Jones AW. Activation of multiple mechanisms including phospholipase D by endothelin-1 in rat aorta. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 1992;262:c941-c949
219. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 1987;325:321-6.

220. Loirand G, Faiderbe S, Baron A, Geffard M, Mironneau J. Autoanti-phosphatidylinositide antibodies specifically inhibit noradrenaline effects on Ca^{2+} and Cl^- channels in rat portal vein myocytes. *J.Biol.Chem.* 1992;267:4312-6.
221. Luckhoff A, Clapham DE. Calcium channels activated by depletion of internal calcium stores in A431 cells. *Biophys.J.* 1994;67:177-82.
222. Lukas TJ, Burgess WH, Prendergast FG, Lau W, Watterson DM. Calmodulin binding domains: characterization of a phosphorylation and calmodulin binding site from myosin light chain kinase. *Biochemistry* 1986;25:1458-64.
223. Marcovitz PM, Aisen AM, Fencil LE, Swanson SD, Buda AJ. Metabolic effects of adenosine on regional myocardial ischemia by phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Am.Heart J.* 1992;124:1205-12.
224. Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1 in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1994;269:10935-9.
225. Marrero MB, Scheiffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine

- P, Bernstein KE. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature* 1995;375:247-50.
226. Marsden PA, Danthuluri NR, Brenner BM, Ballermann BJ, Brock TA. Endothelin action on vascular smooth muscle involves inositol trisphosphate and calcium mobilization. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1989;158:86-93.
227. McCarthy RT, Cohen CJ. Nimodipine block of calcium channels in rat vascular smooth muscle cell lines. Exceptionally high-affinity binding in A7r5 and A10 cells. *J.Gen.Physiol* 1989;94:669-92.
228. McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 1994;74:365-507.
229. McPherson PS, Campbell KP. The ryanodine receptors, Ca²⁺ release channel. *J.Biol.Chem.* 1993;268:13765-8.
230. Mezgueldi M, Fattoum A, Derancourt J, Kassab R. Mapping of the functional domains in the amino-terminal region of calponin. *J.Biol.Chem.* 1992;267:15943-51.

231. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989;340:230-3.
232. Mikkelsen EO, Thastrup O, Christensen SB. Effects of thapsigargin in isolated rat thoracic aorta. *Pharmacol.Toxicol.* 1988;62:7-11.
233. Mikoshiba K. The InsP₃ receptor and intracellular Ca²⁺ signaling. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1997;7:339-45.
234. Minami K, Fukuzawa K, Inoue I. Regulation of a non-selective cation channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells by tyrosine kinase. *Pflugers Arch.* 1994;426:254-7.
235. Mishra SK, Hermsmeyer K. Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circ.Res.* 1994;75:144-8.
236. Mitsuhashi T, Curtis Morris R, Ives HE. Endothelin-induced increases in vascular smooth muscle Ca²⁺ do not depend on dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels. *J.Clin.Invest.* 1989;84:635-9.

237. Miyoshi Y, Nakaya Y. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;181:700-6.
238. Miyoshi Y, Nakaya Y. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;181:700-6.
239. Miyoshi Y, Nakaya Y, Wakatsuki T, Nakaya S, Fujino K, Saito K, Inoue I. Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ. Res.* 1992;70:612-6.
240. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989;2:1313-23.
241. Morel A, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Lolait SJ. Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature* 1992;356:523-6.
242. Murakami K, Whiteley MK, Routtenberg A. Regulation of protein kinase C activity by cooperative interaction of Zn²⁺ and Ca²⁺. *J. Biol. Chem.*

1987;262:13902-6.

243. Muraki K, Imaizumi Y, Watanabe M. Sodium currents in smooth muscle cells freshly isolated from stomach fundus of the rat and ureter of the guinea-pig. *J.Physiol.(Lond)* 1991;442:351-75.
244. Muramatsu I, Hollenberg MD, Lederis K. Vascular actions of epidermal growth factor-urogastrone: possible relationship to prostaglandin production. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1985;63:994-9.
245. Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP- sensitive potassium channels. *J.Physiol. (Lond)* 1995;486:47-58.
246. Murphy TJ, Alexander RW, Griending KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991;351:233-6.
247. Nakayama N, Kirley TL, Vaghy PL, McKenna E, Schwartz A. Purification of putative Ca²⁺ channel protein from rabbit skeletal muscle. Determination of the amino-terminal sequence. *J.Biol.Chem.* 1987;262:6572-6.

