

Université de Montréal

**Implication des facteurs endothéliaux dans la tachyphylaxie à la vasopressine  
des aortes de rats**

par  
Christine Hamel

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc)  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

Novembre 2003

© Christine Hamel, 2003



QV

705

U58

2004

v.004

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Implication des facteurs endothéliaux dans la tachyphylaxie à la vasopressine  
des aortes de rats**

présenté par :  
Christine Hamel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

---

Nobuharu Yamaguchi, Président-rapporteur

---

Daniel Lamontagne, Directeur

---

Marc Servant, Membre du jury

## Sommaire

Une tachyphylaxie endothélium-dépendante à la [Arg]<sup>8</sup>-vasopressine (AVP) ayant été observée antérieurement dans le laboratoire du Dr Lamontagne, le but du présent projet de maîtrise était de déterminer quels étaient les facteurs endothéliaux et les mécanismes impliqués dans la tachyphylaxie à l'AVP des aortes de rats. Lors des expérimentations effectuées, il fut possible d'observer que le monoxyde d'azote (NO) était le médiateur principal de la désensibilisation à l'AVP tant au niveau d'anneaux aortiques dont l'endothélium était intact (E+) qu'au niveau d'anneaux dénudés de leur endothélium (E-), tandis que les prostaglandines et les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) ne contribuaient que faiblement à ce phénomène chez les E+, puisqu'une inhibition simultanée de ces deux familles de molécules était nécessaire à l'observation d'un tel effet. Nous avons également observé que parmi les canaux potassiques présents au niveau de l'aorte de rats, seuls les canaux potassiques dépendants du voltage (K<sub>v</sub>) étaient impliqués dans la tachyphylaxie à l'AVP, ceci chez les E- seulement. L'inhibition de la synthèse de NO diminuant la tachyphylaxie chez les E-, nous avons démontré la présence d'une NO synthétase neuronale constitutive au niveau du muscle lisse vasculaire aortique de rats pouvant expliquer ces résultats. Finalement, nous avons observé que la protéine kinase C (PKC) était impliquée dans la tachyphylaxie à l'AVP chez les E- seulement, le NO semblant diminuer les effets de cette kinase.

*Mots-clés : vasopressine, tachyphylaxie, endothélium, monoxyde d'azote, prostaglandines, acides époxyeicosatriénoïques, protéine kinase C, aorte, rat*

## Summary

Endothelium-dependent tachyphylaxis to [Arg]<sup>8</sup>-vasopressin (AVP) was observed in a previous study made by our laboratory. The objectives of the present project were thus to determine endothelial factors and mechanisms implicated in tachyphylaxis to AVP in rat aortic rings. Experiments made showed that nitric oxide (NO) was the major mediator of desensitization to AVP in both endothelium-intact rings (E+) and endothelium-denuded rings (E-), while prostaglandins and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) contributed only weakly to this phenomenon. In fact, concomitant inhibition of those two families of molecules was needed for an effect to be observed. Among potassium channels present in rat aorta, only voltage-dependent potassium channels (K<sub>v</sub>) had a role in tachyphylaxis to AVP, solely in E- rings. Because NO inhibition yielded a reduction in desensitization in E- rings, we searched for a NO synthase (NOS) isoform in vascular smooth muscle cells and demonstrated the presence of a constitutive neuronal NOS in those cells which could explain the results obtained. Finally, we report that protein kinase C (PKC) contributes to tachyphylaxis to AVP in E- rings only, NO seemingly diminishing the effects of this kinase.

*Keywords : vasopressin, tachyphylaxis, endothelium, NO, prostaglandins, epoxyeicosatrienoic acids, protein kinase C, aorta, rat*

## Table des matières

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1. Préambule.....	2
2. Désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	3
2.1. Définitions.....	3
2.2. Mécanismes de désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	4
2.2.1. Protéines kinases liées aux protéines G et arrestines.....	4
2.2.2. Protéines kinases activées par les seconds messagers.....	6
2.2.3. Palmitoylation/dépalmitoylation des récepteurs.....	7
2.3. Mécanismes de resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	8
3. Vasopressine.....	8
3.1. Synthèse et sécrétion de la vasopressine.....	8
3.2. Récepteurs et voies de signalisation de la vasopressine.....	11
3.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques de la vasopressine.....	17
3.4. Mécanismes de tachyphylaxie à la vasopressine.....	20
4. Protéine kinase C.....	22
4.1. Familles de protéines kinases C et mode d'activation des différentes isoformes.....	22
4.2. Localisation des protéines kinases C.....	25
4.3. Substrats des protéines kinases C.....	26
4.4. Activateurs et inhibiteurs pharmacologiques des protéines kinases C.....	27
5. Facteurs endothéliaux.....	29
5.1. Monoxyde d'azote.....	29
5.1.1. Synthèse du monoxyde d'azote.....	30
5.1.2. Mécanismes d'action du monoxyde d'azote.....	37
5.1.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques du monoxyde d'azote.....	40

5.2. Prostaglandines.....	42
5.2.1. Synthèse des prostaglandines.....	42
5.2.2. Récepteurs et voies de signalisation des prostaglandines.....	45
5.2.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques des prostaglandines.....	45
5.3. Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium.....	47
5.3.1. Canaux potassiques présents au niveau du muscle lisse vasculaire.....	47
5.3.2. Effets du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium.....	49
5.3.3. Hypothèses possibles pour le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium.....	49
5.3.3.1. Acides époxyeicosatriénoïques.....	50
5.3.3.2. Jonctions intercellulaires.....	50
5.3.3.3. Ions potassiques.....	51
5.3.3.4. Cannabinoïdes.....	51
5.4. Acides époxyeicosatriénoïques.....	54
5.4.1. Synthèse des acides époxyeicosatriénoïques.....	54
5.4.2. Voies de signalisation des acides époxyeicosatriénoïques.....	54
5.4.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques des acides époxyeicosatriénoïques.....	55
6. Interactions entre les facteurs endothéliaux.....	56
7. Buts du travail.....	58

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	59
1. Animaux et modèle expérimental.....	60
2. Protocoles.....	63
2.1. Optimisation du protocole de tachyphylaxie à la vasopressine.....	63
2.2. Protocole de tachyphylaxie à la vasopressine.....	63
2.3. Protocole d'activation de la protéine kinase C.....	66
3. Détection de l'expression protéique des NO synthétases inductible et neuronale.....	67
3.1. Injection de lipopolysaccharides bactériens.....	67
3.2. Précipitation par affinité et immunobuvardage des NO synthétases inductible et neuronale.....	67
4. Produits.....	69
5. Méthodes d'analyse des résultats.....	70
6. Analyse statistique.....	70
 CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	 71
1. Effets de différentes durées d'exposition à la vasopressine et de différents intervalles de récupération.....	72
2. Contribution des cannabinoïdes à la tachyphylaxie à la vasopressine.....	74
3. Contribution des prostaglandines et des acides époxyeicosatriénoïques à la tachyphylaxie à la vasopressine en présence de NO.....	75
4. Contribution des prostaglandines et des acides époxyeicosatriénoïques à la tachyphylaxie à la vasopressine en absence de NO.....	76
5. Contribution des canaux potassiques à la tachyphylaxie à la vasopressine....	77
6. Contribution des NO synthétases neuronale et inductible à la tachyphylaxie à la vasopressine.....	78
7. Expression protéique des NO synthétases inductible et neuronale au niveau du muscle lisse vasculaire aortique de rat.....	80
8. Contribution de la protéine kinase C à la tachyphylaxie à la vasopressine....	82

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS.....	86
1. Discussion.....	87
1.1. Cinétique de désensibilisation et de resensibilisation du récepteur V <sub>1a</sub> à la vasopressine.....	88
1.2. Désensibilisation croisée AVP-phényléphrine.....	89
1.3. Rôle des cannabinoïdes dans la tachyphylaxie à l'AVP.....	90
1.4. Rôle du NO dans la tachyphylaxie à l'AVP.....	91
1.5. Rôle des prostaglandines et des EETs dans la tachyphylaxie à l'AVP.....	92
1.6. Rôle des courants potassiques dans la tachyphylaxie à l'AVP.....	94
1.7. Production de NO au niveau du muscle lisse vasculaire.....	95
1.8. Rôle de la PKC dans la tachyphylaxie à l'AVP et interaction entre la PKC et le NO.....	97
1.9. Hypothèses.....	99
2. Conclusions générales.....	99
3. Perspectives.....	100
 BIBLIOGRAPHIE.....	 103

## Liste des figures

### CHAPITRE 1

<b>Figure 1.</b> Structure de la vasopressine.....	10
<b>Figure 2.</b> Voies de signalisation de la vasopressine.....	13,14,15,16
<b>Figure 3.</b> Structure des NO synthétases.....	33
<b>Figure 4.</b> Synthèse des prostaglandines et des EETs.....	44
<b>Figure 5.</b> Candidats potentiels pour le rôle d'EDHF.....	53
<b>Figure 6.</b> Interactions entre les facteurs endothéliaux.....	57

### CHAPITRE 2

<b>Figure 7.</b> Modèle des aortes isolées.....	62
<b>Figure 8.</b> Protocoles pour l'évaluation de la tachyphylaxie à l'AVP.....	65, 66

### CHAPITRE 3

<b>Figure 9.</b> Effets de différentes durées d'exposition à l'AVP et de différents intervalles de récupération sur la tachyphylaxie à l'AVP.....	73, 74
<b>Figure 10.</b> Contribution des NO synthétases inductible et neuronale à la tachyphylaxie à l'AVP.....	79
<b>Figure 11.</b> Expression protéique de la iNOS et de la nNOS au niveau du muscle lisse vasculaire aortique de rat.....	81
<b>Figure 12.</b> Contribution de la PKC à la tachyphylaxie à l'AVP en présence et en absence de NO.....	84,85

### CHAPITRE 4

<b>Figure 13.</b> Hypothèses concernant la tachyphylaxie différentielle chez les E+ et les E-.....	101, 102
--	----------

## Liste des tableaux

### CHAPITRE 1

<b>Tableau I.</b> Substrats des différentes isoformes de PKC.....	27
<b>Tableau II.</b> Activateurs et inhibiteurs pharmacologiques des différentes isoformes de PKC.....	28
<b>Tableau III.</b> Inhibiteurs des NO synthétases.....	36
<b>Tableau IV.</b> Bloqueurs des canaux potassiques.....	48

### CHAPITRE 3

<b>Tableau V.</b> Contribution des cannabinoïdes à la tachyphylaxie à l'AVP.....	75
<b>Tableau VI.</b> Contribution des prostaglandines et des EETs à la tachyphylaxie à l'AVP en présence et en absence de NO.....	76
<b>Tableau VII.</b> Contribution des canaux potassiques à la tachyphylaxie à l'AVP.....	77
<b>Tableau VIII.</b> Contribution de la PKC à la tachyphylaxie à l'AVP en présence et en absence de NO.....	82

## Liste des sigles et abréviations

1,3 PB-ITU :	S,S'-(1,3-phénylène-bis(1,2-ethanediyl))bis-isothiourée
1400W :	N-(3-aminoéthyl)benzyl)-acétamidine
2-AG :	2-arachidonylglycérol
4-AP :	4-aminopyridine
AA :	acide arachidonique
ACh :	acétylcholine
ACTH :	hormone adrénocorticotrope ( <i>adrenocorticotrophic hormone</i> )
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADP :	adénosine diphosphate
AKAP :	<i>A-Kinase anchoring protein</i>
AMPc :	adénosine 3',5' monophosphate cyclique
AMT :	(±)-2-amino-5,6-dihydro-6-méthyl-4H-1,3-thiazine
AngII :	angiotensine II
ANOVA :	analyse de variance
AQP :	aquaporine
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine triphosphate
AVP :	[Arg] <sup>8</sup> -vasopressine
β-ARK :	<i>β-adrenergic related kinase</i>
BCA :	acide bicinchonique
BH <sub>4</sub> :	tétrahydrobioptérine
Bis I :	bisindolylmaléimide I
BK <sub>ca</sub> :	canal potassique dépendant du calcium de haute conductance
Ca <sup>2+</sup> :	calcium
CaCl <sub>2</sub> :	chlorure de calcium
CaM :	calmoduline
CAT :	<i>cationic amino acid transporter</i>

CO <sub>2</sub> :	dioxyde de carbone
COX :	cyclo-oxygénase
CYP :	cytochrome P-450
DAG :	diacylglycérol
DiHETEs :	acides dihydroépoxyeicosatriénoïques
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DP :	récepteur de la prostaglandine D <sub>2</sub>
DTT :	dithiothréitol
E+ :	anneau aortique dont l'endothélium est intact
E- :	anneau aortique dont l'endothélium a été détruit
EDHF :	<i>endothelium derived hyperpolarizing factor</i>
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
EETs :	acides époxyeicosatriénoïques
Egr-1 :	<i>early growth-response-1</i>
EGTA :	acide éthylène glycol-bis[β-aminoéthyl éther]-N,N,N'.N'- tétraacétique
EnaC :	canal sodique épithélial
eNOS :	NO synthétase endothéliale
EP :	récepteur de la prostaglandine E <sub>2</sub>
ERK :	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FAD :	flavine adénine dinucléotide
FMN :	flavine mononucléotide
FP :	récepteur pour la prostaglandine F <sub>2α</sub>
GF109203X :	3-[1-[3-(Diméthylamino)propyl]-1H-indol-3-yl]-4-(1H- indol-2-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
GMPC :	guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
Gö 6976 :	5,6,7,13-tétrahydro-13-méthyl-5-oxo-12H-indolol[2,3- alpyrrolol[3,4-c]carbazole-12-propanenitrile]
Gö 6983 :	2-[1-(3-Diméthylaminopropyl)-5-méthoxyindol-3-yl]-3- (1H-indol-3-yl)maléimide
GRKs :	kinases reliées aux protéines G ( <i>G-related kinases</i> )

GSK-3 $\beta$ :	glycogène synthétase kinase-3 $\beta$
Hsp :	protéine de choc thermique ( <i>heat shock protein</i> )
IFN :	interféron
IGF :	somatomédine ( <i>Insuline-like growth factor</i> )
IgG :	immunoglobuline de type G
IK <sub>Ca</sub> :	canal potassique dépendant du calcium de conductance intermédiaire
I $\kappa$ B :	inhibiteur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B
IKK :	I $\kappa$ B <i>kinase</i>
IL :	interleukine
iNOS :	NO synthétase inductible
IP :	récepteur de la prostacycline
IP <sub>3</sub> :	inositol 1,4,5-triphosphate
IRAG :	<i>IP<sub>3</sub>-associated cAMP kinase substrate</i>
JNK :	<i>c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
K <sub>ATP</sub> :	canal potassique dépendant de l'ATP
K <sub>Ca</sub> :	canal potassique dépendant du calcium
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	phosphate de potassium
K <sub>IR</sub> :	canal potassique à rectification entrante
K <sub>V</sub> :	canal potassique dépendant du voltage
L-NAME :	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine méthyl ester
L-NMMA :	N <sup>G</sup> -monométhyl-L-arginine
L-NIL :	L-N <sup>6</sup> -(1-iminoéthyl)-lysine
L-NIO :	L-N <sup>5</sup> -(1-iminoéthyl)-ornitine
L-PA :	N <sup>ω</sup> -propyl-L-arginine
LPS :	lipopolysaccharides bactériens
L-VNIO :	L-N <sup>5</sup> -(1-imino-3-butényl)-ornitine
LVP :	[Lys] <sup>8</sup> -vasopressine
LY-333351 :	9-[(Diméthylamino)méthyl]-6,7,10,11-tétrahydro-(9S)-NH, 18H-5,21 :12,15-dimetheno-dibenzo[e,k]pyrrolo[3.4- h][1,4,13]oxadiazacyclohexadécine-18,20(19H)dione

MAPK :	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKK :	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK :	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase</i>
MBP :	<i>myelin basic protein</i>
MgSO <sub>4</sub> :	sulfate de magnésium
NaCl :	chlorure de sodium
NADPH :	forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaF :	fluorure de sodium
NaHCO <sub>3</sub> :	bicarbonate de sodium
Na/K-ATPase :	pompe sodium/potassium dépendante de l'ATP
NF-κB :	<i>nuclear factor κB</i>
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NNLA :	N <sup>Ω</sup> -nitro-L-arginine
NO :	monoxyde d'azote
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	nitrite
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	nitrate
NOS :	synthétase du monoxyde d'azote
nNOS :	NO synthétase neuronale
O <sub>2</sub> :	oxygène
OH :	radical hydroxyl
ONOO <sup>-</sup> :	peroxynitrite
PDA :	phorbol 12,13-diacétate
PDBu :	phorbol 12,14-dibutyrate
PDD :	phorbol 12,14-didécanoate
PDK-1 :	<i>phosphoinositide dependent kinase-1</i>
PEA :	palmitoléthanolamide
PDZ :	domaine SD-95/dics large/ZO-1
PGD <sub>2</sub> :	prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub> :	prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub> :	prostaglandine F <sub>2α</sub>

PGH <sub>2</sub> :	prostaglandine H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub> :	prostaglandine I <sub>2</sub> ou prostacycline
PGHS :	prostaglandine H synthétase
PGs :	prostaglandines
PIP <sub>2</sub> :	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP <sub>3</sub> :	phosphatidylinositol-3,4-5-triphosphate
PKA :	protéine kinase A (dépendante de l'AMPc)
PKC :	protéine kinase C (dépendante du calcium)
PKG :	protéine kinase G (dépendante du GMPc)
PLA <sub>2</sub> :	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC :	phospholipase C
PLD :	phospholipase D
PMA :	phorbol-12-myristate-13-acétate
PMSF :	phénylméthylsulfonylfluorure
PS :	phosphatidylsérine
RACK :	<i>Receptor of activated C-Kinase</i>
RCPGs :	récepteurs couplés aux protéines G
Ro 31-7549 :	2-[1-3(Aminopropyl)indol-3-yl]-3-yl]-3(1-méthyl-1H-indol-3-yl)maléimide
Ro 31-8220 :	2-{1-3(Amidinothio)propyl]-1H-indol-3-yl}-3(1-méthyl-1H-indol-3-yl)-maléimide
RXR :	récepteur du rétinoïde X
SDS :	sodium dodécyl sulfate
SIADH :	syndrome de sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique
SK <sub>Ca</sub> :	canal potassique dépendant du calcium de faible conductance
S-et-ITU :	S-éthylisothiourée
S-me-ITU :	S-méthylisothiourée
S-me-TC :	S-méthyl-L-thiocitrulline
SNP :	nitroprussiate de sodium

STICK :	<i>Substrate That Interact with C-kinase</i>
TBS :	tampon phosphate
TNF :	facteur de nécrose tumorale ( <i>tumor necrosis factor</i> )
TP :	récepteur du thromboxane A <sub>2</sub>
TTBS :	tampon phosphate contenant du Tween
TXA <sub>2</sub> :	thromboxane A <sub>2</sub>
UTA-1 :	transporteur-1 de l'urée
VDR :	récepteur de 1 $\alpha$ ,25-hydroxyvitamine D <sub>3</sub>

**Dédicace**

*Ce mémoire est dédié d'une part à mes parents, Jacques et Nicole et à mes sœurs, Carine et Claudie, qui m'ont toujours supporté dans mes projets, même les plus fous. Ce mémoire est également dédié à Marie-Ève, mon amie de toujours, qui m'a été d'un secours précieux depuis le plus jeune âge. Enfin, ce mémoire est dédié à ma douce moitié, Huy Hao Dao, qui m'a apporté autant au plan personnel qu'au plan scientifique.*

## Remerciements

*Je tiens à tout d'abord à remercier du fond du cœur mon directeur de recherche, le Dr Daniel Lamontagne, qui me supporte scientifiquement et est toujours disponible pour m'écouter quand le besoin se fait sentir, et ce depuis mon tout premier stage de recherche d'été en 1999. Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire présents, Philippe Lépicier, Dima Awad, Marie Lordkipanidzé et passés, Esther Millette, Jean-François Bouchard, Marie-Josée Dumoulin, Hugues Sébastien, Éric Dumont, Audrey Perreault, pour leur entrain égayant le laboratoire au quotidien. Je remercie également les étudiants et techniciennes des laboratoires de Pierre Moreau, de Marc Servant, d'Albert Adam et de Huy Ong, ainsi que les secrétaires et adjointes administratives pour leur support tant scientifique que social. Enfin, je voudrais remercier le FRSQ pour le support financier très apprécié et plus que nécessaire.*

**CHAPITRE 1**

**INTRODUCTION**

## 1. Préambule

Il arrive fréquemment que la réponse induite par la liaison d'un ligand à son récepteur diminue en intensité ou cesse complètement suite à une exposition prolongée à ce ligand. Ce phénomène, désigné désensibilisation ou tachyphylaxie, est surtout important pour les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) ou récepteurs à sept passages transmembranaires. Environ cinquante pour cent des médicaments présentement sur le marché, à l'exclusion des antibiotiques, exercent leurs effets sur des récepteurs appartenant à cette grande famille (Ross & Kenakin 2001). La désensibilisation de ces récepteurs peut en conséquence poser des problèmes cliniques importants. Par exemple, la désensibilisation des récepteurs aux opiacés oblige les médecins à faire preuve de beaucoup d'imagination. En effet, il est souvent nécessaire d'augmenter les doses de ces analgésiques ou de changer régulièrement d'agent afin de pouvoir continuer à soulager de façon efficace les patients en phase terminale d'un cancer (Kieffer & Evans 2002). Une désensibilisation physiopathologique peut de même obscurcir la compréhension d'une maladie ainsi que les régimes thérapeutiques utilisés. La désensibilisation aux catécholamines observée lors d'insuffisance cardiaque constitue le meilleur exemple de ceci. Pendant plusieurs années, l'inefficacité des bloqueurs des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques dans cette pathologie s'est avérée intrigante pour les praticiens, l'activation du système sympathique devant en théorie améliorer les fonctions cardiaques. Paradoxalement, une diminution de la morbidité et de la mortalité reliées à l'insuffisance cardiaque fut observée suite au traitement de patients à l'aide de  $\beta$ -bloqueurs. Le mécanisme à l'origine des effets bénéfiques de cette classe thérapeutique, soit le renversement de la désensibilisation du système sympathique, n'a été découvert que plusieurs années plus tard (Britow et al. 2001; Gilbert & Port 2002). Une désensibilisation prenant place à un autre niveau que les récepteurs couplés aux protéines G peut également poser problème dans certains cas.