248. Nakhostine N, Lamontagne D. Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K^+ channel activation. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1993;265:H1289-H1293.
249. Nakhostine N, Lamontagne D. Contribution of prostaglandins in hypoxia-induced vasodilatation in isolated rabbit hearts. Relation to adenosine and K_{ATP} channels. *Pflugers Arch.* 1994;428:526-32.
250. Neild TO, Keef K. Measurements of the membrane potential of arterial smooth muscle in anesthetized animals and its relationship to changes in artery diameter. *Microvasc.Res.* 1985;30:19-28.
251. Nelson MT, Brayden JE. Regulation of arterial tone by calcium-dependent K^+ channels and ATP-sensitive K^+ channels. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 1993;7 Suppl. 3:605-10.
252. Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K^+ channels. *Nature* 1990;344:770-3.
253. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle

- tone. *Am.J.Physiol.* 1990;259:C3-18.
254. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am.J.Physiol.* 1995;268:C799-C822.
255. Ng KKF, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 1967;216:762-6.
256. Ngai PK, Walsh MP. Inhibition of smooth muscle actin-activated myosin Mg^{2+} -ATPase activity by caldesmon. *J.Biol.Chem.* 1984;259:13656-9.
257. Ngai PK, Walsh MP. The effects of phosphorylation of smooth-muscle caldesmon. *Biochem. J.* 1987;244:417-25.
258. Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;316:443-6.
259. Nishikawa M, de Lanerolle P, Lincoln TM, Adelstein RS. Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 1984;259:8429-36.

260. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988;334:661-5.
261. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;258:607-14.
262. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995;9:484-96.
263. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305:147-8.
264. Noma A, Takano M. The ATP-sensitive K⁺ channel. *Jpn.J.Physiol.* 1991;41:177-87.
265. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985;316:440-3.
266. Ogata R, Kitamura K, Ito Y, Nakano H. Inhibitory effects of genistein on ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit portal vein smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 1997;122:1395-404.

267. Ohya Y, Sperelakis N. Involvement of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 1991;68:763-71.
268. Oike M, Kitamura K, Kuriyama H. Histamine H3-receptor activation augments voltage-dependent Ca^{2+} current via GTP hydrolysis in rabbit saphenous artery. *J.Physiol. (Lond)* 1992;448:133-52.
269. Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Arch.* 1987;409:561-8.
270. Okuda T, Yamashita N, Kurokawa K. Angiotensin II and vasopressin stimulate calcium-activated chloride conductance in rat mesangial cells. *J.Clin.Invest.* 1986;78:1443-8.
271. Oliver G, Schäfer EA. On the physiological action of extracts of pituitary body and certain other glandular organs. *J.Physiol.Lond.* 1895;18:277-9.
272. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J.Biol.Chem.* 1988;263:6927-32.

273. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:3099-103.
274. Osada S, Mizuno K, Saido TC, Akita Y, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S. A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J.Biol.Chem.* 1990;265:22434-40.
275. Osada S, Mizuno K, Saido TC, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S. A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol.Cell Biol.* 1992;12:3930-8.
276. Pacaud P, Loirand G, Baron A, Mironneau C, Mironneau J. Ca^{2+} channel activation and membrane depolarization mediated by Cl^{-} channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br.J.Pharmacol.* 1991;104:1000-6.
277. Pacaud P, Loirand G, Mironneau C, Mironneau J. Noradrenaline activates a calcium-activated chloride conductance and increases the voltage-dependent calcium current in cultured single cells of rat portal vein. *Br.J.Pharmacol.* 1989;97:139-46.

278. Pearson RB, Wettenhall RE, Means AR, Hartshorne DJ, Kemp BE. Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase. *Science* 1988;241:970-3.
279. Pelech SL, Sanghera JS. Mitogen activated protein kinases, versatile transducers in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 1992;17:233-8.
280. Phillips AM, Bull A, Kelly LE. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 1992;8:631-42.
281. Polte TR, Naftilan AJ, Hanks SK. Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosin content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J.Cell.Biochem.* 1994;55:106-19.
282. Putney JW. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986;7:1-12.
283. Putney JWJ. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 1990;11:611-24.

284. Quast U. Do the K^+ channel openers relax smooth muscle by opening K^+ channels. *Trends Pharmacol.Sci.* 1993;14:332-7.
285. Ramdas I, McMurray JS, Budde RJ. The degree of inhibition of protein tyrosine kinase activity by tyrphostin 23 and 25 is related to their instability. *Cancer Res* 1994;54:867-9.
286. Rembold CM, Weaver BA. Tyrosine phosphorylation and regulation of swine carotid artery contraction. *J.Vasc.Res.* 1997;34:1-10.
287. Resink TJ, Scott-Burden T, Bühler FR. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1988;157:1360-8.
288. Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J.Biol.Chem.* 1992;267:12393-6.
289. Robertson BE, Bonev AD, Nelson MT. Inward rectifier K^+ currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg^{2+} , Ca^{2+} , and Ba^{2+} . *Am.J.Physiol.* 1996;271:H696-H705.
290. Robishaw JD, Russell DW, Harris BA, Smigel MD, Gilman AG. Deduced

- primary structure of the alpha subunit of the GTP- binding stimulatory protein of adenylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986;83:1251-5.
291. Rodriguez-Fernandez JL, Rozengurt E. Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase. *J.Biol.Chem.* 1996;271:27895-901.
292. Rodriguez-Fernandez JL, Rozengurt E. Bombesin, vasopressin lysophosphatidic acid, and sphingosylphosphorylcholine induce focal adhesion kinase activation in intact Swiss 3T3 cells. *J.Biol.Chem.* 1998;273:19321-8.
293. Ruegg UT, Burgess GM. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol.Sci.* 1989;10:218-20.
294. Ruegg UT, Wallnofer A, Weir S, Cauvin C. Receptor-operated calcium-permeable channels in vascular smooth muscle. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1989;14 Suppl 6:S49-S58
295. Rusko J, Tanzi F, Van Breemen C, Adams DJ. Calcium-activated

- potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: Conductance, Ca^{2+} sensitivity and block. *J.Physiol.(Lond)* 1992;455:601-21.
296. Ryan US, Ryan UW, Whitaker C, Chiu A. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). Immunohistochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell* 1976;8:125-45.
297. Saifeddine M, Laniyonu A, Yang S-G, Hollenberg MD. Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of angiotensin-II in vascular tissue. *Pharmacology communications* 1992;1:177-84.
298. Sakura H, Ammala C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP- sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1995;377:338-44.
299. Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348:732-5.
300. Samaha FF, Heineman FW, Ince C, Fleming J, Balaban RS. ATP-sensitive

potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 1992;262:C1220-C1227.

301. Sandberg D, Ji H, Clark AJL, Shapira H, Catt KJ. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 1992;267:9455-8.
302. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iway N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. Cloning and expression of a complementary cDNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991;351:230-2.
303. Sasamura H, Dzau VJ, Pratt RE. Desensitization of angiotensin receptor function. *Kidney Int.* 1994;46:1499-501.
304. Satoh S, Itoh T, Kuriyama H. Actions of angiotensin II and noradrenaline on smooth muscle cells of canine mesenteric artery. *Pflugers Arch.* 1987;410:132-8.
305. Savineau JP, Gonzalez DLF, Marthan R. Effect of modulators of tyrosine kinase activity on agonist-induced contraction in the rat pulmonary vascular smooth muscle. *Pulm.Pharmacol.* 1996;9:189-95.

306. Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Masaki T. Analysis of endothelin related peptides in culture supernatant of porcine aortic endothelial cells: evidence for biosynthetic pathway of endothelin-1. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 1989;162:1287-94.
307. Sawamura T, Shinmi O, Kishi N, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Kimura S. Analysis of big endothelin-1 digestion by cathepsin D. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 1990;172:883-9.
308. Sawyer WH, Manning M. The use of antagonists of vasopressin in studies of its physiological functions. *Fed. Proc.* 1985;44:78-80.
309. Sayeski PP, Ali MS, Harp JB, Marrero MB, Bernstein KE. Phosphorylation of p130^{CAS} by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca²⁺, and protein kinase C. *Circ.Res.* 1998;82:1279-88.
310. Sayeski PP, Showkat Ali M, Semeniuk DJ, Doan TN, Bernstein KE. Angiotensin II signal transduction pathways. *Regulatory Peptides* 1998;78:19-29.
311. Schlaepfer DD, Hunter T. Focal adhesion kinase overexpression enhances Ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein

- kinase through interactions with and activation of c-Src. *J.Biol.Chem.* 1997;272:13189-95.
312. Schuhmann K, Groschner K. Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type Ca^{2+} channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett.* 1994;341:208-12.
313. Seino A, Kobayashi M, Kobayashi J, Fang YI, Ishibashi M, Nakamura H, Momose K, Ohizumi Y. 9-methyl-7-bromoeudistomin D, a powerful radio-labelable Ca^{2+} releaser having caffeine-like properties, acts on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release channels of sarcoplasmic reticulum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1991;256:861-7.
314. Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J.Biol.Chem.* 1993;268:24296-302.
315. Share L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 1988;68:1248-84.
316. Silberberg SD, Poder TC, Lacerda AE. Endothelin increases single-channel calcium currents in coronary arterial smooth muscle cells. *FEBS Lett.*

1989;247:68-72.

317. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* 1990;4:2989-3000.
318. Simonson MS, Herman WH. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. *J.Biol.Chem.* 1993;268, No.13:9347-57.
319. Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 1991;253:1553-7.
320. Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. Preparation and function of hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 1956;103:295-9.
321. Soejima M, Kokubun S. Single anion-selective channel and its ion selectivity in the vascular smooth muscle cell. *Pflugers Arch.* 1988;411:304-11.
322. Sokol PT, Hu W, Yi L, Toral J, Chandra M, Ziai MR. Cloning of an apamin binding protein of vascular smooth muscle. *J.Protein Chem.*

- 1994;13:117-28.
323. Stafford WF, Mabuchi K, Takahashi K, Tao T. Physical characterization of calponin. *J.Biol.Chem.* 1995;270:10576-9.
324. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989;245:177-80.
325. Stanfield PR. Voltage-dependent calcium channels of excitable membranes. *Br.Med.Bull.* 1986;42:359-67.
326. Sternweis PC, Smrcka AV. Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 1992;17:502-6.
327. Steusloff A, Paul E, Semenchuk LA, Di Salvo J, Pfitzer G. Modulation of Ca²⁺ sensitivity in smooth muscle by genistein and protein tyrosine phosphorylation. *Arch.Biochem.Biophys.* 1995;320:236-42.
328. Sugimoto T, Saito M, Mochizuki S, Watanabe Y, Hashimoto S, Kawashima H. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V_{1b} vasopressin receptor. *J.Biol.Chem.*

1994;269:27088-92.