En effet, lors du traitement de l'angine à l'aide de dérivés nitrés, la désensibilisation observée suite à une administration continue de ces agents entraîne une perte de leur efficacité, ceci contraignant les patients à suivre un traitement intermittent qui peut s'avérer beaucoup plus difficile à respecter (Abrams 2002). La désensibilisation en général, et plus particulièrement celle des récepteurs couplés aux protéines G, sont ainsi au centre de plusieurs processus physiologiques, pathologiques et thérapeutiques importants.

## **2. Désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G**

### **2.1. Définitions**

Il existe deux types de désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G. Le premier type est désigné désensibilisation homologue et dépend strictement de la présence d'un agoniste au niveau du récepteur (Bunnemann & Hosey 1999). En effet, cette désensibilisation, pouvant se produire en quelques millièmes de secondes seulement, est dans la plupart des cas secondaire à la phosphorylation du récepteur par des protéines kinases reliées aux protéines G (GRKs), qui phosphorylent spécifiquement la forme activée, ou occupée par l'agoniste, du récepteur (Freedman & Lefkowitz 1996). Des protéines kinases dépendantes des seconds messagers (protéine kinase A (PKA) ou protéine kinase C (PKC)) peuvent également induire une désensibilisation homologue des récepteurs dans quelques cas particuliers, quoique le mécanisme de cette désensibilisation demeure obscur (Freedman & Lefkowitz 1996). La deuxième forme de désensibilisation se nomme désensibilisation hétérologue, survient après plusieurs minutes et est indépendante de l'occupation du récepteur par un agoniste. Ce type de désensibilisation est principalement induit par la phosphorylation des récepteurs par des protéines kinases dépendantes des seconds messagers.

La désensibilisation hétérologue s'observe pour de faibles concentrations d'agoniste (ou lors d'un taux d'occupation faible des récepteurs), tandis que la désensibilisation homologue serait plus importante en présence de fortes concentrations d'agoniste (ou lors d'un taux d'occupation élevé des récepteurs) (Freedman & Lefkowitz 1996).

## **2.2. Mécanismes de désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G**

### **2.2.1. Protéines kinases liées aux protéines G et arrestines**

Tel que mentionné auparavant, la désensibilisation homologue des RCPGs est principalement médiée par une phosphorylation du récepteur par des kinases reliées aux protéines G (GRKs) (Freedman & Lefkowitz 1996). Les GRKs sont une famille de six sérines/thréonines kinases (GRK1 à GRK6), les membres les plus connus étant la rhodopsine kinase (GRK1) ainsi que les kinases 1 et 2 du récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -*adrénergic receptor kinase-1* :  $\beta$ -*ARK1* ou GRK2 et  $\beta$ -*adrenergic receptor kinase-2* :  $\beta$ -*ARK-2* ou GRK3) (Freedman & Lefkowitz 1996). Les sites de phosphorylation des RCPGs par les GRKs se trouvent au niveau de l'extrémité C-terminale de ceux-ci (Landry & Gies 2003). Les GRKs semblent posséder une certaine spécificité en ce qui a trait à leur distribution tissulaire et aux récepteurs qu'elles phosphorylent (Freedman & Lefkowitz 1996). Cependant, le nombre de récepteurs couplés aux protéines G dépassant largement le nombre de GRKs, ces dernières peuvent phosphoryler de multiples récepteurs. Les GRKs ne sont pas actives de manière constitutive et doivent être localisées à la membrane plasmique afin d'exercer leur effet (Bunnemann et al. 1999). Bien que le mécanisme de translocation de ces protéines n'est pas entièrement clair, il semble que la GRK1 soit isoprénylée, que les GRK4 et GRK6 soient palmitoylées, que la GRK5 soit régulée par une autophosphorylation et que les GRK2 et GRK3 nécessitent la présence de phospholipides pour être activées (Bunnemann et al. 1999).

Une phosphorylation du récepteur par les GRKs présentes au niveau de la membrane plasmique peut en elle-même atténuer la capacité de celui-ci à activer les voies de signalisation (Freedman & Lefkowitz 1996). Par contre, le rôle principal de la phosphorylation par les GRKs est de recruter des protéines d'échafaudage, les arrestines, qui peuvent également induire un découplage des RCPGs. Les arrestines possèdent des domaines de liaison aux clathrines dans leur partie C-terminale, ces domaines pouvant effectuer un découplage direct du récepteur et de la protéine G ou faciliter l'internalisation des récepteurs dans des vésicules recouvertes de clathrines (Bunnemann et al. 1999). La dynamine est une protéine motrice qui entoure le col de ces vésicules, permettant le détachement de celles-ci de la membrane plasmique suivi par leur endocytose (Bunnemann et al. 1999). Les arrestines semblent jouer un rôle important dans la resensibilisation des récepteurs. De fait, la séquestration des récepteurs dans des endosomes serait nécessaire à leur retour à l'état pré-ligand (Ferguson et al. 1998). Trois types d'internalisations sont connus jusqu'à maintenant : l'internalisation dépendante des arrestines, de la dynamine et de la clathrine, l'internalisation indépendante des arrestines mais dépendante de la dynamine et de la clathrine et l'internalisation indépendante des arrestines et de la dynamine (Bunnemann et al. 1999). Les mécanismes et les implications de ces différentes formes d'internalisation demeurent inconnues à ce jour (Bunnemann et al. 1999). Il est à noter qu'en plus de leur rôle dans la désensibilisation des RCPGs, les arrestines participent aux voies de signalisation de ceux-ci (McDonald & Lefkowitz 2001). En effet, les arrestines réguleraient les membres de deux familles de protéines kinases activées par les mitogènes (*mitogen activated protein kinase*, MAPK), soit les kinases régulées par des signaux extracellulaires (*extracellular signal regulated kinases*, ERK 1 et ERK 2) et la kinase c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK3) (McDonald & Lefkowitz 2001). Les arrestines, en tant que protéines d'échafaudage, participent à l'assemblage de complexes protéiques au niveau de la membrane plasmique en recrutant plusieurs protéines, dont c-src, Shc, Grb2, Gab1 et Sos (McDonald & Lefkowitz 2001).

La formation de ce complexe entraîne l'activation de la petite protéine G Ras, provoquant à son tour l'activation de ERK suite à sa phosphorylation par la MAPK kinase (MAPKK) MEK1, étant elle-même phosphorylée par la MAPKK kinase (MAPKKK) Raf-1 (McDonald & Lefkowitz 2001). De manière similaire, la  $\beta$ -arrestine2 agit en tant que molécule d'échafaudage permettant à JNK3 d'être activée suite à sa phosphorylation par la cascade de MAPK (McDonald & Lefkowitz 2001).

### **2.2.2. Protéines kinases activées par les seconds messagers**

Les kinases activées par les seconds messagers jouent un rôle tant dans la désensibilisation homologue que dans la désensibilisation hétérologue des récepteurs couplés aux protéines G, leur rôle dans cette dernière forme de désensibilisation étant mieux connu, et ce depuis plus longtemps. La PKA et la PKC peuvent phosphoryler directement les récepteurs à sept passages transmembranaires, que ceux-ci soient liés à un agoniste ou non, entraînant ainsi la désensibilisation, le plus souvent hétérologue, des récepteurs (Chuang et al. 1996). Les kinases dépendantes des seconds messagers pourraient également participer à la désensibilisation homologue des RCPGs, soit par une phosphorylation directe du récepteur, soit par une modulation de l'activité des GRKs (Bunnemann & Hosey 1999; Tobin 1997). La phosphorylation directe des RCPGs par les kinases dépendantes des seconds messagers a cependant lieu à des sites différents de la phosphorylation par les GRKs. La régulation des GRKs par la PKA et la PKC est majoritairement attribuable à une phosphorylation. Toutefois, l'expression de l'ARNm de certaines arrestines peut également être modulée par ces kinases (Chuang et al. 1996). La PKA et la PKC semblent donc jouer un rôle primordial dans la désensibilisation des RCPGs, que cette désensibilisation soit homologue ou hétérologue.

### 2.2.3. Palmitoylation/dépalmitoylation des récepteurs

L'acylation des protéines par des acides gras peut prendre la forme d'une palmitoylation, d'une myristoylation ou d'une prénylation (Morello & Bouvier 1996). Il existe deux types de palmitoylation, soit la S-palmitoylation et la N-palmitoylation (Linder & Deschesnes 2003). La S-palmitoylation consiste en une addition réversible d'un groupement palmitate ou d'autres acides gras à chaîne longue à un résidu cystéine d'une protéine à l'aide d'un lien thioester (Linder & Deschesnes 2003). La N-palmitoylation consiste quant à elle en l'ajout d'un palmitate en N-terminal d'une protéine à l'aide d'un lien amide, cette palmitoylation pouvant être effectuée sur une cystéine ou une glycine (Linder & Deschesnes 2003). Les types de protéines pouvant subir une palmitoylation sont très variés (Linder & Deschesnes 2003). De fait, certains RCPGs, les petites protéines G de la famille Ras, la NO synthase endothéliale (eNOS), la sous-unité  $\alpha$  des protéines G, des protéines mitochondriales ainsi que des protéines virales peuvent être palmitoylés (Linder & Deschesnes 2003). Il existe présentement une controverse concernant le statut spontané ou régulé de la palmitoylation. Néanmoins, des palmitoylthioestérases ayant été identifiées, il est généralement admis que la dépalmitoylation est un phénomène enzymatique (Linder & Deschesnes 2003; Qanbar & Bouvier 2003). La palmitoylation des protéines est impliquée dans une immense variété de phénomènes, la résultante de cette modification post-traductionnelle dépendant de la cible (Linder & Deschesnes 2003). La palmitoylation contribue fréquemment à la localisation d'une protéine à la membrane plasmique, en augmentant l'hydrophobicité de celle-ci ou de certains de ses domaines (Linder & Deschesnes 2003). La palmitoylation joue également un rôle important dans le transport subcellulaire de protéines entre les organelles et à l'intérieur de certains microdomaines des membranes, dans la modulation de certaines interactions entre les protéines, ainsi que dans la désensibilisation de certains récepteurs (Linder & Deschesnes 2003; Qanbar & Bouvier 2003). La palmitoylation d'un récepteur peut accentuer ou diminuer la désensibilisation, selon le récepteur en question.

Le site de palmitoylation au niveau des RCPGs se situant dans le domaine cytoplasmique situé après la septième hélice transmembranaire, ceci peut diminuer ou augmenter la phosphorylation des RCPGs en masquant ou en rendant plus accessible certains sites de phosphorylation par les GRKs ou par les kinases dépendantes des seconds messagers, respectivement (Linder & Deschesnes 2003; Qanbar & Bouvier 2003).

### **2.3. Mécanismes de resensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G**

L'internalisation et la séquestration des récepteurs couplés aux protéines G semble être un phénomène important pour la resensibilisation de ceux-ci (Qanbar & Bouvier 2003). Les arrestines représentent un élément crucial de cette resensibilisation des récepteurs, que ceux-ci aient été phosphorylés par des GRKs ou par des kinases dépendantes des seconds messagers (Ferguson et al. 1998). Suite à l'internalisation des récepteurs dans des endosomes par les arrestines, le contact avec un milieu acide et la possibilité d'un changement de conformation favorisent la déphosphorylation de ces protéines par une ou des phosphatases (Bunnemann et al. 1999; Bowen-Pidgeon et al. 2001). Après cette déphosphorylation, le récepteur peut être recyclé à la membrane par une voie inconnue jusqu'à maintenant (Bunnemann et al. 1999). La désensibilisation des récepteurs est ainsi une étape cruciale à la resensibilisation de ceux-ci.

## **3. Vasopressine**

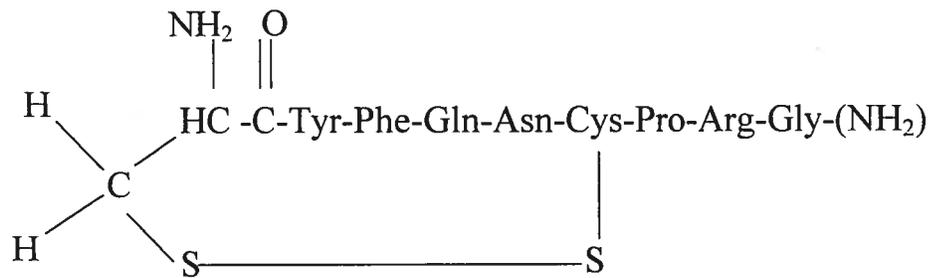
### **3.1. Synthèse et sécrétion de la vasopressine**

La vasopressine, aussi communément appelée hormone antidiurétique, est un peptide de neuf acides aminés synthétisé dans les noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus, sous forme d'un précurseur protéique inactif (préprohormone) (Bisset & Chowdrey 1988; Clauser 2000).

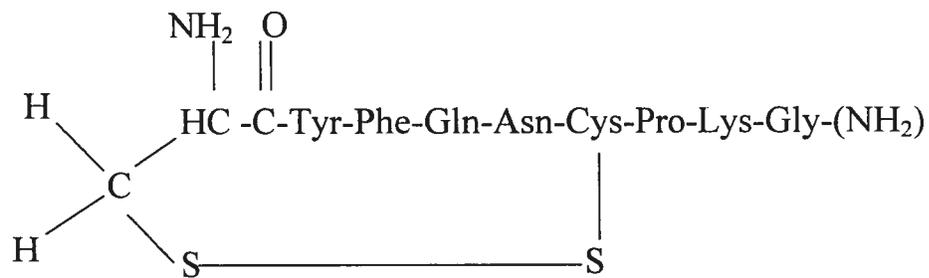
Ce précurseur est par la suite entreposé dans l'hypophyse postérieure, ou neurohypophyse, et suite au clivage du peptide signal, la pro-hormone résultante de 166 acides aminés est scindée en vasopressine et en neurophysine par une pro-hormone convertase (Clauser 2000). La vasopressine et la neurophysine sont subséquentement localisées dans des vésicules de sécrétion présentes au niveau des axones des neurones hypothalamiques situés dans la neurohypophyse, ceci permettant leur libération rapide lors d'un stimulus approprié (Clauser 2000). Outre l'hypothalamus, l'AVP est synthétisée au niveau des ovaires, du thymus, des testicules, de la médullaire surrénale, du placenta, de certains vaisseaux sanguins et carcinomes pulmonaires (Morel et al. 1993). Il existe deux formes de vasopressine, celles-ci différant seulement d'un acide aminé en position huit. La [Arg<sup>8</sup>]-vasopressine est synthétisée chez la plupart des mammifères et chez l'être humain, tandis que la [Lys<sup>8</sup>]-vasopressine est produite principalement chez le porc (Jackson 2001) (figure 1, page 10). Les principaux stimuli entraînant la libération de vasopressine sont une augmentation de l'osmolalité plasmatique, ainsi qu'une diminution du volume sanguin ou de la pression artérielle (Bisset & Chowdrey 1988). La sécrétion de vasopressine peut également être stimulée par certains agents pharmacologiques, le stress, la douleur, les nausées et les vomissements (Reid 1994). L'hyperosmolalité plasmatique représente un stimulus beaucoup plus puissant de la libération de vasopressine que l'hypovolémie ou l'hypotension (Bankir 2001). La sécrétion d'AVP est inhibée sous un certain niveau seuil d'osmolalité plasmatique, soit environ 280 mOsm/L (Jackson 2001). Lorsque ce seuil est atteint, la concentration plasmatique de vasopressine est directement proportionnelle à l'osmolalité tandis que la libération d'AVP secondaire à un changement de volume ou de pression est exponentielle (Bankir 2001). L'hypovolémie et l'hypotension diminuent le seuil et la pente de la relation osmolalité plasmatique-concentration d'AVP (Jackson 2001). La valeur seuil d'osmolalité plasmatique stimulant la soif est légèrement supérieure à celle stimulant la relâche de vasopressine, ceci permettant une augmentation de la réabsorption d'eau par le rein avant l'apparition de soif intense (Bankir 2001).

En conditions normales, la concentration plasmatique de vasopressine chez l'êre humain est de 1 à 5 pg/ml, cette concentration doublant ou triplant lors de déshydratation (Johnston 1985). Ces concentrations sont de beaucoup inférieures à la concentration nécessaire pour augmenter la pression artérielle, soit 100 pg/ml (Johnston 1985).

**Figure 1.** Structure de la vasopressine



[Arg<sup>8</sup>]-vasopressine



[Lys<sup>8</sup>]-vasopressine

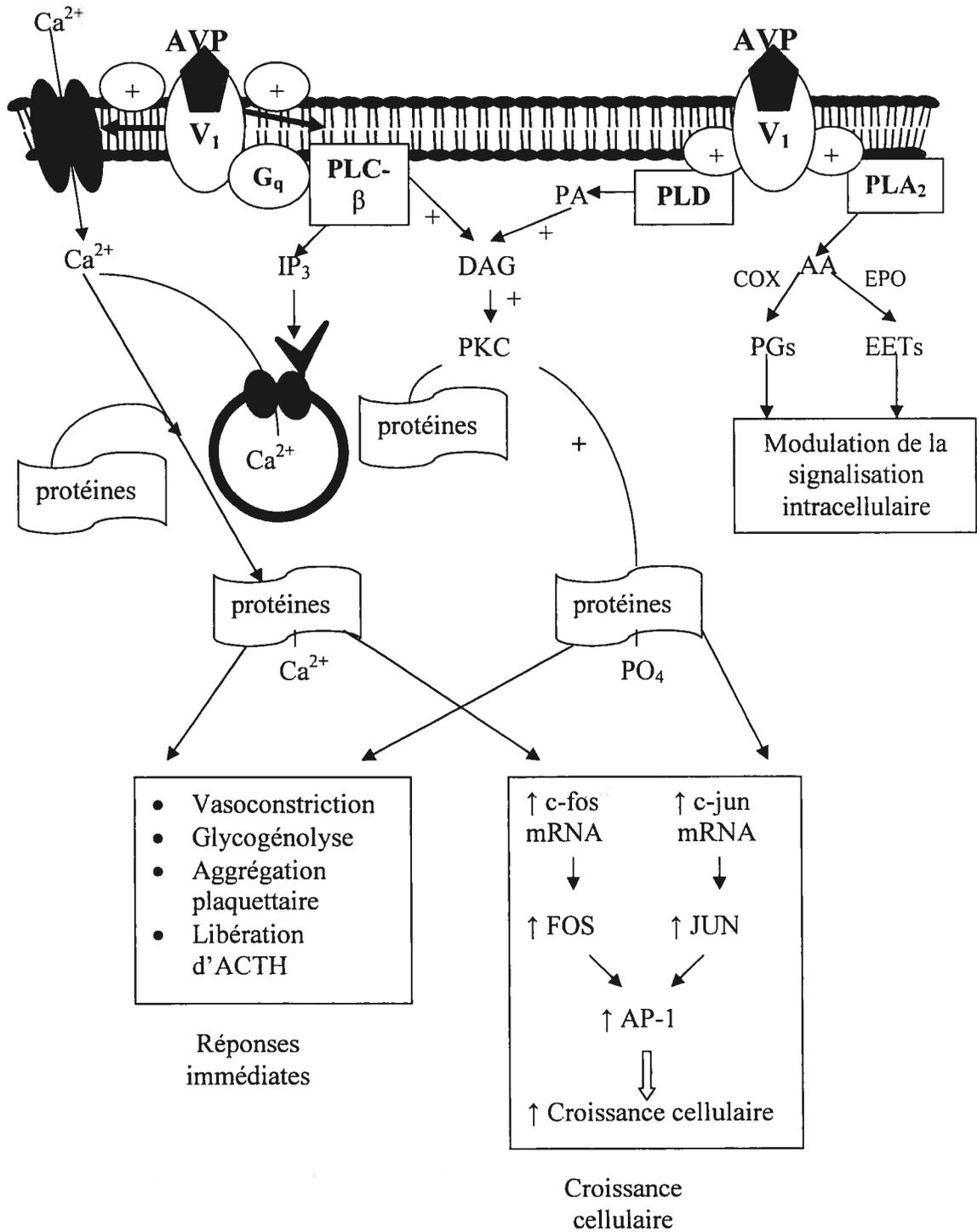
### 3.2. Récepteurs et voies de signalisation de la vasopressine

Trois types de récepteurs à la vasopressine sont présentement connus, soit les récepteurs  $V_{1a}$ , les récepteurs  $V_{1b}$  et les récepteurs  $V_2$ , ceux-ci appartenant tous à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (Burbach et al. 1995). Les récepteurs  $V_{1a}$  sont localisés entre autres au niveau du muscle lisse vasculaire, du foie, des plaquettes, du rein, du myocarde, des poumons et du système nerveux central, et sont responsables de la réponse pressive de l'AVP (Burbach et al. 1995; de Groote 2002). Les récepteurs  $V_{1b}$  sont localisés majoritairement au niveau de l'hypophyse antérieure et sont impliqués dans la libération d'hormone adrénocorticotrope (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH) dans la circulation sanguine (Howl & Wheatley 1995; Burbach et al. 1995). Les récepteurs  $V_2$  sont quant à eux situés au niveau rénal et sont responsables de l'effet antidiurétique de la vasopressine (Burbach et al. 1995). Les récepteurs  $V_2$  sont stimulés à de plus faibles concentrations plasmatiques d'AVP que les récepteurs  $V_{1a}$ , la réponse antidiurétique survenant ainsi avant la réponse vasoconstrictrice (de Groote 2002). Le site de liaison de l'AVP sur ses récepteurs, tant  $V_1$  que  $V_2$ , se situe dans le domaine N-terminal et au niveau des première et deuxième boucles extracellulaires (Burbach et al. 1995; Howl & Wheatley 1995). La troisième boucle intracellulaire et la queue cytoplasmique des récepteur  $V_{1a}$  et  $V_2$  contiennent de nombreux résidus sérine et thréonine, qui sont des sites de phosphorylation potentiels (Howl & Wheatley 1995; Morel et al. 1993). La troisième boucle intracellulaire de ces récepteurs démontre également une certaine importance en ce qui a trait au couplage du récepteur avec la protéine G (Howl & Wheatley 1995). Les cystéines 371 et 372 situées au niveau de la queue cytoplasmique sont quant à elles des sites potentiels de palmitoylation du récepteur  $V_{1a}$  (Howl & Wheatley 1995). Les récepteurs  $V_{1a}$  et  $V_{1b}$  à la vasopressine sont tous deux couplés à la voie de la phospholipase C (PLC) via une protéine  $G_{q/11}$  (figure 2, pages 13, 14, 15, 16).