329. Suzuki Y, Satoh S, Oyama H, Takayasu M, Shibuya M. Regional differences in the vasodilator response to vasopressin in canine cerebral arteries in vivo. *Stroke* 1993;24:1049-53.
330. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79:215-62.
331. Tagawa T, Imaizumi T, Endo T, Shiramoto M, Hirooka Y, Ando S, Takeshita A. Vasodilatory effect of arginine vasopressin is mediated by nitric oxide in human forearm vessels. *J.Clin.Invest.* 1993;92:1483-90.
332. Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F- actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 1986;141:20-6.
333. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987;84:5478-82.
334. Takenaka T, Epstein M, Forster H, Landry DW, Iijima K, Goligorsky MS.

- Attenuation of endothelin effects by a chloride channel inhibitor, indanyloxyacetic acid. *Am.J.Physiol.Renal,Fluid Electrolyte Physiol.* 1992;262:F799-F806.
335. Takuwa Y, Kasuya Y, Takuwa N, Kudo M, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Yamashita K. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin- insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J.Clin Invest.* 1990;85:653-8.
336. Tanaka T, Ohta H, Kanda K, Hidaka H, Sobue K. Phosphorylation of high-Mr caldesmon by protein kinase C modulates the regulatory function of this protein on the interaction between actin and myosin. *Eur.J.Biochem* 1990;188:495-500.
337. Taylor CW, Broad LM. Pharmacological analysis of intracellular Ca^{2+} signalling: problems and pitfalls. *Trends Pharmacol.Sci.* 1998;19:370-5.
338. Ten Eick RE, Whalley DW, Rasmussen HH. Connections: Heart disease, cellular electrophysiology, and ion channels. *FASEB J.* 1992;6:2568-80.
339. Terada K, Nakao K, Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Action of the 1,4-dihydropyridine derivative, KW-3049, on the smooth muscle membrane of

- the rabbit mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* 1987;92:615-25.
340. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1990;87:2466-70.
341. Thibonnier M. Signal transduction of V_1 -vascular vasopressin receptors. *Reg. Pept.* 1992;38:1-11.
342. Thibonnier M, Bayer AL, Simonson MS, Kester M. Multiple signaling pathways of V_1 -vascular vasopressin receptors of A_{7r5} cells. *Endocrinology* 1991;129:2845-56.
343. Timmermans PMWM, Penfield P, Chin AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD. Angiotensin II receptors and function correlates. *Am.J.Hypertens.* 1992;5:221s-35s.
344. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebroarterial relaxations mediated by nitric oxide derived from endothelium and vasodilator nerve. *J.Vasc.Res.* 1993;30:61-7.

345. Toma C, Jensen PE, Prieto D, Hughes A, Mulvany MJ, Aalkjaer C. Effects of tyrosine kinase inhibitors on the contractility of rat mesenteric resistance arteries. *Br.J.Pharmacol.* 1995;114:1266-72.
346. Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circ.* 1999;99:392-9.
347. Trieschmann U, Pilchmaier M, Klöckner U, Isenberg G. Vasorelaxation due to K-agonist. Single channel recordings from isolated human vascular myocytes. *Pflugers Arch.* 1988;411:R199-R199.
348. Trimmer JS, Cooperman SS, Tomiko SA, Zhou JY, Crean SM, Boyle MB, Kallen RG, Sheng ZH, Barchi RL, Sigworth FJ. Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* 1989;3:33-49.
349. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol.Sci.* 1991;12:349-54.
350. Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block.

Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem. 1987;16:265-90.

351. Tsuda T, Kawahara Y, Shii K, Koide M, Ishida Y, Yokoyama M. Vasoconstrictor-induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. FEBS Lett. 1991;285:44-8.
352. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griending KK. Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. Mol.Pharmacol. 1999;55:142-9.
353. Usune S, Katsuragi T, Furukawa T. Involvement of K^+ -Channel Opening in Endothelin-1 Induced Suppression of Spontaneous Contractions in the Guinea Pig Taenia- Coli. Can.J.Physiol.Pharmacol. 1991;69:1908-13.
354. Van Renterghem C, Lazdunski M. Endothelin and vasopressin activate low conductance chloride channels in aortic smooth muscle cells. Pflugers Arch. 1993;425:156-63.
355. Van Renterghem C, Romey G, Lazdunski M. Vasopressin modulates the spontaneous electrical activity in aortic cells (line A7r5) by acting on three different types of ionic channels. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.

1988;85:9365-9.

356. Van Renterghem C, Vigne P, Barhanin J, Schmid-Alliana A, Frelin C, Lazdunski M. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988;157:977-85.
357. Varadi G, Lory P, Schultz D, Varadi M, Schwartz A. Acceleration of activation and inactivation by the beta subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 1991;352:159-62.
358. Volk KA, Shibata EF. Single delayed rectifier potassium channels from rabbit coronary artery myocytes. *Am.J.Physiol.* 1993;264:H1146-H1153
359. Wakatsuki T, Nakaya Y, Inoue I. Vasopressin modulates K⁺-channel activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1992;263:H491-H496.
360. Wallnofer A, Cauvin C, Ruegg UT. Vasopressin increases ⁴⁵Ca²⁺ influx in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 1987;148:273-8.
361. Walsh MP. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction.

Mol.Cell Biochem. 1994;135:21-41.

362. Walsh MP, Andrea JE, Allen BG, Clément-Chomienne O, Collins EM, Morgan KG. Smooth muscle protein kinase C. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1994;72:1392-9.
363. Wang Q, Large WA. Noradrenaline-evoked cation conductance recorded with the nystatin whole-cell method in rabbit portal vein cells. *J.Physiol. (Lond)* 1991;435:21-39.
364. Wang R, Karpinski E, Pang PK. Two types of calcium channels in isolated smooth muscle cells from rat tail artery. *Am.J.Physiol.* 1989;256:H1361-H1368.
365. Wang Y, Simonson MS, Pouyssegur J, Dunn MJ. Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Biochem. J.* 1992;287:589-94.
366. Ward DT, Ohanian J, Heagerty AM, Ohanian V. Phospholipase D-induced phosphatidate production in intact small arteries during noradrenaline stimulation: involvement of both G-protein and tyrosine-phosphorylation. *Biochem. J.* 1995;307:451-6.

367. Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br.J.Pharmacol.* 1993;110:777-82.
368. Watts SW. Serotonin activates the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle: use of the mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996;279:1541-50.
369. Watts SW, Florian JA, Monroe KM. Dissociation of angiotensin II-stimulated activation of mitogen-activated protein kinase kinase from vascular contraction. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1998;286:1431-8.
370. Watts SW, Yeum CH, Campbell G, Webb RC. Serotonin stimulates protein tyrosyl phosphorylation and vascular contraction via tyrosine kinase. *J.Vasc.Res.* 1996;33:288-98.
371. Wawrzynow A, Collins JH, Bogatcheva NV, Vorotnikov AV, Gusev NB. Identification of the site phosphorylated by casein kinase II in smooth muscle caldesmon. *FEBS Lett.* 1991;289:213-6.
372. West GA, Leppla DC, Simard JM. Effects of external pH on ionic currents

- in smooth muscle cells from the basilar artery of the guinea pig. *Circ.Res.* 1992;71:201-9.
373. Weston AH, Edwards G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. *Biochem.Pharmacol.* 1992;43:47-54.
374. Wijetunge S, Aalkjaer C, Schachter M, Hughes AD. Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1992;189:1620-3.
375. Wijetunge S, Hughes AD. pp60^{c-src} increases voltage-operated calcium channels currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;217:1039-44.
376. Wijetunge S, Hughes AD. Activation of endogenous c-Src or a related tyrosine kinase by intracellular (pY) EEI peptide increases voltage-operated calcium channel currents in rabbit ear artery cells. *FEBS Lett* 1996;399:63-6.
377. Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon MI. Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1991;88:10049-53.

378. Winder SJ, Walsh MP. Smooth muscle calponin: inhibition of actomyosin MgATPase dans regulation by phosphorylation. J.Biol.Chem. 1990;265:10148-55.
379. Winder SJ, Walsh MP. Structural and functional characterization of calponin fragments. Biochem. Int. 1990b;22:335-41.
380. Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouyssegur J, Bourne HR. Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. Nature 1991;351:63-5.
381. Worley JF, Quayle JM, Standen NB, Nelson MT. Regulation of single calcium channels in cerebral arteries by voltage, serotonin, and dihydropyridines. Am.J.Physiol. 1991;261:H1951-H1960
382. Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. J.Biol.Chem. 1992;267:25798-802.
383. Xiong Z, Burnette E, Cheung DW. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺

- channel activity by tyrosine kinase inhibitors in vascular smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.* 1995;290:117-23.
384. Xu L, Lai FA, Cohn A, Etter E, Guerrero A, Fay FS, Meissner G. Evidence for a Ca^{2+} -gated ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channel in visceral smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1994;91:3294-8.
385. Xuan YT, Wang OL, Whorton AR. Role of protein kinase C (PKC) in mediating Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1992;311:427-8.
386. Yaish P, Gazit A, Gilon C, Levitzki A. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 1988;242:933-5.
387. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
388. Yang J, Jan YN, Jan LY. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* 1995;15:1441-7.
389. Yang SG, Saifeddine M, Hollenberg MD. Tyrosine kinase inhibitors and

the contractile action of epidermal growth factor-urogastrone and other agonists in gastric smooth muscle. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1992;70:85-93.