Suite à la liaison d'un agoniste au récepteur, la phospholipase C produit de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et du diacylglycérol (DAG) à partir de phosphatidyl inositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>) présent dans la membrane plasmique (Howl & Wheatley 1995). L'IP<sub>3</sub> contribue à augmenter la concentration intracellulaire de calcium en se liant à son récepteur, un canal calcique, au niveau du réticulum sarcoplasmique, tandis que le diacylglycérol est un activateur naturel de la protéine kinase C (PKC) (Ross & Kenakin 2001). Suite à son activation, cette kinase peut phosphoryler nombre d'effecteurs, entraînant ainsi divers effets (Ross & Kenakin 2001). D'autres voies de signalisation pouvant être activées par le récepteur V<sub>1a</sub> sont celles des phospholipases A<sub>2</sub> et D, ainsi que celle des MAP kinases (Burbach et al. 1995). Bien qu'ils soient tous deux couplés à la voie de la PLC, les récepteurs V<sub>1a</sub> et V<sub>1b</sub> se distinguent par leur profil pharmacologique différent. Le récepteur V<sub>2</sub> à la vasopressine est quant à lui couplé à la voie de l'adénylate cyclase via une protéine G<sub>s</sub>. Cette enzyme augmente les taux intracellulaires de 3',5'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), ce qui contribue à activer la protéine kinase A (PKA) (Howl & Wheatley 1995; Fleming et al. 2001) (figure 2, pages 13,14,15,16). À l'instar de la PKC, la PKA peut phosphoryler de multiples effecteurs et entraîner divers effets (Fleming et al. 2001). De plus, l'augmentation de la concentration d'AMPC dans les cellules principales du tube collecteur rénal induit la translocation d'aquaporine-2 (AQP2), un canal pour l'eau, à partir de vésicules intracellulaires vers la membrane apicale, permettant ainsi une réabsorption d'eau accrue (Inoue et al. 2001). Toujours du côté apical du tube collecteur, le transporteur d'urée UTA-1 et le canal sodique épithélial EnaC, tous deux régulés par la vasopressine, contribuent à la réabsorption d'eau à partir du tube collecteur par une augmentation de l'osmolarité de la médullaire surrénale. Du côté basolatéral de ce tube, les canaux à eau AQP3 et AQP4, eux aussi régulés par l'AVP, finalisent la réabsorption d'eau à partir des cellules du tube collecteur jusque dans le compartiment sanguin (Inoue et al. 2001; Bankir 2001).

**Figure 2.** Voies de signalisation de la vasopressine. Adapté de Jackson (Jackson 2001)

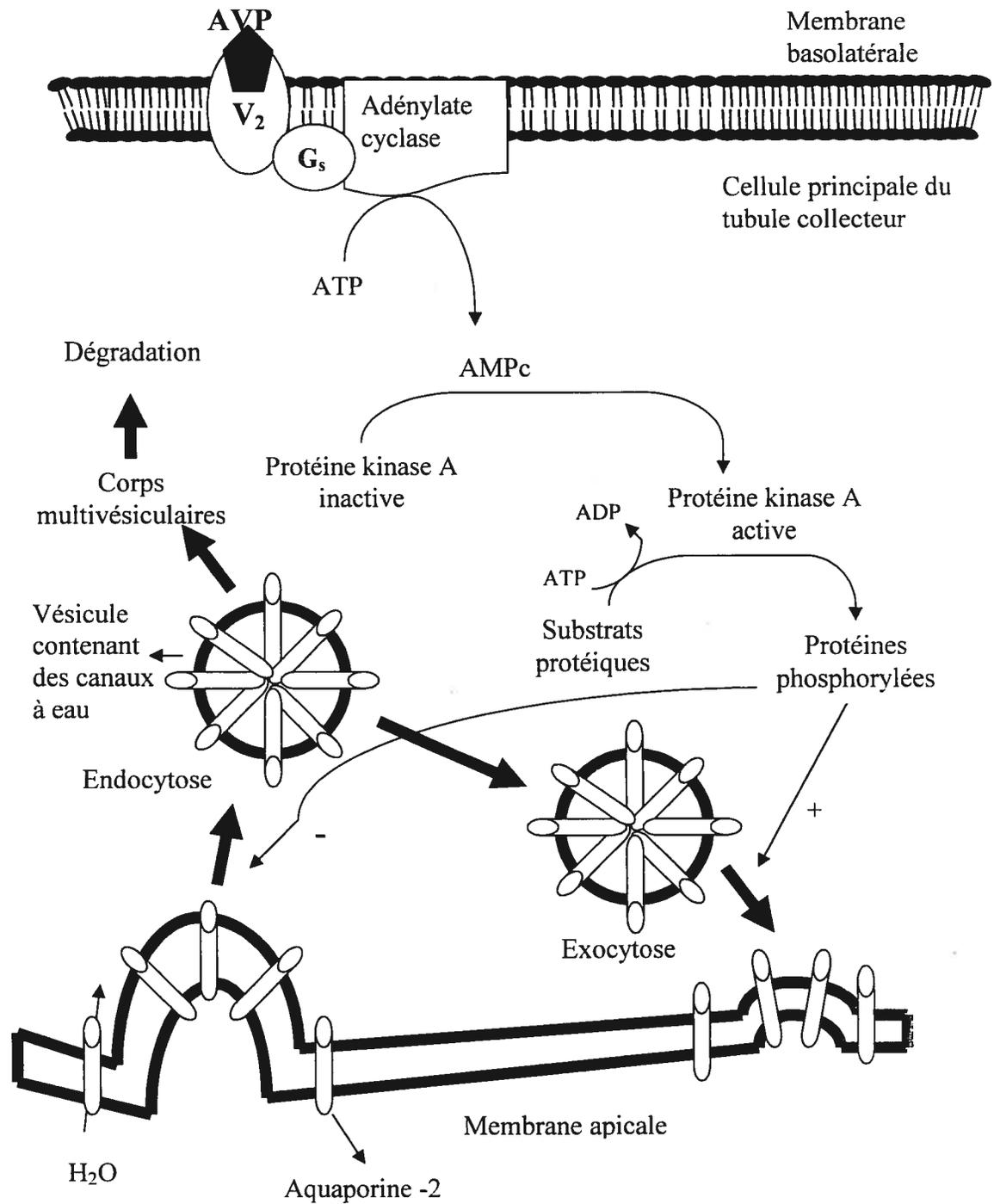
**a Voies de signalisation du récepteur V<sub>1</sub>**



### Légende :

**Figure 2a** : La liaison de la vasopressine à son récepteur  $V_1$ , couplé à une protéine  $G_q$  entraîne l'activation de la phospholipase C, qui libère de l' $IP_3$  et du DAG à partir de  $PIP_2$  membranaire. Le DAG active ensuite la PKC, tandis que l' $IP_3$  se lie à son récepteur au niveau du réticulum sarcoplasmique, un canal calcique, ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire. La phosphorylation de certaines protéines par la PKC et l'augmentation de calcium intracellulaire entraînent divers effets selon le type cellulaire, dont une vasoconstriction, la glycogénolyse, l'aggrégation plaquettaire ou la libération d'ACTH. D'autres voies de signalisation peuvent être activées, entraînant la transcription de c-fos et c-jun, augmentant eux-même l'expression de FOS et JUN, ceci étant à l'origine des effets mitogènes et de la croissance cellulaire observées lors d'expositions à la vasopressine.  $V_1$  : récepteur  $V_1$  à la vasopressine, AVP :  $[Arg]^8$ -vasopressine,  $G_q$  : protéine G couplée à la voie de la phospholipase C, PLC- $\beta$  : phospholipase C-  $\beta$ , PLD : phospholipase D, PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>, DAG : 1,2-diacylglycérol, PKC : protéine kinase C,  $IP_3$  : inositol 1,4,5-triphosphate, PA : acide phosphatidique, AA : acide arachidonique, PGs : prostaglandines, EETs : acides époxyeicosatriénoïques, COX : cyclo-oxygénase, EPO : époxygénase, AP-1 : facteur de transcription consistant en un hétérodimère de FOS et JUN, c-fos et c-jun : proto-oncogènes, FOS et JUN : produits de l'expression génique de c-fos et de c-jun, respectivement.

### b. Voies de signalisation du récepteur V<sub>2</sub>



**Légende :**

**Figure 2b :** La liaison de la vasopressine à son récepteur  $V_2$ , couplé à une protéine  $G_s$  et situé au niveau du tube collecteur rénal, provoque la transformation d'ATP en AMPc suite à l'activation de l'adénylate cyclase. L'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc active la protéine kinase A, qui phosphoryle différentes protéines, ceci ayant entre autres pour conséquence d'augmenter le nombre de canaux à eau aquaporine-2 au niveau de la membrane apicale du tube collecteur rénal, ce qui contribue à augmenter la réabsorption d'eau et à concentrer l'urine.  $V_2$  : récepteur  $V_2$  à la vasopressine, AVP :  $[\text{Arg}]^8$ -vasopressine,  $G_s$  : protéine G couplée à l'adénylate cyclase, ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, AMPc : adénosine 3',5'-monophosphate cyclique.

### 3.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques de la vasopressine

La vasopressine est impliquée dans plusieurs processus physiologiques prenant place dans divers systèmes et organes. Tout d'abord, au niveau cardio-vasculaire, les effets de cette hormone sont multiples et parfois contradictoires. En effet, l'AVP exerce d'une part une vasoconstriction au niveau du muscle lisse de plusieurs lits vasculaires, cet effet étant surtout important lors d'hémorragie (Howl & Wheatley 1995). De fait, la vasopressine participe au maintien d'une pression artérielle adéquate lors d'états hypovolémiques (Bennett & Gardiner 1985). L'AVP peut d'autre part entraîner la vasodilatation de certains lits vasculaires, tels les artères cérébrales, pulmonaires et les artères coronaires dans certaines conditions, ceci en augmentant la libération de monoxyde d'azote (NO) à partir de l'endothélium (Howl & Wheatley 1995). Toujours au niveau vasculaire, cette hormone serait impliquée dans l'agrégation plaquettaire. Au niveau rénal, de par son effet antidiurétique et ses effets stimulant la relâche de cortisol et d'aldostérone, la vasopressine peut contribuer indirectement à une élévation de la tension artérielle (Howl & Wheatley 1995). Par contre, il est également possible pour cette hormone de contrer une élévation de la tension artérielle secondaire à la production d'angiotensine II (AngII), l'AVP pouvant supprimer la libération de rénine à partir des cellules juxta-glomérulaires (Johnston 1985). Finalement, cette hormone aurait un rôle à jouer dans le contrôle central de la fonction cardio-vasculaire, en régulant les neurones sympathiques préganglionnaires et les fibres efférentes sympathiques, en augmentant le tonus vagal ainsi que la sensibilité des barorécepteurs à un stimulus dépresseur puis en participant à la remise à zéro de ceux-ci lors d'hypertension (Berecek & Swords 1990; Howl & Wheatley 1995; Johnston 1985; Doris 1984; Abboud et al. 1990; Berecek & Swords 1990; Bennett & Gardiner 1985). En raison de ses effets multiples au niveau cardio-vasculaire, il existe une controverse concernant l'implication de la vasopressine dans l'hypertension et/ou dans l'insuffisance cardiaque (Johnston 1985).

Il est néanmoins généralement admis que l'AVP peut contribuer indirectement à la pathogénèse de ces maladies de par ses effets au niveau du système nerveux central (Berecek & Swords 1990; Szczepanska-Sadowska 1996). En plus de ses effets cardio-vasculaires, l'AVP augmente la glycogénolyse, la gluconéogenèse ainsi que la synthèse d'urée au niveau du foie, participe à la modulation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et est un mitogène pour plusieurs types cellulaires, dont les fibroblastes, les hépatocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires, certaines cellules pulmonaires tumorales et les cellules épithéliales intestinales (Chiu et al. 2002; Howl & Wheatley 1995; Ruiz-Opazo 1998; de Groote 2002). Au niveau du système nerveux central, l'AVP agirait en tant que neurotransmetteur et/ou neuromodulateur, et serait par conséquent impliquée dans plusieurs processus incluant l'apprentissage, la formation de la mémoire, le comportement, la régulation de la température corporelle lors de fièvre, la rythmicité circadienne, le contrôle de l'apport liquidien, la nociception et le contrôle de la perméabilité des capillaires cérébraux (Howl & Wheatley 1995; Bankir 2001; Doris 1984; Mohr & Richter 1994). Ainsi, la vasopressine est un médiateur important dans plusieurs processus physiologiques et peut donc prendre part à plusieurs processus pathologiques. Tel que mentionné auparavant, cette hormone peut contribuer de manière indirecte à l'hypertension et à l'insuffisance cardiaque. De plus, une sécrétion inadéquate de vasopressine à partir de la neurohypophyse (forme neurogénique), ou une réponse rénale inadéquate à cette hormone (forme néphrogénique), est à l'origine du diabète insipide (Jackson 2001). Cette pathologie consiste en une polyurie et une polydipsie secondaires à une altération de la réabsorption d'eau au niveau rénal (Jackson 2001). Un agoniste sélectif des récepteurs  $V_2$ , la desmopressine, constitue l'agent de premier choix dans le traitement du diabète insipide neurogénique (Jackson 2001). Le diabète insipide néphrogénique étant quant à lui causé par une incapacité de concentrer l'urine malgré des concentrations plasmatiques normales ou élevées d'AVP, il n'est pas possible de traiter cette pathologie avec des agonistes des récepteurs  $V_2$  (Morello & Bichet 2001). Le diabète insipide néphrogénique peut être inné ou acquis.

Les formes innées de cette pathologie découlent dans la plupart des cas de mutations au niveau du gène du récepteur V<sub>2</sub> à la vasopressine, situé dans la région 12q13 (Morello & Bichet 2001). Ces mutations résultent en des récepteurs qui sont trappés au niveau intracellulaire, étant incapables d'atteindre la membrane plasmique (Morello & Bichet 2001). D'autres récepteurs mutants peuvent être localisés à la membrane plasmique, mais sont incapables de lier l'AVP et/ou d'activer les voies de signalisation (Morello & Bichet 2001). Une mutation au niveau des protéines aquaporine-2 est également à l'origine de diabète insipide néphrogénique (Morello & Bichet 2001). Le diabète insipide néphrogénique acquis est quant à lui causé par certains médicaments, dont le lithium, ou par certaines conditions pathologiques, dont l'hypercalcémie (Nguyen et al. 2003). Le traitement du diabète insipide néphrogénique consiste premièrement en l'identification de la cause sous-jacente et la correction de celle-ci si possible (Nguyen et al. 2003). En ce qui a trait au diabète insipide néphrogénique inné causé par une mutation, des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (COX) et des diurétiques donnent de bons résultats dans la plupart des cas (Nguyen et al. 2003). Des antagonistes des récepteurs V<sub>2</sub> à la vasopressine, le SR121463 et le VPA-985, semblent efficaces dans des modèles animaux en ce qui a trait au traitement du diabète insipide néphrogénique causé par des mutations du récepteur V<sub>2</sub> en agissant en tant que chaperones qui permettent aux récepteurs mutants d'atteindre la membrane plasmique (Morello & Bichet 2001; Nguyen et al. 2003). D'autre part, il existe un syndrome de sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique (*syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone*, SIADH). Ce syndrome consiste en une altération de l'excrétion d'eau par le rein, suite à une sécrétion inappropriée d'AVP et s'accompagne de plusieurs symptômes, dont la léthargie, l'anorexie, les nausées, les vomissements et les crampes musculaires (Jackson 2001). Dans ses formes les plus graves, ce syndrome peut entraîner le coma, des convulsions et la mort.

### 3.4. Mécanismes de tachyphylaxie à la vasopressine

La tachyphylaxie à la vasopressine a été observée pour la première fois dans les années 1960, ceci chez plusieurs espèces animales ainsi que chez l'être humain (Erwald 1976). La vasopressine était alors surtout utilisée pour traiter les hémorragies de varices œsophagiennes. Des échecs thérapeutiques ayant été obtenus chez plusieurs patients, l'implication clinique de cette tachyphylaxie fut soulevée (Erwald 1976). Selon les paramètres mesurés dans les différentes études, une tachyphylaxie pouvait être observée ou non (Erwald 1976; Razzak & Naguib 1967; Ready et al. 1991; Martinez-Arizala et al. 1989). Il a été découvert par la suite que la tachyphylaxie à l'AVP se présentait tant pour les récepteurs  $V_{1a}$  que pour les récepteurs  $V_2$  et que cette hormone pouvait également induire une désensibilisation hétérologue d'autres récepteurs, dont le récepteur  $AT_1$  à l'angiotensine II (Furchgott & Vanhoutte 1989; Innamorati et al. 1998; Preisser et al. 1999; Grier, III et al. 1989; Ancellin et al. 1997; Birnbaumer et al. 1992). Les mécanismes de désensibilisation des récepteurs  $V_{1a}$ , des récepteurs  $V_2$  et de désensibilisation hétérologue de multiples récepteurs pouvant différer de manière marquée, nous nous concentrerons sur les mécanismes de désensibilisation des récepteurs  $V_{1a}$  pour la suite de cette section. La désensibilisation de ce récepteur surviendrait en deux étapes : une première étape de découplage de la protéine G, dépendante de la présence de la protéine masquante arrestine, et du récepteur suivie d'une étape d'internalisation (Ancellin et al. 1997; Cantau et al. 1988; Nathanson et al. 1994). Le découplage du récepteur et de la protéine G surviendrait en quelques secondes, tandis que l'internalisation du récepteur se présenterait après plusieurs minutes (Ancellin et al. 1997). Quelques études ont été effectuées en ce qui a trait à l'implication de la protéine kinase C dans la tachyphylaxie à la vasopressine, les conclusions de ces études étant contradictoires (Innamorati G. et al. 1998; Nambi et al. 1989). Néanmoins, il semble que la phosphorylation du récepteur  $V_{1a}$  par cette kinase soit nécessaire à la séquestration et à l'internalisation du récepteur chez certaines espèces (Ancellin & Morel 1998).

Les sites de phosphorylation du récepteur  $V_{1a}$  par la PKC sont inconnus à ce jour, mais ne seraient pas situés au niveau des 51 derniers acides aminés de la portion C-terminale (Ancellin et al. 1997). Le récepteur  $V_{1a}$  paraît pouvoir être phosphorylé en absence d'AVP, mais la présence de cette hormone au niveau du récepteur modulerait le degré de phosphorylation (Ancellin et al. 1999). Le récepteur  $V_{1a}$  se resensibiliserait complètement en environ soixante minutes suite à la phosphorylation de celui-ci par la PKC dans certains systèmes d'expression en culture cellulaire (Ancellin et al. 1997; Nathanson et al. 1994). Les mécanismes de cette resensibilisation demeurent inconnus jusqu'à maintenant, bien qu'une implication des microtubules semble nécessaire à ce processus (Ancellin et al. 1997; Nathanson et al. 1994). Les résidus cystéines présents dans la région C-terminale du récepteur  $V_{1a}$ , étant des sites potentiels de palmitoylation, paraissent en partie impliqués dans l'internalisation du récepteur chez certaines espèces (Preisser et al. 1999; Ancellin et al. 1997). En effet, il a été rapporté qu'une diminution de la palmitoylation des cystéines 371 et 372 de la région C-terminale du récepteur  $V_{1a}$  pouvait entraîner une diminution de la phosphorylation de celui-ci. D'autre part, une diminution de la palmitoylation de ces résidus cystéine entraînerait une augmentation de l'internalisation du récepteur  $V_{1a}$  induite par l'agoniste (Hawtin et al. 2001). Bien que les mécanismes impliqués dans l'internalisation secondaire à une diminution de la palmitoylation soient inconnus, ce processus pourrait contribuer à la désensibilisation du récepteur  $V_{1a}$ . Outre la phosphorylation du récepteur  $V_{1a}$  par la PKC et la diminution de la palmitoylation de celui-ci, d'autres hypothèses ont été soulevées en ce qui a trait aux mécanismes de tachyphylaxie de ce récepteur. Une hypothèse serait que la tachyphylaxie à l'AVP serait secondaire à la déplétion des stocks intracellulaires d'inositols phosphates, bien que des résultats contradictoires aient été obtenus à ce propos (Grier, III et al. 1989; Ancellin & Morel 1998; Cantau et al. 1988). La déplétion des stocks de calcium intracellulaire pourrait jouer un rôle dans la tachyphylaxie à l'AVP, mais dans une minorité de cas (Ancellin et al. 1999; Ancellin & Morel 1998).

En ce qui a trait à la désensibilisation du récepteur  $V_{1a}$  par une voie dépendante des GRKs, aucune kinase de cette famille n'a été identifiée pour ce récepteur jusqu'à maintenant (Bunnemann & Hosey 1999). Par contre, dans certains systèmes d'expression, l'arrestine-3 semble impliquée dans l'internalisation et la séquestration du récepteur  $V_{1a}$  (Bowen-Pidgeon et al. 2001). De plus, la présence de la dynamine semble nécessaire à l'internalisation du récepteur  $V_{1a}$  pour certains types cellulaires, dont les HEK 293-T et les LLC-PK1 (Bowen-Pidgeon et al. 2001). En plus du phénomène de tachyphylaxie, lors d'une exposition à long terme à l'AVP, il existerait une régulation à la baisse des récepteurs  $V_{1a}$  suite à l'internalisation puis à la dégradation de ceux-ci dans des endosomes (Shewey et al. 1989).

#### **4. Protéine kinase C**

##### **4.1. Familles de protéines kinases C et mode d'activation des différentes isoformes**

La protéine kinase C (PKC) est une famille d'enzymes phosphorylant les résidus sérines et thréonines de diverses protéines (Liu & Heckman 1998). Jusqu'à maintenant, douze isoformes différentes de PKC ont été identifiées. Ces isoformes sont classifiées en trois familles, les PKC conventionnelles ou classiques (isoformes  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\gamma$ ), les PKC nouvelles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ , et  $\mu$ ) et les PKC atypiques ( $\xi$ ,  $\iota$  et  $\lambda$ , cette dernière étant l'homologue souris de l'isoforme humaine  $\iota$ ). selon leur structure et leur dépendance en co-activateurs (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). Une autre isoforme de PKC a été récemment découverte, la PKC  $\nu$ , ce qui pourrait conduire à l'apparition d'une quatrième famille de PKC (Newton 2001). La structure générale des PKC est semblable pour toutes les familles d'isoformes (Newton 2001). En effet, toutes les PKC comportent un domaine kinase conservé situé à l'extrémité C-terminale et relié à un domaine régulateur (Newton 2001).

Ce domaine régulateur comprend une séquence auto-inhibitrice (pseudosubstrat) et un ou deux domaines d'ancrage à la membrane plasmique (domaines C1 et C2) (Newton 2001). Le domaine C1 possède une région riche en cystéines et est présent dans toutes les isoformes de PKC (Newton 2001). Pour les isoformes conventionnelles et nouvelles de PKC, cette région riche en cystéines est répétée en tandem donnant lieu à des régions nommées C1A et C1B (Newton 2001). Les PKC atypiques ne contiennent qu'une copie du domaine C1 et ne possèdent pas de domaine C2 (Newton 2001). Les PKC sont régulées tout d'abord par la présence d'un pseudosubstrat occupant la cavité liant les substrats de la PKC et maintenant la kinase inactive, par des processus de phosphorylation ainsi que par leur translocation à la membrane plasmique, qui est régulée par différents co-activateurs (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). Trois phosphorylations selon une séquence déterminée sont nécessaires pour activer la PKC (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). La première phosphorylation a lieu dans un domaine nommé la boucle d'activation, située près de l'entrée du site catalytique, et est effectuée par la protéine kinase dépendante des phosphoinositides-1 (*phosphoinositide-dependent kinase*, PDK1) (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). Cette phosphorylation est nécessaire pour le positionnement correct des résidus pour la catalyse et pour démasquer l'entrée du site catalytique (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). La deuxième phosphorylation, possiblement une autophosphorylation, a lieu dans un domaine riche en prolines et permet à la PKC de demeurer dans un état catalytiquement compétent, thermiquement stable et résistant à la déphosphorylation par des phosphatases (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). La troisième phosphorylation, une autophosphorylation rapide, a lieu au niveau d'une région entourée de résidus hydrophobes (motif hydrophobe) et influence la localisation subcellulaire de la PKC et sa stabilité, sans toutefois être indispensable à l'activité catalytique (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). En plus des phosphorylations, l'activité des PKC est régulée par la présence de co-activateurs permettant la translocation de différentes isoformes à la membrane plasmique, étape essentielle pour leur activité catalytique (Newton 2001; Liu & Heckman 1998).

Cette activité catalytique est régulée par la présence de phosphatidylsérine pour toutes les isoformes de PKC (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). La phosphatidylsérine est un aminophospholipide retrouvé exclusivement au niveau de la portion cytoplasmique des membranes (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). La reconnaissance de cette molécule par la PKC dépend de la présence de ligands au niveau du domaine C1 (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). En effet, la présence de ligands au niveau de ce domaine, de même que la présence d'un substrat au niveau du site catalytique de la PKC, résultent en la présentation d'une surface hydrophobe continue, ce qui permet de recruter la PKC à la membrane et de favoriser la pénétration de celle-ci par la kinase (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). Le diacylglycérol (DAG) est l'agoniste naturel du domaine C1 des PKC conventionnelles et nouvelles, la liaison de cette molécule au domaine C1 entraînant le recrutement de ces isoformes à la membrane plasmique (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). Le domaine C1 des PKC atypiques diffère de celui des PKC conventionnelles et nouvelles, ces isoformes ne lient donc pas le DAG (Newton 2001; Liu & Heckman 1998). Par contre, les isoformes de cette famille nécessitent des acides gras insaturés, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) et le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) pour leur activation (Casabona 1997). De plus, les PKC atypiques ne possèdent pas une région riche en cystéines répétée en tandem (domaines C1A et C1B) et ne peuvent ainsi pas être activées les esters de phorbol, contrairement aux PKC conventionnelles et nouvelles (Newton 2001). Le domaine C2 est un autre module permettant à la PKC de s'ancrer à la membrane plasmique et est indépendant du domaine C1 (Newton 2001). Les domaines C2 des PKC conventionnelles dépendent du calcium pour interagir avec la membrane, tandis que le domaine C2 des protéines nouvelles est indépendant du calcium et que les PKC atypiques ne possèdent pas de domaine C2, et sont donc indépendantes du Ca<sup>2+</sup> (Newton 2001).

## 4.2. Localisation des protéines kinases C

La distribution tissulaire des PKC varie grandement, ce qui est en partie responsable de la spécificité de leur action. Les PKC  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  et  $\xi$  sont ubiquitaires et peuvent être retrouvées dans la plupart des tissus (Liu & Heckman 1998). La PKC  $\gamma$  est retrouvée presque exclusivement au niveau du système nerveux central et de la moelle épinière tandis que la PKC  $\eta$  est fortement exprimée dans la peau et les poumons, mais seulement faiblement dans la rate et le cerveau (Liu & Heckman 1998). La PKC  $\theta$  est retrouvée principalement dans les muscles squelettiques et à un degré moindre dans les poumons, la rate, la peau et le cerveau (Liu & Heckman 1998). La PKC  $\mu$  est quant à elle présente dans plusieurs tissus, dont le thymus et les poumons. Les isoformes de PKC exprimées au niveau du muscle lisse vasculaire sont les isoformes  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  et  $\xi$  (Liu & Heckman 1998). Certaines données suggèrent qu'il existerait une différence au niveau de la distribution tissulaire des PKC en conditions pathologiques par rapport à des conditions normales (Liu & Heckman 1998). Bien qu'elles doivent être transloquées à la membrane plasmique pour leur activation, le temps de résidence à la membrane des PKCs est transitoire s'il n'y a pas stabilisation de cette translocation par d'autres mécanismes. Suite à leur activation, les PKCs peuvent donc voyager à travers la cellule pour exercer leurs effets au niveau de différentes structures subcellulaires (Liu & Heckman 1998). Cette localisation subcellulaire des PKC est assurée par des protéines d'échafaudage ayant la capacité de lier les PKC (Liu & Heckman 1998). Les protéines d'échafaudage récepteurs pour les protéines kinases C activées (*receptor for activated C-kinase*, RACK) permettent de transporter les PKC actives à des sites cellulaires spécifiques (Newton 2001). Les protéines d'échafaudage pour la protéine kinase A (*A Kinase Anchoring Protein*, AKAP) se lient à des PKC inactives, mais phosphorylées et les transportent près de leurs substrats au niveau de la membrane plasmique (Newton 2001).

D'autres protéines d'échafaudage interagissant avec les PKC sont les substrats interagissant avec les protéines kinases C (*Substrates That Interact with C-Kinase*, STICK), qui lient les PKC inactives et phosphorylées et qui relâchent les PKCs activées suite à leur phosphorylation (Newton 2001).

### **4.3. Substrats des protéines kinases C**

Les substrats des différentes isoformes de protéines kinases C sont présentés au tableau I (page 27). D'autres substrats potentiels, entre autres la pompe à calcium de la membrane plasmique, certains récepteurs membranaires et des médiateurs participant à l'activation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires, peuvent être phosphorylés par la PKC, bien que les isoformes responsables de ces phosphorylations n'ont pas été identifiées jusqu'à maintenant (Watking 2001; Landry & Gies 2003).

**Tableau I.** Substrats des différentes isoformes de PKC

<b>ISOFORMES DE PKC</b>	<b>SUBSTRATS<sup>a</sup></b>
<b><math>\alpha</math></b>	peptide pseudosubstrat $\alpha$ , synthide 2, histones, protamine, protéine basique de la myéline ( <i>myelin basic protein</i> , MBP), glycogène synthétase kinase-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ), lamin B soluble, récepteur à l'insuline, Raf-1
<b><math>\beta_1, \beta_2, \gamma</math></b>	peptide pseudosubstrat $\alpha$ , histone H3, MBP, synthide 2, GSK-3 $\beta$ , récepteur de la vitamine D, lamin B de la membrane nucléaire et soluble, récepteur à l'insuline, Raf-1
<b><math>\delta</math></b>	peptide pseudosubstrat $\alpha$ , peptide pseudosubstrat $\epsilon$ , MBP, histones, GSK-3 $\beta$ , Raf-1
<b><math>\epsilon, \eta</math></b>	MBP, histones, peptide pseudosubstrat $\alpha$ , peptide pseudosubstrat $\epsilon$
<b><math>\theta, \mu</math></b>	MBP, histones, peptide pseudosubstrat $\alpha$
<b><math>\xi, \iota</math></b>	MBP, histones, peptide pseudosubstrat $\alpha$ , peptide pseudosubstrat $\epsilon$ , I $\kappa$ B

Adapté de Watking (Watking 2001)

**4.4. Activateurs et inhibiteurs pharmacologiques des protéines kinases C**

Les activateurs ainsi que les inhibiteurs pharmacologiques des différentes isoformes de PKC sont présentés au tableau II (page 28).

**Tableau II.** Activateurs et inhibiteurs pharmacologiques des différentes isoformes de PKC

ISOFORMES DE PKC	ACTIVATEURS	INHIBITEURS
$\alpha, \beta_1, \beta_2, \gamma$	Calcium intracellulaire ( $Ca^{2+}$ ), diacylglycérol (DAG), phorbol 12, 13-diacétate (PDA), Phorbol 12,14-dibutyrate (PDBu), Phorbol 12,14-didécanoate (PDD), Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA), Phosphatidylsérine (PS)	Calphostin C, Ro 31-8220, GF109203X, Gö 6976, Ro 31-7549, Gö 6983, Chélérythrine, LY-333351, (-)-Balanol, UCN-01, CGP41251
$\delta$	DAG, PDA, PDBu, PDD, PMA, PS	Calphostin C, Gö 6983, Chélérythrine, LY-333351, (-)-Balanol
$\varepsilon, \eta, \theta$	DAG, PDA, PDBu, PDD, PMA, PS	Calphostin C, GF109203X, Gö 6983, LY-333351, (-)-Balanol
$\mu$	DAG, PDA, PDBu, PDD, PMA, PS	Gö 6976
$\xi, \iota$	Différents lipides cérébraux	Gö 6976

Adapté de Watking (Watking 2001)

**Légende Tableau II :** Gö 6976 : 5,6,7,13-tétrahydro-13-méthyl-5-oxo-12H-indolol[2,3-alpyrrolol[3,4-c]carbazole-12-propanenitrile]; Gö 6983 : 2-[1-(3-Diméthylaminopropyl)-5-methoxyindol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)maléimide; GF109203X : 3-[1-[3-(Diméthylamino)propyl]-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-2-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione; LY-333351 : 9-[(Diméthylamino)méthyl]-6,7,10,11-tétrahydro-(9S)-NH, 18H-5,21 :12,15-dimetheno-dibenzo[e,k]pyrrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazacyclohexadécine-18,20(19H)dione; Ro 31-7549 : 2-[1-3(Aminopropyl)indol-3-yl]-3-yl]-3(1-méthyl-1H-indol-3-yl)maléimide; Ro 31-8220 : 2-{1-3(Amidinothio)propyl]-1H-indol-3-yl}-3(1-méthyl-1H-indol-3-yl)-maléimide.

## **5. Facteurs endothéliaux**

Perçu pendant plusieurs années comme un simple «tapis» de recouvrement des vaisseaux sanguins, l'endothélium vasculaire est dorénavant considéré comme un tissu ayant ses fonctions propres. En effet, l'endothélium produit plusieurs agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs, permettant de maintenir le tonus basal des vaisseaux relativement constant. De plus, l'endothélium est un inhibiteur de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire ainsi que de la prolifération du muscle lisse vasculaire (Furchgott & Vanhoutte 1989; Noll & Luscher 1998). D'autre part, la dysfonction endothéliale semble être la cause ou la conséquence de plusieurs maladies, dont l'hypertension, l'athérosclérose et le diabète (Fenster et al. 2003). Les principaux facteurs dilatateurs produits par l'endothélium sont le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines (PGs) de même que des acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, qui reste toujours à être identifié (Rastaldo et al. 2001; Busse et al. 2002; Furchgott & Vanhoutte 1989).

### **5.1. Monoxyde d'azote**

Le NO est un radical libre fortement soluble dans les membranes cellulaires, ceci lui permettant de diffuser jusqu'au muscle lisse ou jusqu'à la lumière vasculaire (Schini & Vanhoutte 1993). Cette molécule possède une demi-vie très brève, les valeurs rapportées pour ce paramètre allant de 3 à 50 secondes (Furchgott & Vanhoutte 1989; Kelm & Schrader 1990; Michel & Arnal 1993; Schini & Vanhoutte 1993). Il est maintenant généralement admis que le monoxyde d'azote est en fait le facteur relaxant dérivé de l'endothélium découvert par Furchgott et Zawadski en 1980 (Michel & Arnal 1993; Furchgott & Zawadski 1980).

### 5.1.1. Synthèse du monoxyde d'azote

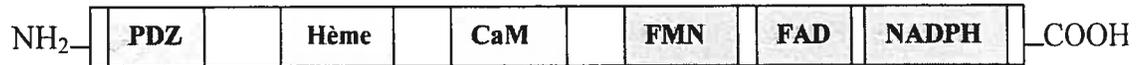
Le monoxyde d'azote est produit à partir de l'acide aminé L-arginine par une famille d'enzymes nommées les NO synthétases (Noll & Luscher 1998). Il existe trois isoformes de NO synthétases, soit la NO synthétase endothéliale (eNOS ou NOS-III), la NO synthétase neuronale (nNOS ou NOS-I) et la NO synthétase inductible (iNOS ou NOS-II) (Kausser et al. 1998; Szabo & Thiemermann 1995; Mashimo et al. 1996; Andrew & Mayer 1999). La eNOS est présente de manière constitutive au niveau de l'endothélium vasculaire ainsi qu'au niveau des plaquettes, des cardiomyocytes et du tissu de conduction cardiaque, la nNOS est surtout localisée au niveau de certaines structures cérébrales et des terminaisons nerveuses périphériques tandis que la iNOS peut être induite dans la plupart des tissus suite à l'application de stimuli appropriés, ces stimuli étant discutés plus loin (Kausser et al. 1998; Szabo & Thiemermann 1995; Mashimo et al. 1996; Andrew & Mayer 1999). De plus, certaines données expérimentales ont démontré la présence d'une iNOS constitutive dans quelques tissus, dont certains vaisseaux sanguins, le cœur, les reins et la muqueuse nasale (Barton et al. 2001; Ramis et al. 2000). En ce qui a trait à la nNOS, il existerait un transcript alternatif de cette isoforme au niveau du muscle squelettique, désigné la nNOS $\mu$  (Grozdanovic 2001). La iNOS et la nNOS sont des enzymes cytoplasmiques, tandis que la eNOS est une enzyme particulière, le plus souvent liée à la membrane plasmique (Mashimo et al. 1996). En effet, cette isoforme de NOS peut être myristoylée, palmitoylée, farnésylée ou acylée dans sa portion N-terminale, ces modifications permettant sa localisation au niveau de la membrane plasmique, de certaines organelles ou au niveau du cytosol (Mashimo et al. 1996). Les gènes codant pour les isoformes endothéliale, neuronale et inductible sont localisés sur les chromosomes humains 7, 12 et 17, respectivement (Wilcox et al. 1997). Les trois isoformes de NO synthétase partagent environ 60% d'homologie au niveau de leurs acides aminés et possèdent par conséquent des structures primaires très similaires (Papapetropoulos et al. 1999).

Tel que représenté à la figure 3 (page 33), cette structure est composée d'un domaine oxygénase en N-terminal et d'un domaine réductase en carboxy-terminal (Szabo & Thiemermann 1995; Grozdanovic 2001). Ces enzymes ne sont actives que sous forme de dimère, celui-ci étant formé par une interaction de deux domaines oxygénase, les domaines réductases se trouvant sous forme d'extensions indépendantes (Lane & Gross 2000). Le dimère de la eNOS est formé de deux sous-unités de 134 kDa, celui de la nNOS de deux sous-unités de 164 kDa, tandis que celui de la iNOS se compose de deux sous-unités de 131 kDa (Andrew & Mayer 1999; Schwarz et al. 1999; Guilnard et al. 1998; Szabo & Thiemermann 1995). La portion réductase des NOS démontre des similitudes importantes avec les enzymes de la famille des cytochromes P-450 (Szabo & Thiemermann 1995). La production équimolaire de NO et de L-citrulline à partir de L-arginine et d'oxygène moléculaire s'effectue par un transfert d'électrons à partir d'une molécule de NADPH dans le domaine réductase de l'enzyme jusqu'à un hème présent dans le domaine oxygénase (Andrew & Mayer 1999; Noll & Luscher 1998). Ce transfert d'électrons se fait via des domaines flavines FAD et FMN présents dans l'enzyme (Andrew & Mayer 1999; Noll & Luscher 1998). Les trois isoformes de NOS possèdent également un domaine liant la calmoduline, localisé entre les domaines oxygénase et réductase, mais ce domaine régule seulement l'activité des NOS constitutives (eNOS et nNOS), la iNOS possédant une calmoduline intégrée dans sa structure (Andrew & Mayer 1999; Szabo & Thiemermann 1995). Les isoformes constitutives sont ainsi dépendantes de la concentration de calcium intracellulaire, tandis que la iNOS est calcium-indépendante. Néanmoins, les trois isoformes de NOS dépendent de la présence de NADPH, et d'un cofacteur, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) dans le milieu (Szabo & Thiemermann 1995). La liaison du BH<sub>4</sub> aux NOS est anti-coopérative ; la liaison d'une molécule de BH<sub>4</sub> diminuant l'affinité de ces enzymes pour la liaison d'autres molécules de BH<sub>4</sub> (Andrew & Mayer 1999). Ce cofacteur est particulièrement important pour la nNOS, qui peut produire de hauts taux d'anions superoxyde en absence de celui-ci (Stuehr 1999).