390. Yang SG, Saifeddine M, Laniyonu A, Hollenberg MD. Distinct signal transduction pathways for angiotensin-II in guinea pig gastric smooth muscle: differential blockade by indomethacin and tyrosine kinase inhibitors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1993;264:958-66.
391. Yatani A, Hamm H, Codina J, Mazzoni MR, Birnbaumer L, Brown AM. A monoclonal antibody of the α subunit of G_k blocks muscarinic activation of atrial K^+ channels. *Science* 1988;241:828-31.
392. Yatani A, Seidel CL, Allen J, Brown AM. Whole-cell and single-channel calcium currents of isolated smooth muscle cells from saphenous vein. *Circ.Res.* 1987;60:523-33.
393. Young GP, Young JD, Deshpande AK, Goldstein M, Koide SS, Cohn ZA. A Ca^{2+} -activated channel from *Xenopus laevis* oocyte membranes reconstituted into planar bilayers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1984;81:5155-9.

394. Zachary I. Focal adhesion kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997;29:929-34.
395. Zachary I, Gil J, Lehmann W, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1988;88:4577-81.
396. Zachary I, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Stimulation of tyrosine kinase activity in anti-phosphotyrosine immune complexes of swiss 3t3 cell lysates occurs rapidly after addition of bombesin, vasopressin, and endothelin to intact cells. *J.Biol.Chem.* 1991;266:24126-33.
397. Zelcer E, Sperelakis N. Angiotensin induction of active responses in cultured reagggregates of rat aortic smooth muscle cells. *Blood Vessels* 1981;18:263-79.
398. Zhang C, Paul RJ, Kranias EG. Calmodulin stimulation of smooth muscle plasmalemmal vesicle Ca^{2+} uptake: Direct or indirect effect. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1992;263:H366-H371.
399. Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned

- neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 1993;32:1075-88.
400. Zhang ZD, Kwan CY, Daniel EE. Subcellular-membrane characterization of [3H]ryanodine-binding sites in smooth muscle. *Biochem. J.* 1993;290:259-66.
401. Zhao XL, Gutierrez LM, Chang CF, Hosey MM. The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 1994;198:166-73.
402. Zherelova OM. Activation of chloride channels in the plasmalemma of *Nitella syncarpa* by inositol 1,4,5-trisphosphate. *FEBS Lett.* 1989;249:105-7.
403. Zschauer A, Scott-Burden T, Buhler FR, Van Breemen C. Vasopressor peptides and depolarization stimulated Ca^{2+} -entry into cultured vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 1987;148:225-31.
404. Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs

and disease states. *Pharmacol.Rev.* 1997;49:1-51.

Annexe I

Précisions sur les analyses statistiques

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent la réponse contractile d'anneaux artériels isolés à des doses croissantes de vasoconstricteurs. Afin d'évaluer la contribution de certains mécanismes de la réponse contractile, des anneaux artériels traités préalablement avec différents agents pharmacologiques étaient comparés avec des anneaux n'ayant reçu aucun traitement. Les courbes dose-actions obtenues par l'ajout de doses croissantes d'un agoniste ont une forme sigmoïdale lorsqu'on exprime la concentration de l'agoniste sur une échelle logarithmique. La façon mathématique la plus simple de décrire individuellement ces courbes action-doses implique l'utilisation d'un modèle de régression logistique de la forme $Y = a - d / (1 + (x/c)^b) + d$ où Y est la réponse, X est la dose d'agoniste, a est la réponse lorsque Y=0, b est un facteur de pente, c est la réponse à mi-chemin entre a et d et finalement où d est la réponse à une concentration infinie d'agoniste. De Léan *et al.*(71) ont développé une méthode permettant l'analyse simultanée de plusieurs courbes action-doses. Ainsi cette méthode permet de comparer les différents paramètres de courbes action-doses soit les réponses minimales, maximales, les concentrations effectives à 50% (EC_{50}) ainsi que les facteurs de pentes. En effet, en contraignant par exemple l'égalité des réponses maximales de deux artères, on déplace les courbes de leur modèle non-linéaire

idéal jusqu'à obtenir une dérogation statistiquement significative indiquant une différence entre les effets maximaux. Nous avons utilisé un logiciel statistique (Allfit for Windows, Charles and André De Léan, Université de Montréal) afin d'appliquer cette méthode de comparaison de courbes.

L'analyse par régression non-linéaire ne nous permettait pas d'étudier l'additivité ou l'interaction entre les différents traitements.

Pour ce faire, des analyses de variance ont été

effectuées principalement sur les réponses maximales (aussi sur les EC_{50} , chapitre 3). Ainsi une analyse de variance à deux critères de classification où les critères étaient représentés par deux traitements (inhibiteurs) différents dans lesquels on retrouve deux niveaux soit absence ou présence de traitement pharmacologique. Le résultat statistique de l'effet de chacun des inhibiteurs a peu de signification en soi puisqu'il ne tient pas compte du design expérimental complet. Par contre, le

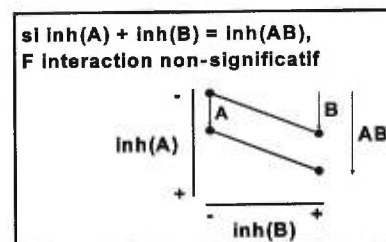


Figure AI.1: Schéma explicatif de l'analyse d'interaction entre deux traitements pharmacologiques.

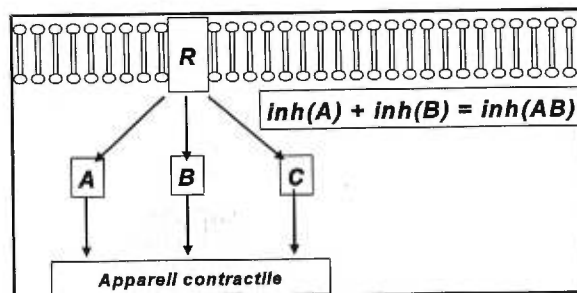


Figure AI.2: Schéma démontrant des voies de signalisation indépendantes.

résultat de l'interaction entre les deux traitements permet d'appuyer les observations faites sur la relation entre les deux mécanismes visés par les inhibiteurs. Ainsi, une interaction non-significative entre les deux traitements suggère deux mécanismes contribuant de façon

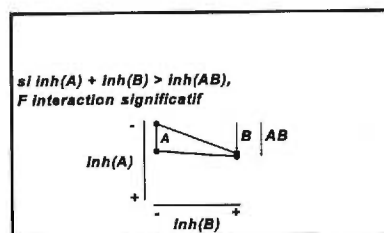


Figure AI.3: Schéma explicatif de l'analyse d'interaction entre deux traitements pharmacologiques.

indépendante et donc additive à la contraction (Figures AI.1 et AI.2). Par contre, une interaction significative entre les deux traitements suggère une relation étroite entre les deux traitements et donc entre les deux mécanismes visés par ces traitements lors de la contraction (Figures AI.3 et AI.4).

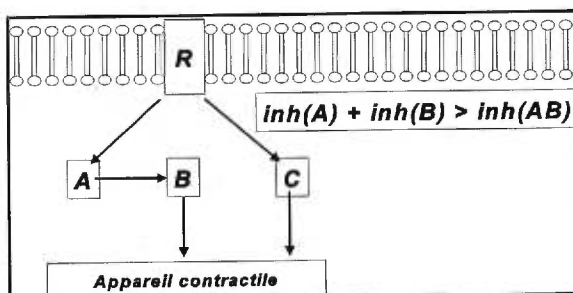


Figure AI.4: Schéma démontrant des voies de signalisation non-indépendantes.

Annexe II

Curriculum vitae

Articles originaux:

Jean-François Bouchard, Eric Dumont and Daniel Lamontagne. Evidence that prostaglandins I₂, E₂ and D₂ may activate ATP sensitive potassium channels in the isolated rat heart. *Cardiovascular Research*, June 1994, Vol.28, No.6, pages 901-905.

Eric Dumont and Daniel Lamontagne. No role of ATP sensitive potassium channels in the vasoconstriction produced by vasopressin. *Journal of Vascular Research* 1995; 32: 138-142.

Eric C. Dumont, Chantal Lambert and Daniel Lamontagne. Modification of aortic contractility in the cardiomyopathic hamster. *British Journal of Pharmacology* (1996) 118, 1141-1146.

Eric C. Dumont, Sarra Rafrafi, Sylvie Laforet and Guy Drolet. Implication of the central AT1 and AT2 angiotensin receptors in the chronic adaptation to stress. *Neuroscience*, August 1999, 93(3), 877-884.

Articles de revue:

J.F.Bouchard, E.C.Dumont et D.Lamontagne. Diminution de la réponse vasculaire à l'iloprost chez le rat diabétique. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. Tome 90, n^o8, août 1997.

É.C. Dumont et Guy Drolet. De la relation entre le stress, l'angiotensine II et l'hypertension artérielle. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, août 1999. Sous presse.

Articles soumis ou en révision:

Eric C. Dumont and Daniel Lamontagne. Pharmacological study of the interaction between tyrosine kinases and L-type calcium channels in the rat aorta. *Pharmacology*.

Eric C. Dumont and Daniel Lamontagne. Pharmacological study of the interaction between tyrosine kinases and chloride channels in the contractile response of rat aorta. *Fundamental and clinical pharmacology*.