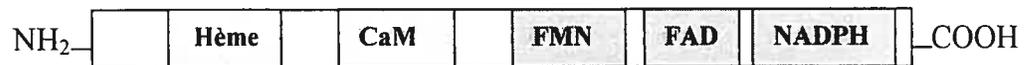
En conditions particulières, entre autres lors de faibles concentrations de L-arginine dans leur environnement, toutes les isoformes de NOS peuvent catalyser la production de substances autres que le NO dont l'anion superoxyde et d'autres espèces oxydantes (Andrew & Mayer 1999; Szabo & Thiernemann 1995). Les NO synthétases possèdent toutes une activité arginine N<sup>ω</sup>-hydroxylase, une activité N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine monooxygénase, une activité NADPH oxydase, une activité cytochrome c réductase ainsi qu'une activité dihydroptérine réductase (Szabo & Thiernemann 1995). Le NO est produit de manière basale par les deux isoformes constitutives de NOS (Michel & Arnal 1993). Par contre, l'activité de ces isoformes peut être régulée, ceci pouvant entraîner une augmentation de la production de NO.

**Figure 3.** Structure des NO synthétases

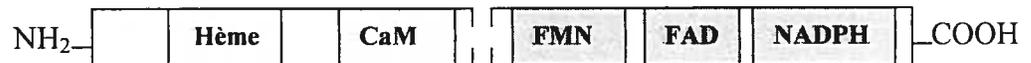
**nNOS**



**eNOS**



**iNOS**



**Légende :**

Les trois isoformes de NOS (iNOS, eNOS et nNOS) possèdent des domaines FMN, FAD et NADPH qui participent au transfert d'électrons du domaine réductase en carboxy-terminal jusqu'à un hème du domaine oxygénase en N-terminal. Les NOS constitutives (eNOS et nNOS) possèdent un domaine liant la calmoduline les rendant sensibles au calcium, tandis que la iNOS possède une calmoduline intégrée dans sa structure, ceci la rendant indépendante du calcium.

PDZ : domaine SD-95/Discs Large/ZO-1, servant généralement à lier d'autres protéines, Hème : portion hème des protéines, CaM : domaine de liaison de la calmoduline, FMN : flavine mononucléotide, FAD : flavine adenine dinucléotide, NADPH : forme réduite du nicotinamide adenine dinucléotide phosphate.

Les isoformes constitutives produisent du NO en quantité de l'ordre du picomolaire sur des périodes allant de secondes à minutes, tandis que la iNOS peut produire du NO de l'ordre du nanomolaire de manière soutenue, soit pendant des heures ou des jours (Michel & Arnal 1993; Noll & Luscher 1998; Szabo & Thiemermann 1995; Kroncke et al. 1998). Des analogues de la L-arginine, par exemple le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), peuvent inhiber l'activité des NOS (Schini & Vanhoutte 1993)(Tableau III, page 36). Les principaux stimuli entraînant l'induction de la iNOS sont les cytokines, telles des endotoxines. l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine-6 (IL-6), l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le facteur de nécrose tumorale (*tumour necrosis factor*, TNF) et d'autres molécules incluant les lipopolysaccharides bactériens (LPS). Ces cytokines et le LPS entraînent l'activation du facteur de transcription facteur nucléaire  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B), qui entraîne l'induction de la iNOS (Nomura 2001; Noll & Luscher 1998; Szabo & Thiemermann 1995; Bardell & MacLeod 2001). Cette isoforme de NOS est donc activée lors de processus inflammatoires ou de choc endotoxémique (Noll & Luscher 1998). Suite à l'exposition d'un tissu à l'un de ces stimuli, la iNOS est induite en quelques heures (Wong & Billiar 1995). Les glucocorticoïdes, l'interleukine-4 (IL-4), l'interleukine-8 (IL-8) et l'interleukine-10 (IL-10) sont des inhibiteurs puissants de l'induction de la iNOS, tandis que le NO lui-même peut réguler à la baisse l'ARNm de cette isoforme (Szabo & Thiemermann 1995; Wong & Billiar 1995; Lane & Gross 2000). Ainsi, la iNOS est fortement régulée au niveau transcriptionnel (Gosgnach et al. 2000). Il est à noter que le NO exerce une rétroaction négative sur l'activité des trois isoformes de NOS (Szabo & Thiemermann 1995). En ce qui a trait à la iNOS présente de manière constitutive dans certains tissus, une diminution de l'activité de cette enzyme peut être observée suite à des variations de la pression artérielle, ou après des changements au niveau des fluides et des électrolytes (Gosgnach et al. 2000). Bien qu'elles soient constitutives, la NOS endothéliale et la NOS neuronale peuvent toutes deux être régulées, le plus souvent au niveau de leur activité.

Le débit pulsatile sanguin, l'augmentation de l'intensité des contraintes de cisaillement au niveau vasculaire, les œstrogènes, l'insuline et les somatomédines (*Insulin-like growth factor*, IGF), l'hypoxie, l'exercice physique ainsi que quelques hormones (catécholamines, vasopressine), certains autacoïdes (bradykinine, histamine) et quelques médiateurs dérivés des plaquettes (sérotonine, ADP) peuvent tous augmenter la production de NO par la eNOS (Andrew & Mayer 1999; Szabo & Thiemermann 1995; Noll & Luscher 1998; Gosgnach et al. 2000; Michel & Arnal 1993; Furchgott & Vanhoutte 1989; Lane & Gross 2000). D'autre part, l'activité catalytique de cette isoforme est diminuée par la phosphorylation de certains de ses résidus sérines/thréonines ou tyrosines, tandis que son ARNm peut être régulé à la baisse par le TNF- $\alpha$  (Szabo & Thiemermann 1995; Wong & Billiar 1995). La eNOS interagit également avec plusieurs protéines pouvant avoir un impact sur son activité, par exemple la cavéoline-1 et la protéine de choc thermique-90 (*heat shock protein-90*, hsp90)(Lane & Gross 2000). L'expression de la nNOS peut quant à elle être régulée à la hausse par une ischémie cérébrale, une axotomie neuronale, un status épilepticus, par les œstrogènes ainsi que par un stress cellulaire neuronal produit par des stimuli biologiques, physiques ou chimiques, par exemple les dommages aux nerfs ou à la moelle épinière, un stress d'immobilisation, la stimulation nerveuse électrique ou l'administration de colchicine ou de formaline (Cuadra & El Fakahany 1998; Papapetropoulos et al. 1999). L'expression de cette isoforme est également régulée par des variations au niveau de la pression intraluminale vasculaire (Ebrahimian et al. 2003). Comme pour la eNOS, la phosphorylation de la nNOS diminue son activité (Wong & Billiar 1995; Stuehr 1999). La eNOS est principalement phosphorylée sur des résidus sérines, mais peut également être phosphorylée sur des résidus tyrosine et thréonine (Fulton et al. 2001). Les protéines kinases pouvant phosphoryler la eNOS sont Akt, la protéine kinase A, la protéine kinase G et la protéine kinase C (Fulton et al. 2001). La nNOS est quant à elle phosphorylée par les kinases dépendantes de la calmoduline (Alderton et al. 2001).

**Tableau III.** Inhibiteurs des NO synthétases

CATÉGORIE	COMPOSÉ	AFFINITÉ (pIC <sub>50</sub> )		
		INOS	nNOS	ENOS
<b>Analogues du L-arginine</b>	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine (NNLA)	5.5 ± 0.1	7.33±0.02	7.04±0.05
	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME)	4.5 ± 0.1	6.12±0.02	5.82±0.02
	N <sup>ω</sup> -propyl-L-arginine (L-PA)	4.0 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.06±0.03
	N <sup>G</sup> -monométhyl-L-arginine (L-NMMA)	5.58±0.04	6.6 ± 0.1	6.5 ± 0.1
	L-N <sup>5</sup> -(1-iminoéthyl)-ornitine (L-NIO)	5.8 ± 0.1	6.02±0.03	6.00±0.01
	L-N <sup>5</sup> -(1-imino-3-butényl)-ornitine (L-VNIO)	6.1 ± 0.1	6.4 ± 0.1	5.85±0.04
	L-N <sup>6</sup> -(1-imino-ethyl)lysine (L-NIL)	5.7 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.11±0.04
	S-méthyl-L-thiocitrulline (S-me-TC)	6.7 ± 0.1	7.4 ± 0.1	6.94±0.03
<b>Isothiourées</b>	S-méthylisothiourée (S-me-ITU)	6.3 ± 0.1	6.29±0.02	6.22±0.04
	S-éthylisothiourée (S-et-ITU)	7.25±0.05	6.91±0.04	6.78±0.04
	S,S'-(1,3-phenylene-bis(1,2-ethanediyl))bis-isothiourée (1,3 PB-ITU)	6.3 ± 0.1	5.63±0.04	4.5 ± 0.1
<b>Divers</b>	N-(3-aminoéthyl)benzyl)-acetamide (1400W)	6.1 ± 0.1	5.5 ± 0.1	4.31±0.02
	AMT	8.1 ± 0.2	8.08±0.03	7.6 ± 0.2
	Aminoguanidine	3.9 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.1 ± 0.1
	2-amino-4-picoline	7.1 ± 0.2	7.17±0.02	6.95±0.03

Adapté de Boer et al.(Boer et al. 2000)

### 5.1.2. Mécanismes d'action du monoxyde d'azote

Suite à sa diffusion au niveau du muscle lisse vasculaire, le NO stimule la production de 3'5'guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par une guanylate cyclase soluble présente au niveau du cytosol (Furchgott & Vanhoutte 1989). Le GMPc active la protéine kinase G (PKG), qui peut à son tour phosphoryler le récepteur à l'IP<sub>3</sub> et la protéine IRAG (*IP<sub>3</sub> receptor associated cGMP kinase substrate*), ce qui entraîne une diminution de la relâche de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique (Hofmann et al. 2000). Un autre mécanisme par lequel la PKG diminue la concentration de calcium intracellulaire est la phosphorylation des canaux potassiques dépendants du calcium de haute conductance (BK<sub>Ca</sub>), ce qui augmente leur activité et hyperpolarise la cellule (Hofmann et al. 2000). Cette hyperpolarisation provoque la fermeture des canaux calciques de type L, ce qui diminue l'influx calcique (Hofmann et al. 2000). Tous ces phénomènes contribuent à la relaxation du muscle lisse vasculaire et à la vasodilatation subséquente (Michel & Arnal 1993; Hofmann et al. 2000). D'autres cibles du GMPc sont les phosphodiesterases, certains canaux ioniques ainsi que la Na/K-ATPase (McGuire et al. 2001; Reid 1994). Le NO possède également plusieurs effets indépendants du GMPc, le plus important étant son effet cytotoxique (Szabo & Thiemermann 1995). Cet effet est induit suite à la formation de peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>), lors du contact du NO avec l'anion superoxyde (Szabo & Thiemermann 1995). Le peroxyde d'azote est ensuite protoné en acide peroxyde, qui, selon le pH environnant, peut se dégrader en métabolites inactifs ou en radicaux libres toxiques, tel le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) (Szabo & Thiemermann 1995; Wong & Billiar 1995). Le NO peut donc agir en tant que capteur d'espèces radicalaires ou en tant que radical libre toxique, selon les conditions environnantes (Wong & Billiar 1995). D'autres effets du NO indépendants du GMPc sont l'activation des canaux potassiques calcium-dépendants (K<sub>Ca</sub>) et des canaux potassiques dépendants du voltage (K<sub>v</sub>) ainsi que l'inhibition de plusieurs enzymes, dont la cyclo-oxygénase (COX) et les NOS elles-mêmes (Szabo & Thiemermann 1995; McGuire et al. 2001; Li et al. 1997).

L'inhibition de multiples enzymes se fait via la liaison du NO à un ion fer, à un groupement thiol, à un résidu cystéine ou à un résidu tyrosine de ces protéines. Les enzymes propices à une inhibition par le NO sont celles contenant un hème, des agrégats fer-soufre (par exemple les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale), des résidus cystéines facilement liables ou des résidus tyrosine pouvant subir une oxydation (par exemple les enzymes de la voie synthétique des prostaglandines) (Grozdanovic 2001; Szabo & Thiernemann 1995). Le NO peut également moduler la transcription et la traduction génique de certaines protéines ainsi qu'inhiber la synthèse protéique (Szabo & Thiernemann 1995; Wong & Billiar 1995). En effet, le NO peut influencer l'activité de différents facteurs de transcription, en plus de moduler la stabilité de l'ARN messager (ARNm) et la traduction de celui-ci en protéines (Bogdan 2001). Le NO peut interagir directement avec certains facteurs de transcription, en formant des S-nitrosothiols avec des résidus cystéines ou en formant des complexes métal-nitrosyl (Bogdan 2001; Kroncke et al. 2001). Par exemple, le NO peut inhiber la liaison du facteur de transcription Ace-1 à l'ADN en formant des S-nitrosothiols (Bogdan 2001). Le NO peut également entraîner une perte de fonction des facteurs de transcription qui contiennent un motif de liaison à l'ADN dépendant du zinc, comme p53, Egr-1 (*early growth response-1*), le récepteur de la  $1\alpha,25$ -hydroxyvitamine D<sub>3</sub> (VDR) et le récepteur du rétinoïde X (RXR), en libérant le zinc de ces facteurs (Bogdan 2001). Par contre, le NO peut augmenter la transcription génique par le même mécanisme d'action au niveau de facteurs de transcription répresseurs tels Sp1 (Bogdan 2001). En plus de ses interactions directes avec les facteurs de transcription, le NO peut moduler la transcription génique en participant à des cascades de régulation de certains facteurs (Bogdan 2001). Par exemple, la présence de NO peut permettre la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B au niveau du noyau en augmentant la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, par la I $\kappa$ B kinase (IKK), ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Bogdan 2001).

Il est cependant à noter que le NO peut également déplacer NF- $\kappa$ B de ses sites de liaison à l'ADN en régulant à la hausse et en stabilisant l'ARNm de I $\kappa$ B $\alpha$  et diminuer la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN par S-nitrosylation d'un résidu cystéine sur la sous-unité p50 de celui-ci (Bogdan 2001). Un autre mécanisme par lequel le NO diminue l'expression génique est l'activation d'une ADN-méthyltransférase via une nitrosylation de résidus cystéines (Bogdan 2001). L'ADN-méthyltransférase est une enzyme méthylant des dinucléotides CpG, ce qui donne à la chromatine une structure l'empêchant de lier les activateurs de transcription au niveau de promoteurs (Bogdan 2001). La régulation de l'expression génique par le NO peut également être indirecte, soit via l'activation de la guanylate cyclase soluble, la formation de GMPc et/ou l'activation de la PKG (Pilz & Casteel 2003). En effet, la PKG pourrait induire des changements au niveau de la traduction de l'ARNm en protéines ou réguler la stabilité des protéines nouvellement formées (Pilz & Casteel 2003). Le GMPc pourrait quant à lui diminuer l'expression génique via une inhibition de la voie Erk-1/2 (Pilz & Casteel 2003).

Suite à sa libération, le NO est rapidement métabolisé en dérivés nitrés, soit en nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et en nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), composés qui ne possèdent tous deux qu'une activité modérée (Kelm & Schrader 1990; Schini & Vanhoutte 1993; Geller & Billiar 1998). De plus, le NO peut réagir rapidement avec l'anion superoxyde dans le milieu pour former du peroxyde nitrite ou être inactivé par l'hémoglobine et plusieurs agents réducteurs (par exemple l'hydroquinone, le dithiotréitol, la phénidone et le pyrogallol)(Furchgott & Vanhoutte 1989; Szabo & Thiemermann 1995).

### 5.1.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote est un médiateur d'importance impliqué dans plusieurs processus physiologiques. Au niveau cardio-vasculaire, le NO est en partie responsable de la vasodilatation endothélium-dépendante, et se trouve donc impliqué dans la régulation de l'apport sanguin aux différents organes et de la pression artérielle ainsi que dans la régulation du tonus vasculaire (Szabo & Thiemermann 1995; Schini & Vanhoutte 1993). Le NO peut également diminuer l'adhérence des leucocytes à l'endothélium vasculaire et l'agrégation et l'adhésion plaquettaires, contribuant à diminuer la formation des thrombi au niveau de sites inflammatoires vasculaires (Viaro et al. 2000; Schini & Vanhoutte 1993). Le NO serait également impliqué dans la modulation de la contractilité cardiaque, participant en outre à la régulation de la relâche de catécholamines à partir des terminaisons nerveuses sympathiques au niveau du cœur (Viaro et al. 2000; Huang 1999). De plus, un rôle cardioprotecteur du NO lors d'une ischémie-reperfusion a été rapporté (Viaro et al. 2000). Le NO peut contribuer au contrôle de la relâche basale de rénine au niveau des cellules juxtaglomérulaires rénales et moduler la sécrétion de cette protéine secondaire à l'activation des mécanismes majeurs régulant sa libération (Reid 1994). D'autre part, le NO pourrait moduler l'expression des récepteurs AT<sub>2</sub> de l'angiotensine II (Bucher et al. 2001). Le NO contribue à la défense de l'organisme contre des agents pathogènes, soit directement ou suite à la formation de peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) secondaire à la réaction du NO avec l'anion superoxyde. En effet, lors d'infections, le NO, et par conséquent le peroxy-nitrite, sont produits en fortes concentrations par la iNOS, ceci entraînant une altération du métabolisme cellulaire et une inhibition de la prolifération de l'agent infectieux (Schini & Vanhoutte 1993). De plus, le NO et le peroxy-nitrite participeraient à l'activation des leucocytes, ceci contribuant également à l'éradication des pathogènes (Huang 1999). Au niveau cérébral, le NO agirait en tant que neurotransmetteur et neuromodulateur.

Il jouerait un rôle important dans la formation de la mémoire et dans l'apprentissage et constituerait un lien entre l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate et la stimulation de la guanylate cyclase (Szabo & Thiemermann 1995; Huang 1999). Au niveau du muscle squelettique, le NO est impliqué dans la régulation de la contractilité, dans le métabolisme mitochondrial oxydatif, dans l'homéostasie du glucose et dans le contrôle du débit sanguin (Grozdanovic 2001). Ce médiateur est impliqué dans d'autres processus physiologiques, dont le maintien d'un tonus bronchique adéquat, l'érection pénienne et la vidange gastrique (Lane & Gross 2000). Le NO agit en tant que neurotransmetteur dans les neurones non-adrénergiques, non-cholinergiques dans les tractus gastro-intestinal, respiratoire et génito-urinaire (Huang 1999). Cet agent est de plus impliqué dans le contrôle de la sécrétion de certaines hormones par le pancréas, l'hypothalamus (par exemple la vasopressine) et l'hypophyse antérieure (Reid 1994). Au niveau cellulaire, le NO est impliqué dans la régulation de certains gènes, dans la différenciation et la migration cellulaire et dans l'apoptose, cette molécule jouant ainsi un rôle de défense de l'organisme contre les tumeurs (Cuadra & El Fakahany 1998; Lane & Gross 2000; Grozdanovic 2001). Bien que le NO soit impliqué dans plusieurs phénomènes physiologiques vitaux, une mauvaise régulation de sa production peut être à l'origine de divers processus pathologiques. Par exemple, la production de grandes quantités de NO suite à l'induction de la iNOS est impliquée dans de nombreuses conditions physiopathologiques, dont l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthritis, la sclérose en plaques, les maladies inflammatoires de l'intestin, le diabète juvénile, l'athérosclérose, le lupus érythémateux, le rejet d'organes après une greffe, ainsi que dans le cancer du sein et des ovaires (Szabo & Thiemermann 1995; Kroncke et al. 1998; Viaro et al. 2000; Geller & Billiar 1998; Hsueh & Quinones 2003). La production de NO par la nNOS serait aussi impliquée dans certaines pathologies, par exemple dans l'athérosclérose, dans les dommages secondaires à une ischémie cérébrale, et dans plusieurs maladies neuro-dégénératives, comme l'Alzheimer et la chorée de Huntington (Szabo & Thiemermann 1995; Furfine et al. 1994; Wilcox et al. 1997; Papapetropoulos et al. 1999).

Une altération de la production de NO peut quant à elle être impliquée dans la pathogénèse de l'hypertension (Chou et al. 1998; Fenster et al. 2003). Les effets pathologiques du NO sont en partie induits par une réduction de la production d'ATP suite à une inhibition des complexes mitochondriaux I et IV, par la peroxydation des lipides et des protéines et par la fragmentation de l'ADN, ces effets étant observés en présence de fortes concentrations de ce médiateur (Cuadra & El Fakahany 1998; Huang 1999).

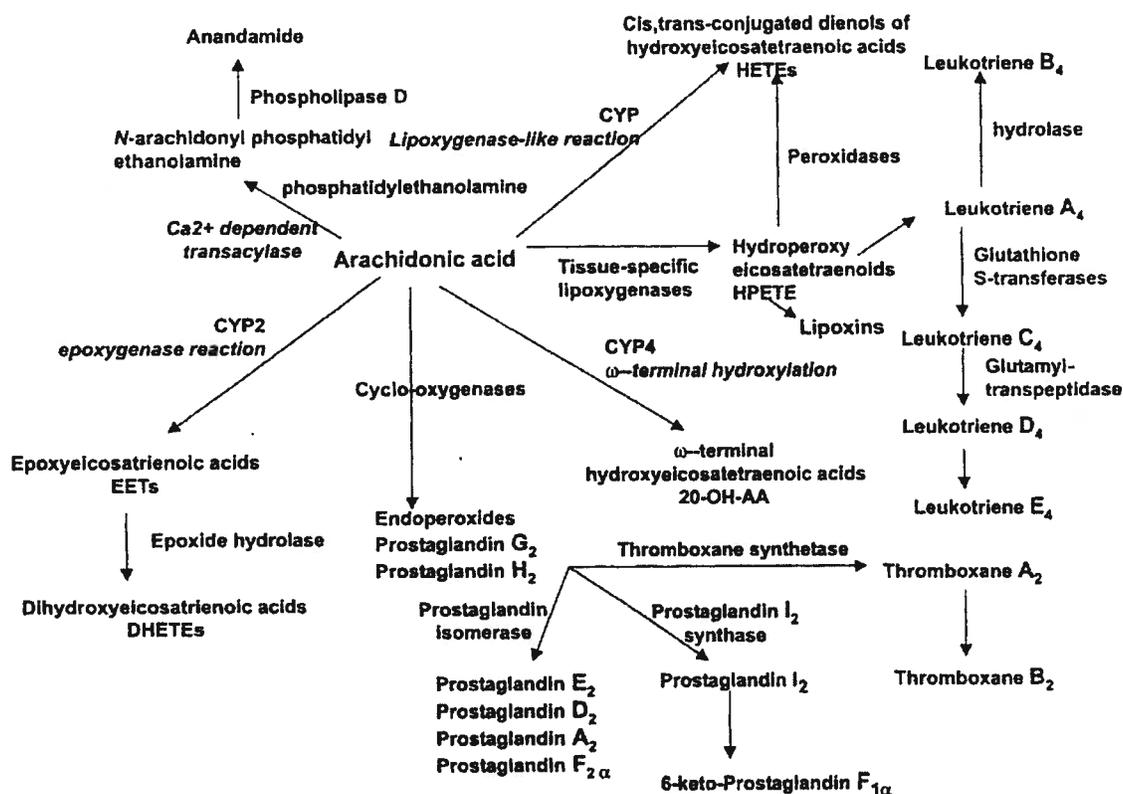
## **5.2. Prostaglandines**

### **5.2.1. Synthèse des prostaglandines**

Suite à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, la phospholipase A<sub>2</sub> libère de l'acide arachidonique à partir de phospholipides membranaires (Nojima et al. 2000). L'acide arachidonique libre peut ultérieurement être transformé en plusieurs produits par différentes voies métaboliques, dont la voie de la cyclo-oxygénase (COX), aussi appelée prostaglandine H synthétase (PGHS) ou endoperoxyde synthétase. Cette enzyme peut conduire à la synthèse des prostaglandines ou des thromboxanes via la synthèse d'un intermédiaire, la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) (McGuire et al. 2001; Davidge 2001). Il existe deux isoformes différentes de COX, la COX-1 étant exprimée de manière constitutive dans la plupart des cellules et la COX-2 étant induite par différents stimuli pro-inflammatoires, tels les mitogènes, les cytokines et les lipopolysaccharides bactériens (Laporte et al. 1998). La PGH<sub>2</sub> est en général métabolisée par les prostaglandine isomérases pour former les prostaglandines E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> et F<sub>2α</sub>, par la prostaglandine I<sub>2</sub> synthétase pour former la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub> ou prostacycline) ou par la thromboxane synthétase pour conduire à la formation de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (McGuire et al. 2001; Laporte et al. 1998).

Étant donné la co-localisation de la COX et de la prostaglandine I<sub>2</sub> synthétase au niveau de l'endothélium, la prostacycline est la principale prostaglandine endothéliale (Davidge 2001). Le thromboxane est quant à lui surtout produit au niveau des plaquettes et des macrophages activés, mais peut également être synthétisé au niveau de l'endothélium dans certains cas, tel que représenté à la figure 4 (page 44) (Davidge 2001; Nojima et al. 2000). Également, dans certaines conditions particulières, la COX peut conduire à la production d'anion superoxyde, cette molécule pouvant inhiber l'effet du NO (Davidge 2001). L'acide arachidonique peut d'autre part être métabolisé en leucotriènes, en acides époxyeicosatriénoïques (EETs) ou en diénols d'acides hydroxy-eicosatétraénoïques par des lipoxigénases ou des cytochromes P-450, respectivement (McGuire et al. 2001; Nojima et al. 2000). À l'instar du NO, les prostaglandines sont libérées par l'endothélium de manière basale, cette libération pouvant être augmentée suite à divers stimuli, dont l'augmentation de l'intensité des contraintes de cisaillement, l'hypoxie et diverses substances (acétylcholine, bradykinine, endothéline, substance P, histamine, sérotonine, vasopressine, noradrénaline, dérivés purinergiques) (Michel & Arnal 1993; Noll & Luscher 1998; Schini & Vanhoutte 1993). Les prostaglandines peuvent exercer une rétroaction négative sur la COX-1 en augmentant les taux intracellulaires d'AMPc (Davidge 2001). Toutefois, la COX-2 demeure insensible à cette rétroaction négative (Davidge 2001). Le NO peut pour sa part activer ou inhiber la COX, selon les circonstances et le type cellulaire (Davidge 2001).

**Figure 4.** Synthèse des prostaglandines et des EETs. Tiré de McGuire et al. (McGuire et al. 2001)



**Légende :** L'acide arachidonique peut être métabolisé par diverses voies. L'acide arachidonique peut être transformé en prostaglandines par la cyclo-oxygénase (COX), la prostaglandine isomérase, la prostaglandine synthétase et en thromboxanes par la COX puis la thromboxane synthétase. Les hydroperoxyeicosatriénoïdes (HPETEs) et subséquemment les leucotriènes peuvent être obtenus suite au métabolisme de l'acide arachidonique par des lipoxygénases. Les acides époxyéicosatriénoïques (EETs) et les diénols cis, trans-conjugués des acides hydroxyeicosatriénoïques (HETEs) proviennent du métabolisme de l'acide arachidonique par des cytochromes P-450, tandis que les acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETEs) proviennent d'une transformation des EETs par une époxide hydrolase et que l'anandamide provient du métabolisme de l'acide arachidonique par une phosphatidyléthanolamine et la phospholipase D.

### 5.2.2. Récepteurs et voies de signalisation des prostaglandines

Les effets des prostaglandines ou des thromboxane sont médiés par de nombreux récepteurs, chaque récepteur étant nommé selon la prostaglandine ou le prostanoloïde pour lequel il a le plus d'affinité (Morrow & Roberts 2001). Ces récepteurs sont divisés en cinq types principaux, DP (pour la  $PGD_2$ ), FP (pour la  $PGF_{2\alpha}$ ), IP (pour la  $PGI_2$ ), TP (pour le  $TXA_2$ ) et EP (pour la  $PGE_2$ ), ce dernier type étant subdivisé en quatre sous-types  $EP_1$  à  $EP_4$  (Morrow & Roberts 2001; Nilius et al. 2000). Tous les récepteurs aux prostaglandines et au thromboxane sont couplés à des protéines G (Morrow & Roberts 2001). Les récepteurs DP,  $EP_2$ ,  $EP_4$  et IP sont couplés à une protéine  $G_s$ , qui active l'adénylate cyclase et augmente les concentrations intracellulaires d'AMPc. Cette augmentation d'AMPc entraîne une diminution de la concentration intracellulaire de calcium et augmente la sortie de potassium de la cellule via des canaux potassiques dépendants de l'ATP (Beach et al. 2001). Les récepteurs  $EP_1$ , FP et TP sont quant à eux couplés à une protéine  $G_q$ , entraînant l'activation de la phospholipase C (Morrow & Roberts 2001; Foley et al. 2001). Le récepteur  $EP_3$  est particulier en ce sens qu'il peut activer les protéines  $G_i$ ,  $G_s$  et  $G_q$  selon les circonstances (Morrow & Roberts 2001). D'autre part, l'effet vasodilatateur de certaines prostaglandines serait en partie médié par une activation des canaux potassiques calcium-dépendant de haute conductance ( $BK_{ca}$ ) et des canaux potassiques voltage-dépendants ( $K_v$ ) sensibles au 4-aminopyridine (McGuire et al. 2001).

### 5.2.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques des prostaglandines

La prostaglandine  $H_2$  et le thromboxane  $A_2$  possèdent un effet vasoconstricteur, la prostacycline jouit d'un effet vasodilatateur (McGuire et al. 2001; Davidge 2001; Noll & Luscher 1998) tandis que les effets de la  $PGD_2$ , de la  $PGE_2$  et de la  $PGF_{2\alpha}$  varient selon l'espèce et le tissu étudiés (Morrow & Roberts 2001).

D'autre part, la prostacycline diminue l'agrégation plaquettaire, alors que le thromboxane A<sub>2</sub> est un activateur puissant de ce phénomène (Foley et al. 2001; Morrow & Roberts 2001). Les prostaglandines participent également à la modulation de la relâche des facteurs plaquettaires (Foley et al. 2001; Morrow & Roberts 2001). En plus de leurs effets sur le tonus vasculaire et sur la fonction plaquettaire, les prostaglandines contribuent à la régulation de l'excrétion d'eau et de sel par le rein et de la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires (Foley et al. 2001; Morrow & Roberts 2001). Outre leurs effets cardiovasculaires, les prostaglandines sont impliquées dans la protection de la muqueuse gastrique contre l'acidité et les agents ulcérogènes, dans la glycogénolyse, dans l'érection pénienne, dans la conception et dans les contractions utérines lors de l'accouchement (Morrow & Roberts 2001; Foley et al. 2001). De plus, les prostaglandines pourraient avoir des effets stimulants et dépresseurs au niveau du système nerveux central et contribuer à la régulation de la température corporelle suite à une infection par des pyrogènes et à certains processus entourant le sommeil (Morrow & Roberts 2001). Au niveau du système endocrinien, les prostaglandines peuvent participer à la sécrétion d'ACTH, d'hormone de croissance, de stéroïdes surréniaux, d'insuline et de progestérone (Morrow & Roberts 2001). Étant donné leur rôle central dans plusieurs processus physiologiques, les prostaglandines sont impliquées dans de nombreuses pathologies. En effet, ces substances, ou une altération de leur production, participeraient entre autres à la pathogénèse de l'hypertension artérielle et pulmonaire, de l'athérosclérose, du diabète, de la pré-éclampsie, de la réponse inflammatoire, de la douleur, de l'ischémie cérébrale ainsi que de certains types de cancers (Davidge 2001).

### 5.3. Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Lors de l'inhibition concomitante de la synthèse de monoxyde d'azote et des prostaglandines, il est tout de même possible d'observer une vasodilatation résiduelle à certains agents, dont l'acétylcholine et la bradykinine (McGuire et al. 2001). Des données expérimentales ont permis de démontrer que la molécule responsable de cette vasodilatation résiduelle agirait en hyperpolarisant le muscle lisse vasculaire, d'où le terme facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF). Il est présentement connu que l'augmentation du calcium intracellulaire constitue une étape cruciale pour la libération d'EDHF au niveau de l'endothélium et que la contribution de l'EDHF à la vasodilatation augmenterait de manière inverse avec le calibre des vaisseaux (Busse et al. 2002). Aucune substance, dont les effets concorderaient parfaitement avec ceux de l'EDHF endogène, n'a été identifiée à ce jour (Busse et al. 2002). Néanmoins, plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant. Les effets de l'EDHF dépendant fortement des canaux potassiques présents au niveau du muscle lisse vasculaire, un bref résumé de ceux-ci est effectué avant d'aborder les effets de l'EDHF et les hypothèses possibles en ce qui a trait à ce facteur endothélial.

#### 5.3.1. Canaux potassiques présents au niveau du muscle lisse vasculaire

Il existe plusieurs types de canaux potassiques au niveau vasculaire, tous ces canaux contribuant à une sortie du potassium intracellulaire suite à leur ouverture, entraînant ainsi une hyperpolarisation, et une relaxation musculaire subséquente. Les différents types de canaux potassiques retrouvés au niveau du muscle lisse vasculaire sont les canaux potassiques dépendants de l'ATP ( $K_{ATP}$ ) qui sont également sensibles aux sulfonylurées, les canaux potassiques dépendants du voltage ( $K_v$ ) qui sont sensibles au 4-aminopyridine, les canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{IR}$ ), ainsi que les canaux potassiques calcium-dépendants de haute conductance ( $BK_{ca}$ ), de conductance intermédiaire ( $IK_{ca}$ ) et de faible conductance ( $SK_{ca}$ ) (Nelson & Quayle 1995; Weiger et al. 2002).

L'activité des canaux  $K_{ATP}$  et des canaux  $K_v$  peut être augmentée par le NO et les prostaglandines, mais non par les EETs (Li et al. 1997). L'activité des  $BK_{Ca}$  est quant à elle modulée par un grand nombre de molécules, dont les EETs ainsi que par plusieurs mécanismes moléculaires, dont les seconds messagers du NO et des prostaglandines, le GMPc et l'AMPc respectivement, qui à l'instar du calcium favorisent l'ouverture de ces canaux (Weiger et al. 2002). L'activité des autres canaux potassiques dépendants du calcium pourrait quant à elle être augmentée par le NO, mais pas par les prostaglandines et les EETs (tableau IV, page 48).

**Tableau IV.** Bloqueurs des canaux potassiques (Geeson et al. 2002; Zygmunt et al. 1997; Petersson et al. 1997; Joiner et al. 2003; Nagasaki et al. 1993; Huys et al. 2002; Kaczorowski & Garcia 1999)

CANAL POTASSIQUE	BLOQUEURS
$K_{IR}$	Césium (CsCl), baryum (BaCl <sub>2</sub> )
$K_{ATP}$	Sulfonylurées (par ex.glibenclamide, tolbutamide), (4-morpholinecarboximide-N-1-adamantyl-N'-1-cyclohexyl)(U-37883A)
$K_v$	Charybdotoxine, noxiustoxine, margatoxine, kaliotoxine, hongotoxine, agitoxine, dendrotoxine, ShK (toxine provenant de <i>Stichodactyla helianthus</i> ), 4-aminopyridine, WIN 17317-3, UK78282,corréolide, dofétilide, terikatalant, ciclazindol, trimébutine, parabutoxine
$BK_{Ca}$	Charybdotoxine, ibériotoxine, limbatoxine, paxilline, aflatrem, clotrimazole, tétraéthylammonium (TEA), trimébutine
$IK_{Ca}$	1-[(2-chlorophényl)diphénylméthyl]-1H-pyrazole (TRAM-34), clotrimazole, TEA, UCC 1559, trimébutine
$SK_{Ca}$	Apamin, TEA

### 5.3.2. Effets du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

L'EDHF agirait via une ouverture des canaux  $K_{ca}$ , mais la réponse à ce facteur n'impliquerait pas les canaux  $K_{ATP}$ , sensibles au glibenclamide, ni les canaux  $K_v$  (Busse et al. 2002; Li et al. 1997; Feletou & Vanhoutte 2000). De fait, l'hyperpolarisation attribuable à l'EDHF peut être abolie par une combinaison d'apamin, un inhibiteur spécifique des  $SK_{ca}$  et de charybdotoxine, un inhibiteur non sélectif des canaux  $IK_{ca}$ , des  $BK_{ca}$  ainsi que de certains canaux potassiques dépendants du voltage (Busse et al. 2002). Cependant, une combinaison d'ibériotoxine, un inhibiteur spécifique des  $BK_{ca}$ , et d'apamine ne pouvant se substituer à l'association charybdotoxine-apamine, les  $BK_{ca}$  ne semblent pas jouer un rôle central dans l'hyperpolarisation médiée par l'EDHF (Busse et al. 2002). De plus, le blocage des canaux  $K_v$  par le 4-aminopyridine ne réussissant pas à inhiber la réponse de l'EDHF, il semble que cette réponse soit plutôt médiée via les canaux  $SK_{ca}$  et  $IK_{ca}$  seulement (McGuire et al. 2001).

### 5.3.3. Hypothèses possibles pour le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Les principales hypothèses actuelles concernant l'identité de l'EDHF sont les acides époxyeicosatriénoïques, les jonctions intercellulaires et les ions potassiques (McGuire et al. 2001). Il y a quelques années, une hypothèse populaire était que les cannabinoïdes endogènes pouvaient jouer le rôle d'EDHF (McGuire et al. 2001). Ces candidats potentiels pour le rôle d'EDHF sont représentés à la figure 5 (page 53) (White & Hiley 1997; Randall & Kendall 1998).

### 5.3.3.1. Acides époxyeicosatriénoïques

Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) sont synthétisés par un cytochrome P-450 à partir de l'acide arachidonique (figure 4, page 44). Les EETs sont des candidats potentiels pour le rôle d'EDHF, puisqu'ils répondent à plusieurs conditions définissant les propriétés et actions de ce facteur. En effet, il s'agit de substances synthétisées à partir d'acide arachidonique par un cytochrome P-450 suite à une élévation des taux de calcium intracellulaire et agissant sur les canaux potassiques calcium-dépendants pour induire une hyperpolarisation (Busse et al. 2002). La synthèse des EETs est plus importante au niveau des vaisseaux de petit calibre que des vaisseaux de conductance, autre caractéristique de l'EDHF (Busse et al. 2002). Par contre, il y a peu de données expérimentales directes démontrant que les EETs produits au niveau de l'endothélium ont la capacité de diffuser jusqu'au niveau du muscle lisse vasculaire pour y exercer une hyperpolarisation (Busse et al. 2002). De plus, les EETs induisant une vasodilatation via les  $BK_{ca}$  plutôt que via les  $IK_{ca}$  ou les  $SK_{ca}$ , il est peu probable que ces molécules soient responsables de la majorité des effets observés de l'EDHF (Busse et al. 2002; Li et al. 1997; Baron et al. 1997; Dumoulin et al. 1998). Néanmoins, plusieurs auteurs considèrent les EETs comme le candidat le plus probable de l'EDHF (Medhora et al. 2001). Une discussion plus détaillée au sujet des EETs est présentée dans la prochaine section.

### 5.3.3.2. Jonctions intercellulaires

Les jonctions intercellulaires servent à coupler les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses entre elles, mais également à exercer un couplage des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses (Busse et al. 2002; McGuire et al. 2001). Il existerait des similitudes entre la propagation du courant électrique via les jonctions intercellulaires et les réponses induites par l'EDHF (Busse et al. 2002).

De plus, une hyperpolarisation des cellules endothéliales est nécessaire à l'hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire sous-jacent, ceci appuyant l'hypothèse que les jonctions intercellulaires sont responsables des effets attribuables à l'EDHF (Feletou & Vanhoutte 2000). Toutefois, cette hypothèse s'appliquerait surtout au niveau des vaisseaux de petits calibres, une controverse existant en ce qui a trait aux vaisseaux de gros calibre (Busse et al. 2002).

#### **5.3.3.3. Ions potassiques**

Les ions potassiques pourraient en eux-mêmes expliquer le phénomène de l'EDHF (Busse et al. 2002). En effet, une hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire peut être induite suite à l'activation de canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{IR}$ ) et de la Na/K-ATPase, ceci par une augmentation de la concentration de potassium extracellulaire secondaire à la sortie de cet ion des cellules endothéliales (Busse et al. 2002; McGuire et al. 2001). Cependant, l'hypothèse que les ions potassiques soient l'EDHF a été sérieusement mise en doute étant donné que la relaxation et l'hyperpolarisation induites par le potassium ne sont pas observées dans certains vaisseaux pour lesquels des réponses attribuables à l'EDHF ont été obtenues (Busse et al. 2002).