Jean-François Bouchard, Eric C. Dumont and Daniel Lamontagne. Modification of vasodilator response in streptozotocin-induced diabetic rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.

A.Cabassi, J.-F. Bouchard, E.C. Dumont, H. Girouard, M. Le Jossec, D.Lamontagne, J.G. Besner, J.de Champlain. Effect of antioxidant treatments on nitrate tolerance development in normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*.

A.Cabassi, E.C.Dumont, J.-F. Bouchard, H. Girouard, M. Le Jossec, D.Lamontagne, J.G.Besner, J.de Champlain. Role of oxidative stress in nitrate tolerance in experimental hypertension. *Free Radicals Biological Medicine*.

Abrégés:

Jean-François Bouchard, Eric Dumont and Daniel Lamontagne. Activation of ATP sensitive potassium channels by PGI₂, PGE₂ and PGD₂ in the coronary vascular bed of rat. *Revue Canadienne de Physiologie et Pharmacologie*. Vol. 72, supplément 1, 1994, p.166.

Eric Dumont and Daniel Lamontagne. No role of ATP sensitive potassium channels in the vasoconstriction produced by vasopressin. *Revue Canadienne de Physiologie et Pharmacologie*. Vol.72, supplément 1, 1994, p.166.

Daniel Lamontagne, Eric Dumont, Chantal Lambert. Étude de la réponse fonctionnelle vasculaire chez le hamster cardiomyopathique. *Médecine Sciences*. Vol.11, supplément 2, 1995.

Esther Millette, Eric Dumont and Daniel Lamontagne. Tachyphylaxis to vasopressin: endothelium-dependent and nitric oxide mediated. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Vol.27, No.6, Juin 1995, p.A.101.

Eric C. Dumont, Chantal Lambert and Daniel Lamontagne. Increased contractility in aortas of cardiomyopathic hamsters. *The FASEB Journal*. Vol.10, No.3, March 8, 1996.

J.F. Bouchard, E.C. Dumont and Daniel Lamontagne. Changes in vascular reactivity in aorta and coronary resistance arteries of diabetic rats. *Journal of Vascular Research*, Vol.33, s2, 1996.

Eric C. Dumont, Jean-François Bouchard and Daniel Lamontagne. Diminution de la réponse contractile de l'aorte de rat diabétique. *Archives des maladies du cœur*

et des vaisseaux. Tome 89, décembre 1996, P31.

Jean-François Bouchard, Eric C. Dumont and Daniel Lamontagne. Diminution de la réponse vasculaire à l'iloprost chez le rat diabétique. *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux*. Tome 89, décembre 1996, P9.

Eric C. Dumont and Daniel Lamontagne. Pharmacological evidences that tyrosine kinases contribute to vasopressin- and angiotensin II-induced constrictions of rat aortas through modulation of L-type calcium channels. *Circulation*. Volume 96, Number 8, 1997.

Eric C. Dumont et Daniel Lamontagne. Les tyrosines kinases contribuent à la contraction de l'aorte thoracique de rat via la modulation de l'activité des canaux calciques de type L. *Médecine Sciences*. Vol. 13, supplément 2, 1997.

E.C. Dumont and Daniel Lamontagne. Interaction between chloride channels and tyrosine kinases in aorta. *Journal of Molecular and cellular cardiology*. Vol. 30, May 1998, A189.

Aderville Cabassi, Jean-François Bouchard, Eric C. Dumont, Daniel Lamontagne, Jean-Guy Besner, Jacques de Champlain. Oxygen free radicals and coronary vascular dysfunction in hypertension. *Journal of Molecular and cellular cardiology*. Vol. 30, May 1998, A165.

A. Cabassi, E.C. Dumont, J.-F. Bouchard, H. Girouard, M. Le Jossec, D. Lamontagne, J.-G. Besner, J. de Champlain. Diversified N-Acetylcysteine effects against free radicals-induced vascular injury in normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertension* 17(suppl.3), May 1999, page S92.

E.C. Dumont, S. Rafrafi and G. Drolet. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Society for Neuroscience*, Vol. 24, Part. 2, 1998, p.1377.

E.C. Dumont, R. Kinkead, S. Laforest and Guy Drolet. Activation of enkephalinergic neurons in th paraventricular nucleus following acute or chronic psychogenic stress exposure. *Society for Neuroscience*, October 1999.

Bourses:

Bourse de 2e cycle du GRSNA

Bourse de 3e cycle du FRSQ, Subventions d'équipes pharmacologie-pharmaceutique

Bourse de doctorat du FCAR, programme FCAR-FRSQ-Santé-Doctorat Gr.4

Bourse d'excellence de l'Université de Montréal

Bourse d'excellence de l'Université de Montréal, Succession Aimé Roussin

Bourse post-doctorale du Centre de recherche facultaire en neurobiologie de l'Université Laval

Bourse post-doctorale du CRSNG

Bourse post-doctorale du CRM, programme CRM-SCHH (Déclinée en faveur CRSNG)