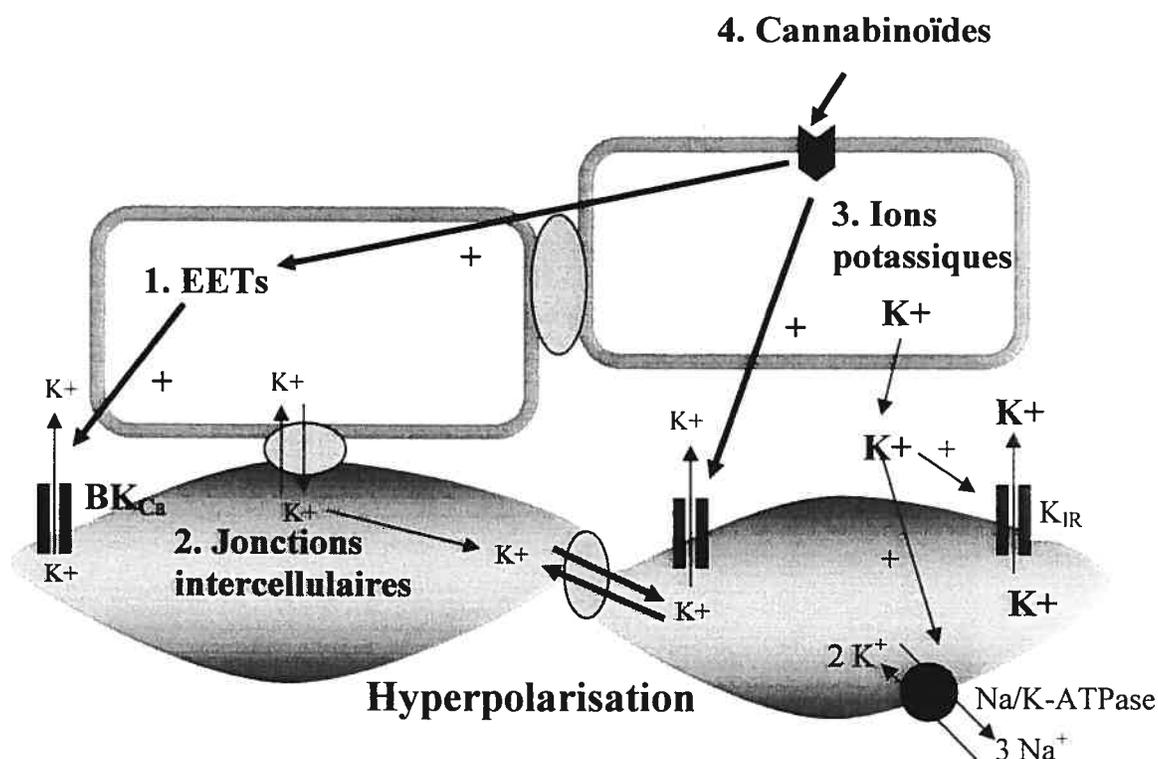
#### **5.3.3.4. Cannabinoïdes**

Les cannabinoïdes endogènes étaient des candidats potentiels pour le rôle d'EDHF il y a quelques années (McGuire et al. 2001; White & Hiley 1997; Harris et al. 1999). L'anandamide, un cannabinoïde endogène, est un métabolite (éthanolamide) de l'acide arachidonique et agit sur deux récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs  $CB_1$  et  $CB_2$  aux cannabinoïdes (Randall & Kendall 1998; Fleming et al. 1999). Ces deux récepteurs sont couplés à une inhibition de l'adénylate cyclase, à une diminution de l'activité des canaux calciques de type N, ainsi qu'à une activation de certains canaux potassiques (Randall & Kendall 1998).

Il existerait également un couplage entre les récepteurs aux cannabinoïdes et la voie des MAP kinases (Fleming et al. 1999; Lepicier et al. 2003). Le 2-arachidonyleglycérol (2-AG) et le palmitoylethanolamide (PEA) constituent deux autres cannabinoïdes endogènes, le premier étant non sélectif pour les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> et le second étant plus sélectif envers le récepteur CB<sub>2</sub> (Pertwee 1997; Harris et al. 1999; Kagota et al. 2001). Des données expérimentales suggéraient que l'effet de ces cannabinoïdes endogènes pouvait être inhibé par une combinaison d'apamine et de charybdotoxine (McGuire et al. 2001). Cependant, de nombreuses données plus récentes ont démontré que les cannabinoïdes endogènes et l'EDHF ne partageaient pas les mêmes propriétés pharmacologiques (McGuire et al. 2001; White & Hiley 1997). Certains auteurs ont proposé l'hypothèse que les cannabinoïdes endogènes pouvaient participer à la libération de l'EDHF, ceux-ci pouvant induire la production d'eicosanoïdes, plutôt qu'être eux-mêmes un EDHF (Fleming et al. 1999).

Il est à noter qu'il est présentement généralement accepté qu'il n'existe pas un seul, mais bien plusieurs EDHFs, qui peuvent varier en fonction du tissu ou de l'espèce étudiée (McGuire et al. 2001).

**Figure 5.** Candidats potentiels pour le rôle d'EDHF (Busse et al. 2002; McGuire et al. 2001)



**Légende :** Il existe quatre candidats potentiels pour le rôle d'EDHF : 1- les acides époxyeicosatriénoïques (EETs), qui pourraient créer une hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire suite à une ouverture des canaux potassiques dépendants du calcium de haute conductance ( $BK_{Ca}$ ); 2- les jonctions intercellulaires, les cellules musculaires lisses vasculaires pourraient être hyperpolarisées suite au libre passage d'ions potassiques à partir des cellules endothéliales à travers ces jonctions; 3- les ions potassiques eux-mêmes pourraient jouer le rôle d'EDHF en ouvrant les canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{IR}$ ) et en activant la  $Na/K$ -ATPase, ce qui augmenterait la concentration de potassium extracellulaire et 4- les cannabinoïdes, qui peuvent hyperpolariser les cellules musculaires lisses suite à l'ouverture de certains canaux potassiques.

## **5.4. Acides époxyeicosatriénoïques :**

### **5.4.1. Synthèse des acides époxyeicosatriénoïques**

Tel que mentionné auparavant, l'acide arachidonique est métabolisé en acides époxyeicosatriénoïques par des époxygénases appartenant à la famille des cytochromes P-450 dans plusieurs tissus différents, dont le foie, les reins, les intestins, les poumons, le pancréas, le cœur, les cellules endothéliales vasculaires, les plaquettes ainsi qu'au niveau du système nerveux central (Roman 2002). Des enzymes du cytochrome P-450 appartenant aux familles 1A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2J, et 4A catalysent toutes la formation de quatre époxydes différents : l'isoforme CYP2C8 pouvant catalyser la formation de 14,15-EETs et de 11,12-EETs, l'isoforme 2C9 catalysant la formation de 14,15-EETs, de 11,12-EETs et de 8,9-EETs, tandis que l'isoforme 2J2 participe à la synthèse de 5,6-EETs, de 8,9-EETs, de 11,12-EETs et de 14,15-EETs (Roman 2002; Wong et al. 2000). La quantité d'EETs libérée au niveau vasculaire est inconnue. Cependant, au niveau des plaquettes humaines, cette quantité serait de l'ordre du micromolaire (Rastaldo et al. 2001). Les EETs sont métabolisés en acides dihydroépoxyeicosatriénoïques (DiHETEs) par des époxyde hydrolases présentes dans le milieu. Les DiHETEs possèdent une activité de beaucoup inférieure aux EETs. Ces derniers peuvent également être inactivés par plusieurs autres voies, dont la  $\beta$ -oxydation, l'estérification avec des phospholipides membranaires, la liaison aux protéines plasmatiques ou le catabolisme par la cyclooxygénase (Roman 2002).

### **5.4.2. Voies de signalisation des acides époxyeicosatriénoïques**

Les EETs agissent sur le muscle lisse vasculaire en augmentant la probabilité d'ouverture des  $BK_{Ca}$  (Rastaldo et al. 2001). L'hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire secondaire à la sortie de potassium atténuerait l'entrée de calcium via des canaux calciques voltage-dépendants, ceci provoquant une vasorelaxation (Roman 2002).

Certains EETs et leurs métabolites DiHETEs peuvent inhiber la Na/K-ATPase, et diminuer la contractilité cardiaque en inhibant l'ouverture des canaux sodiques et des canaux calciques de type L (Roman 2002; Wong et al. 2000). Les mécanismes d'action exacts des EETs demeurent inconnus, mais l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G ou de tyrosine kinases a été proposée (Hoebel & Graier 2003). En effet, les 11,12-EET et les 14,15-EET semblent augmenter les concentrations intracellulaires d'AMPc et activer la protéine kinase A, ce qui correspond au couplage avec une protéine G<sub>s</sub> (Wong et al. 2000; Imig et al. 1999). Il a également été rapporté que les EETs peuvent activer une cascade tyrosine kinase de la famille c-src, ceci pouvant médier leurs effets mitogéniques (Chen et al. 1998).

#### **5.4.3. Effets physiologiques et rôles pathologiques des acides époxyeicosatriénoïques**

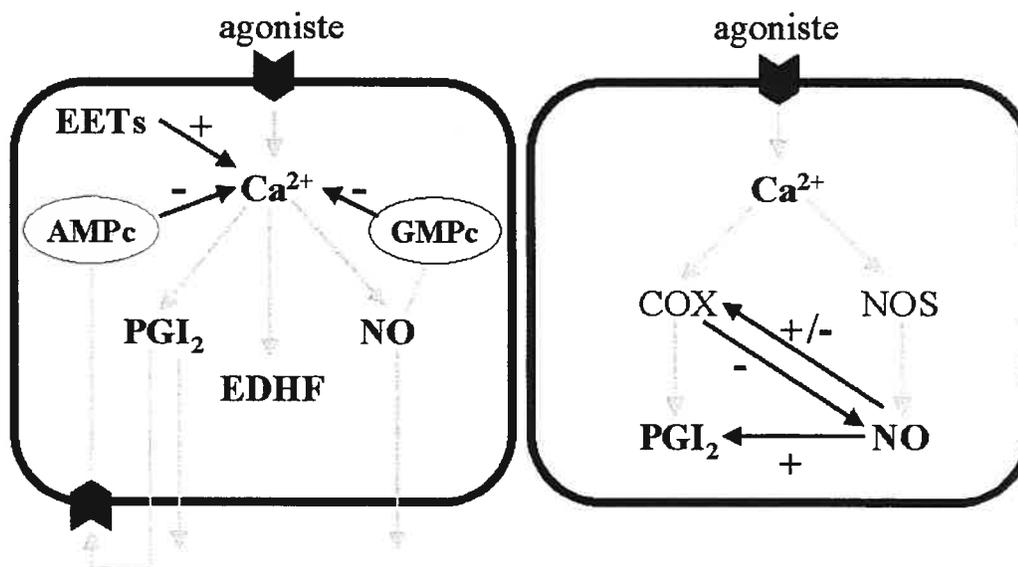
En plus de participer à la régulation du tonus vasculaire, les EETs auraient un effet anti-inflammatoire et préviendraient l'adhésion des leucocytes activés à la paroi vasculaire ainsi que l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhérence par les cytokines (Roman 2002; Wong et al. 2000). Ces substances posséderaient également des propriétés anti-plaquettaires et seraient de puissants mitogènes, participant ainsi à l'angiogénèse et à la fibrose secondaire à des lésions vasculaires (Roman 2002). D'autre part, au niveau du pancréas, les EETs participeraient à la sécrétion d'insuline et de glucagon et au niveau rénal, ils seraient impliqués dans la régulation de l'excrétion de sodium, du débit sanguin et du taux de filtration glomérulaire (Roman 2002; Imig et al. 1999). Ces molécules sont également importantes pour le maintien d'un tonus bronchiolaire adéquat (Roman 2002). Au niveau du système nerveux central, les EETs semblent être impliqués dans la médiation de l'hyperémie réactive et dans la réponse vasodilatatrice au glutamate. Finalement, il a été proposé que les EETs pouvaient agir en tant que seconds messagers de certaines hormones et facteurs de croissance (Chen et al. 1998).

Une altération de la production des EETs pourrait être impliquée dans certaines pathologies, dont l'hypertension, le diabète et le syndrome hépatorénal (Roman 2002). Toutefois, les EETs étant connus depuis quelques années seulement, il n'est pas impossible que ces substances participent à la pathogénèse d'autres maladies.

## **6. Interactions entre les facteurs endothéliaux**

Tel que représenté à la figure 6 (page 57), il existe plusieurs interactions des facteurs endothéliaux entre eux. D'une part, le NO amplifie la réponse vasodilatatrice des prostaglandines de manière synergique, en inhibant la dégradation de l'AMPc par une voie dépendante du GMPc (De Wit et al. 2000). La prostacycline diminue pour sa part la relâche de NO, via une diminution des taux de calcium intracellulaires (De Wit et al. 2000). D'autre part, le NO peut atténuer la relâche d'EDHF, également en altérant les concentrations intracellulaires de calcium (De Wit et al. 2000; Bauersachs et al. 1996). L'EDHF pourrait ainsi agir comme deuxième ligne de défense lors d'une altération de la production de NO (De Wit et al. 2000). Le NO peut augmenter ou inhiber l'activité de la COX selon les circonstances, tandis que cette enzyme peut diminuer les effets du NO suite à la production d'anions superoxyde (Roman 2002). Finalement, les EETs contribuent à la formation et à la relâche de NO et de prostaglandines en augmentant la concentration de calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales (Roman 2002).

**Figure 6.** Interactions entre les facteurs endothéliaux. Adapté de de Wit et al. (De Wit et al. 2000)



**Légende :** Interactions entre les facteurs endothéliaux. Le monoxyde d'azote (NO) augmente la réponse vasodilatatrice des prostaglandines par une inhibition de la dégradation de l'AMPc, peut activer ou inhiber la cyclo-oxygénase (COX) selon les circonstances et atténue la relâche d'EDHF en diminuant les taux intracellulaires de calcium. La prostacycline inhibe la relâche de NO en diminuant les taux intracellulaires de calcium, tandis que la COX peut diminuer les effets du NO suite à une production d'anion superoxyde et que les EETs peuvent augmenter la synthèse de NO et de prostaglandines via une augmentation du calcium intracellulaire. EETs : acides époxyeicosatriénoïques, AMPc : adénosine 3',5'-monophosphate cyclique, GMPc : guanosine 3',5'-monophosphate cyclique, PGI<sub>2</sub> : prostacycline, NO : monoxyde d'azote, EDHF : *endothelial derived hyperpolarizing factor*, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, COX : cyclo-oxygénase, NOS : NO synthétase.

## 7. Buts du travail

Une tachyphylaxie endothélium-dépendante à la vasopressine ayant été observée antérieurement dans le laboratoire du Dr Lamontagne, le premier objectif de mon projet de maîtrise était de déterminer quels facteurs endothéliaux étaient impliqués dans la tachyphylaxie à cette hormone au niveau des aortes de rats. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de la synthèse de NO et de prostaglandines. Nous voulions également déterminer si les candidats potentiels au rôle d'EDHF pouvaient contribuer à la tachyphylaxie à l'AVP. Nous avons donc tout d'abord évalué l'effet des cannabinoïdes endogènes à ce phénomène, puis l'effet des EETs. Le deuxième objectif de mon projet de maîtrise était de déterminer quelques mécanismes possibles de tachyphylaxie à la vasopressine. Étant donné la présence de plusieurs canaux potassiques au niveau du muscle lisse vasculaire et les interactions nombreuses des facteurs endothéliaux avec ces canaux, nous avons évalué l'effet de différents bloqueurs des canaux potassiques. Nous avons étudié l'implication de trois des quatre types de canaux potassiques présents au niveau du muscle lisse vasculaire dans la tachyphylaxie à l'AVP, ces canaux étant les canaux potassiques dépendants du voltage ( $K_v$ ), les canaux potassiques dépendants de l'ATP ( $K_{ATP}$ ) et les canaux potassiques dépendants du calcium ( $K_{ca}$ ). En ce qui a trait à ce dernier type de canaux, nous avons évalué les effets des  $BK_{ca}$  et des  $SK_{ca}$  dans la tachyphylaxie à l'AVP. Nous avons finalement étudié l'effet de la protéine kinase C, un effecteur important des actions de la vasopressine au niveau du muscle lisse vasculaire, ainsi que les interactions de cette kinase avec le NO.

## **CHAPITRE 2**

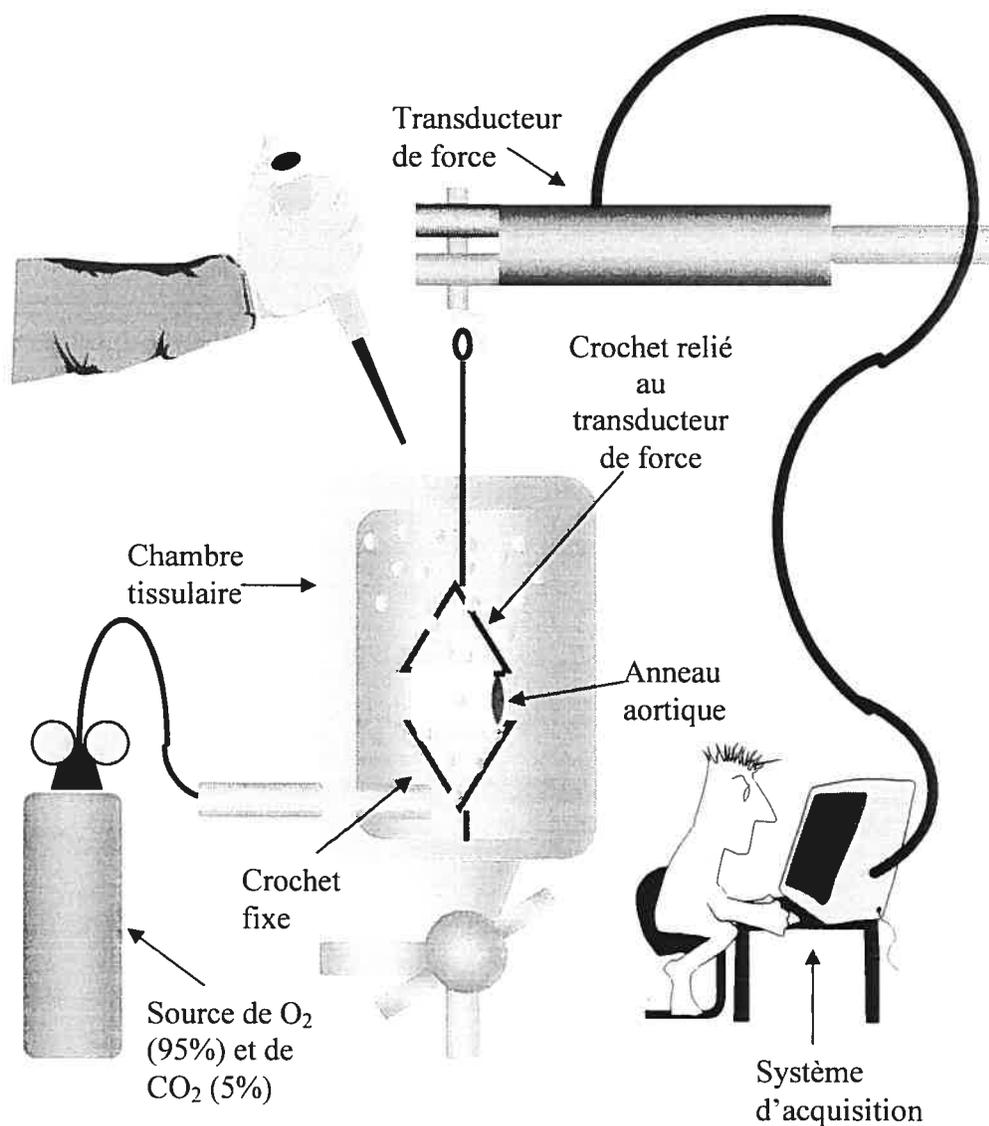
### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. Animaux et modèle expérimental

Toutes les expérimentations effectuées au cours de ce projet de maîtrise l'ont été sur des anneaux aortiques de rats mâles Sprague-Dawley, dont le poids variait entre 300 et 350 g. Les expérimentations ont été menées selon les lignes directrices du Conseil canadien pour la protection des animaux ([www.ccac.ca](http://www.ccac.ca)). Les rats étaient endormis avec du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) jusqu'à perte de conscience totale, puis décapités. Après une laparotomie médiale, l'aorte thoracique était prélevée et nettoyée de tout tissu conjonctif et de gras. Les aortes étaient par la suite sectionnées en anneaux de 4 mm de longueur. L'endothélium était détruit de manière mécanique pour certains anneaux (E-), en insérant une pince métallique à l'intérieur de l'anneau, puis en roulant cet anneau à dix reprises sur une gaze humectée de tampon Krebs-Henseleit. L'endothélium était conservé intact (E+) pour d'autres anneaux. Les anneaux aortiques étaient ensuite installés dans des chambres d'organes isolés pouvant contenir 20 ml de liquide, remplis de tampon Krebs-Henseleit (composition en mM: 118 NaCl, 4 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 11.1 glucose) oxygéné par un mélange de 95% d'oxygène (O<sub>2</sub>) et de 5% de CO<sub>2</sub> et maintenu à une température de 37°C. Tel que représenté à la figure 7 (page 62), les anneaux aortiques étaient étirés entre deux crochets métalliques, l'un fixe et retenu par un crochet en verre dans le bain d'organe, l'autre étant relié à un transducteur de force (Grass FT03) à l'aide d'une corde. Ce transducteur permettait de mesurer la tension isométrique produite par les anneaux. Cette tension était enregistrée au niveau d'un système d'acquisition de données (Biopac, Harvard Apparatus, St-Laurent, QC, Canada) (figure 7, page 62). Suite à l'installation des anneaux aortiques sur le modèle, une période de stabilisation de 30 minutes était allouée, puis une tension de 2 g était imposée graduellement aux anneaux aortiques. Cette tension était augmentée de 0.75 g à toutes les cinq minutes.

Lorsqu'une tension de 2 g était obtenue, une période de stabilisation de cinq minutes était allouée, puis une administration de 20 mM de chlorure de potassium (KCl) d'une durée de dix minutes était effectuée, afin de vérifier l'intégrité du muscle lisse des anneaux aortiques. Suite à l'administration de KCl 20 mM, un lavage des bains d'organes était réalisé. Les lavages des bains d'organes se faisaient en vidant et en remplissant ceux-ci à cinq reprises à l'aide de tampon Krebs-Henseleit oxygéné à 37°C. Suite au lavage des bains d'organes, une période de stabilisation de cinq minutes suivait, puis une tension optimale de 4 g était imposée graduellement aux anneaux, encore une fois en augmentant la tension de 0.75 g à toutes les cinq minutes. Globalement, l'augmentation graduelle de la tension, ceci de la fin de la première période de stabilisation de 30 minutes jusqu'à l'obtention d'une valeur de 4 g, avait lieu sur une période d'environ 60 minutes. Lorsqu'une valeur de tension de 4 g était obtenue, une période supplémentaire de stabilisation de cinq minutes était allouée, puis une administration de KCl 40 mM d'une durée de dix minutes était réalisée. La contraction obtenue suite au contact des anneaux avec le KCl 40 mM permettait de vérifier à nouveau l'intégrité du muscle lisse vasculaire, mais aussi de standardiser la première contraction à l'AVP. Dix minutes après l'application de KCl 40 mM dans les bains d'organes, de l'acétylcholine (ACh, 1  $\mu$ M) était administrée pour une période de dix minutes, ceci permettant de vérifier l'intégrité de l'endothélium. Une relaxation à l'ACh était obtenue lorsque l'endothélium était intact, tandis qu'aucune réponse ou une légère contraction était observée pour les anneaux dont l'endothélium avait été détruit. Le lavage des bains d'organes était effectué, puis une seconde période de stabilisation de 30 minutes précédait la suite des expérimentations.

Figure 7. Modèle des aortes isolées



**Légende figure 7 :** Les anneaux aortiques de 4 mm de longueur étaient installés dans des chambres d'organes isolés contenant 20 ml de tampon Krebs-Henseleit (composition en mM : 118 NaCl, 4 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O, 1 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 11.1 glucose) oxygéné par un mélange de 95% d'oxygène (O<sub>2</sub>) et de 5% de CO<sub>2</sub> et maintenu à une température de 37°C. Les anneaux étaient étirés entre deux crochets métalliques l'un fixe et l'autre retenu par un crochet de verre dans le bain d'organes, l'autre étant relié à un transducteur de force à l'aide d'une corde. La tension isométrique produite par les anneaux était enregistrée au niveau d'un système d'acquisition de données.

## **2. Protocoles**

### **2.1. Optimisation du protocole de tachyphylaxie à la vasopressine**

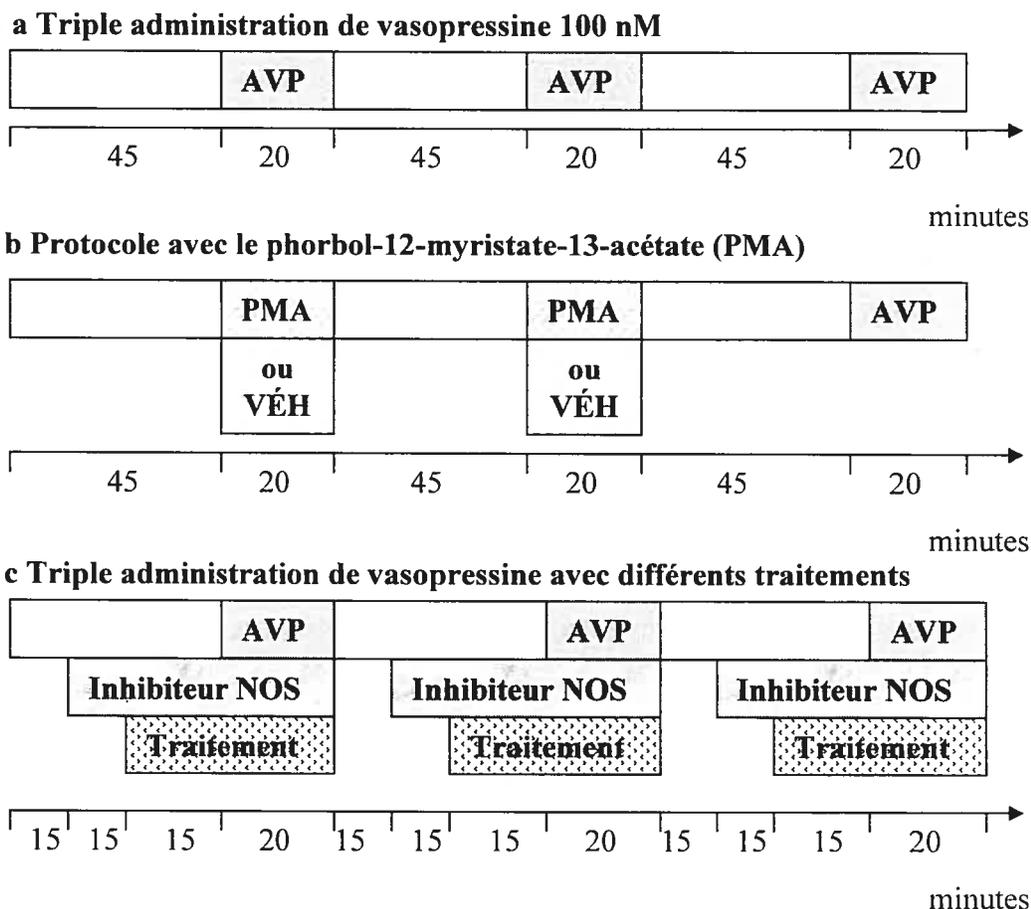
Diverses durées d'exposition à la vasopressine ainsi que plusieurs intervalles de récupération entre ces expositions ont été testés, ceci afin de déterminer un protocole optimal pour lequel la différence de tachyphylaxie entre les anneaux dont l'endothélium était intact et ceux dont l'endothélium avait été détruit est maximale. Globalement, six combinaisons différentes de durées d'exposition à l'AVP (20 ou 30 minutes) et d'intervalles de récupération (15, 30 ou 45 minutes) ont été évaluées.

### **2.2. Protocole de tachyphylaxie à la vasopressine**

Le protocole utilisé pour évaluer la tachyphylaxie à la vasopressine était celui pour lequel la différence la plus importante était obtenue entre les E+ et les E-, soit une triple administration d'AVP 100 nM d'une durée de 20 minutes chacune, ces administrations étant séparées par des intervalles de récupération de 45 minutes. Les effets de plusieurs traitements différents sur la tachyphylaxie à l'AVP ont été étudiés. Des inhibiteurs de NO synthétase, le ( $\pm$ )-2-amino-5,6-dihydro-6-méthyl-4H-1,3-thiazine (AMT, 10 nM), sélectif envers la iNOS et la nNOS, et le N- $\Omega$ -nitro-L-arginine (NNLA, 30  $\mu$ M), non sélectif envers les trois isoformes de NO synthétases, étaient tous deux administrés 30 minutes avant l'AVP. Tous les autres traitements utilisés étaient administrés 15 minutes avant l'AVP.

Ceux-ci incluaient le diclofénac (1  $\mu\text{M}$ ), un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, le clotrimazole (3  $\mu\text{M}$ ), un inhibiteur de la synthèse des EETs, le bisindolylmaléimide I (bis I, 100 nM) et la chélérythrine (3  $\mu\text{M}$ ), deux inhibiteurs de la PKC, le nitroprussiate de sodium (SNP, 10 nM), un donneur de NO, le SR141716A (1  $\mu\text{M}$ ), un antagoniste des récepteurs CB<sub>1</sub>, le SR144528 (1  $\mu\text{M}$ ), un antagoniste des récepteurs CB<sub>2</sub>, l'apamine (100 nM), un bloqueur des SK<sub>ca</sub>, l'ibériotoxine (3 nM), un bloqueur des BK<sub>ca</sub>, le glibenclamide (30  $\mu\text{M}$ ), un bloqueur des K<sub>ATP</sub> et le 4-aminopyridine (4-AP, 1 mM), un bloqueur des K<sub>v</sub> (figure 8, page 65).

**Figure 8.** Protocoles pour l'évaluation de la tachyphylaxie à l'AVP



**Légende :** Le protocole de tachyphylaxie à l'AVP consistait en une triple administration d'AVP 100 nM d'une durée de 20 minutes, chaque administration étant séparée de l'administration subséquente par une période de récupération de 45 minutes. Les inhibiteurs des NO synthétase étaient administrés 30 minutes avant l'administration d'AVP tandis que tous les autres traitements étaient administrés 15 minutes avant l'AVP. Pour vérifier l'effet d'une activation de la PKC dans la tachyphylaxie à l'AVP, les deux premières administrations d'AVP ont été remplacées par une administration de PMA, de diméthylsulfoxyde (DMSO, 0,01%) ou de Krebs-Henseleit pour certains anneaux. AVP : 8-arginine-vasopressine, 100 nM; PMA : phorbol-12-myristate-13-acétate, 0,1  $\mu$ M; VÉH : véhicule; Inhibiteur NOS : N<sup>Ω</sup>-nitro-L-arginine (NNLA), 30  $\mu$ M ou AMT 0.1 nM;

**Légende figure 8 suite :** Traitement : diclofénac 1  $\mu$ M, clotrimazole 3  $\mu$ M, Sodium nitroprussiate (SNP) 10 nM, bisindolylmaléimide I (bis I) 100 nM, chélérythrine 3  $\mu$ M, SR141716A 1  $\mu$ M, SR144528 1  $\mu$ M, apamine 100 nM, ibériotoxine 3 nM, glibenclamide 30  $\mu$ M, 4-aminopyridine (4-AP) 1 mM ou une combinaison de ces produits

### **2.3. Protocole d'activation de la protéine kinase C**

Afin d'évaluer l'implication de la PKC dans la tachyphylaxie à l'AVP, le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA), un activateur de la PKC, a été testé. Le protocole effectué à l'aide de cet agent consistait en deux administrations de PMA, de DMSO 0.01% ou de tampon Krebs-Henseleit (les véhicules du PMA ou des autres traitements utilisés) d'une durée de 20 minutes et séparées par des intervalles de récupération de 45 minutes. Ces deux administrations de PMA étaient suivies par une exposition à l'AVP 100 nM d'une durée de 20 minutes et séparée par une période de 45 minutes de la dernière administration de PMA ou de véhicule (figure 8b, page 65).

### **3. Détection de l'expression protéique des NO synthétases inductible et neuronale**

#### **3.1. Injection de lipopolysaccharides bactériens**

Des anneaux aortiques de rats traités à l'aide de lipopolysaccharides bactériens (LPS) étaient utilisés comme contrôle positif pour la détection protéique de la iNOS. Les rats étaient anesthésiés par une injection intrapéritonéale de 65 mg/kg de Somnotol® (pentobarbital sodique) et 0.7 ml/kg d'Hypnorm® (0.315 mg/ml de citrate de fentanyl et 10 mg/ml de fluanisone). Une injection intraveineuse (veine péniennne) de LPS provenant de E.Coli (sérotypé 0111 : b4, 10 mg/kg) et dilué dans du tampon Krebs-Henseleit était ensuite effectuée. Les rats étaient sacrifiés six heures après l'injection de LPS.

#### **3.2. Précipitation par affinité et immunobuvardage des NO synthétases inductible et neuronale**

Des anneaux aortiques prélevés immédiatement après le sacrifice de rats non traités, des anneaux incubés pour une durée approximative à celle des expérimentations mentionnées précédemment (7 heures) ou des anneaux exposés à une triple administration d'AVP 100 nM étaient rapidement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'au jour de leur utilisation. Les tissus étaient alors pulvérisés dans un mortier en porcelaine à l'aide d'un pilon, ceci en présence d'azote liquide. Le mortier était enfoncé dans de la glace sèche. ceci afin de conserver une température d'environ -20°C lors de cette opération.

L'extraction des protéines était effectuée à l'aide d'un tampon d'homogénéisation (Tris-HCl, pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, dithiotréitol (DTT) 1 mM, fluorure de sodium (NaF) 50 mM, tétrasodiumpyrophosphate 5 mM, phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF), 1 mM, glycérol 10%, Triton-X-100 1%, cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X) et chaque échantillon était homogénéisé à l'aide d'un polytron ajusté à la vitesse six pour dix secondes. Les échantillons étant déposés sur de la glace (température environ 4°C) lors de l'homogénéisation. Une étape de précipitation par affinité sélective pour les trois isoformes de NO synthétases était effectuée avant l'immunobuvardage, ceci afin d'améliorer la détection de l'expression protéique (Perreault & Marrette 2001). Suite à l'homogénéisation, les échantillons étaient centrifugés pendant dix minutes à 1000 x g à la température de la pièce, puis une quantification des protéines présentes dans le surnageant était effectuée grâce à un dosage utilisant l'acide bicinchonique (BCA, Pierce, Rockford, IL). Environ 500 µL de chaque échantillon, ce volume contenant environ 1000 µg de protéines totales provenant de trois aortes complètes différentes, étaient incubés pendant trois heures avec des billes de 2'5'-ADP-Sépharose 4B (Amersham, No 17-0700-01, Piscataway, NJ) à température de la pièce et sous agitation constante. Ces billes ont la propriété de se lier à la portion NADPH-dépendante des trois isoformes de NO synthétases. Suite à l'incubation, les billes étaient lavées avec du tampon phosphate (phosphate-buffered saline, TBS, pH 7.4), puis resuspendues dans du tampon Laemmli 2X. Ce mélange était centrifugé à 10 000 x g pendant une minute, puis 20 µL de surnageant de chaque échantillon était chargé sur un gel de sodium-dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide 6 % (Perreault & Marrette 2001). Suite au chargement des échantillons sur le gel, celui-ci était soumis à une électrophorèse de 100 volts (V) pour une période de 90 minutes. Un transfert sur une membrane de nitrocellulose supportée était effectué durant la nuit à une température de 4°C et à un voltage de 25 V. Un blocage des sites de liaison non spécifiques était effectué à l'aide d'une solution de lait écrémé 5% dans du tampon salin TRIS contenant 0.1% de Tween 20 (TTBS) pour la détection de la iNOS ou une solution d'albumine bovine sérique 5% dans du TTBS pour la nNOS.

Les membranes étaient par la suite incubées toute la nuit avec un anticorps monoclonal de souris anti-iNOS (1:500, BD Transduction Laboratories, no 610328; Mississauga, ON) ou avec un anticorps monoclonal de souris anti-nNOS (1:500, BD Transduction Laboratories, no 611852), ceci à une température de 4°C. Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes étaient soumises à trois lavages séquentiels avec du TTBS, puis incubées à la température de la pièce avec un anticorps secondaire de lapin IgG anti-souris lié à une peroxydase de raifort (1:10 000 dans une solution de lait écrémé 5% ou une solution d'albumine bovine sérique 5%) pendant une heure. Les membranes étaient ensuite lavées trois fois pendant dix minutes avec du TTBS, incubées avec du réactif de détection d'immunobuvardage (Amersham) et analysées directement à l'aide d'un Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

#### **4. Produits**

L'AMT et le bis I provenaient de Cedar Lane (Hornby, On, Canada), tandis que la chélérythrine provenait de RBI (Natick, MA, ÉU), que le SNP était obtenu de ICN (ICN Pharmaceuticals, Montréal, Canada) et que le SR144528 et le SR141716A provenaient de Sanofi (Sanofi Recherche, Montpellier, France). Tous les autres produits étaient obtenus de Sigma (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON, Canada). La solution-mère de clotrimazole était préparée dans de l'éthanol 95%, le diclofenac était dissous dans du NaCl 0.9%, l'apamine était dissoute dans l'acide acétique tandis que le PMA, le glibenclamide, le SR141716A et le SR144528 étaient dissous dans du DMSO. La solution-mère de vasopressine ( $2.3 \times 10^{-4}$  M) était préparée dans une solution d'acide acétique 0.2 N et d'albumine bovine sérique 0.1%. L'acétylcholine, le KCl, la chélérythrine, le bis I et l'ibériotoxine étaient tous dissous dans de l'eau distillée. Toutes les dilutions subséquentes étaient effectuées dans du tampon Krebs-Henseleit. Aucun des véhicules, aux concentrations finales obtenues, n'avait d'effet sur la contractilité des anneaux aortiques ou sur la tachyphylaxie à l'AVP.

## **5. Méthodes d'analyse des résultats**

En ce qui a trait à la présentation des résultats, la première contraction à l'AVP est exprimée en pourcentage de la contraction standard obtenue avec du KCl 40 mM, ceci afin de diminuer la variabilité inter-animale. La deuxième et la troisième contractions à l'AVP sont quant à elles exprimées en tant que pourcentage de la première contraction. Concernant les résultats obtenus avec le PMA, la contraction à la vasopressine observée est exprimée en pourcentage de la moyenne de la première contraction obtenue lors d'une triple administration de vasopressine pour le groupe correspondant, soit témoin, SNP ou NNLA. Cette transformation est effectuée afin de faciliter la comparaison des résultats. Les valeurs sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  erreur type à la moyenne. Il est à noter qu'aucun agent utilisé n'avait d'effet sur la première contraction à l'AVP, à l'exception du NNLA, qui augmentait la contractilité chez les E+ seulement, et du SNP, qui diminuait la contractilité tant chez les E+ que chez les E-.

## **6. Analyse statistique**

Lorsque plusieurs groupes devaient être comparés entre eux, une analyse de variance (ANOVA, one-way) suivie d'un test post hoc de Scheffé était utilisée. Lorsque seulement deux groupes différents devaient être comparés, un test t de Student pour échantillons non pairés était utilisé.

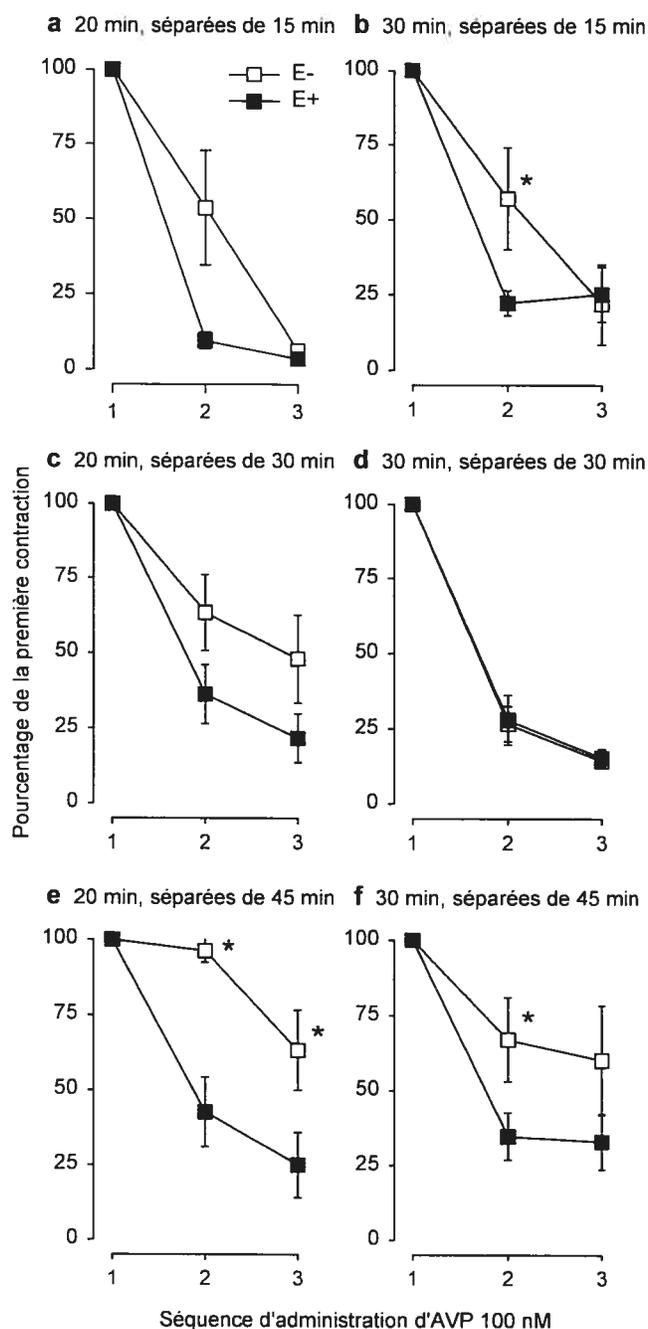
## **CHAPITRE 3**

### **RÉSULTATS**

### **1. Effets de différentes durées d'exposition à la vasopressine et de différents intervalles de récupération**

Une diminution marquée de la troisième contraction à la vasopressine, par rapport à la première contraction, était observable chez les anneaux dont l'endothélium était intact, ceci peu importe les durées d'exposition à l'AVP et les intervalles de récupération. Par contre, chez les anneaux dénudés de leur endothélium, plus la durée d'exposition à l'AVP était longue, plus la tachyphylaxie était marquée. Pour ces mêmes anneaux, plus les intervalles de récupération entre les administrations d'AVP étaient courts, plus la tachyphylaxie était importante, ceci étant particulièrement vrai pour les durées d'exposition à l'AVP plus longues (figure 9, page 73). Le protocole pour lequel la différence de tachyphylaxie à l'AVP était la plus importante fut choisi pour les expérimentations subséquentes.

**Figure 9.** Effets de différentes durées d'exposition à l'AVP et de différents intervalles de récupération sur la tachyphylaxie à l'AVP



**Légende :** Les effets de diverses durées d'exposition à de la vasopressine 100 nM et de divers intervalles de récupération sur la contraction d'anneaux aortiques dont l'endothélium est intact (■) et d'anneaux dénudés de leur endothélium (□) sont représentés.

**Légende figure 9 suite :** La deuxième et la troisième contraction à la vasopressine sont exprimées en pourcentage de la première contraction. Une combinaison de deux différentes durées d'exposition (20 minutes pour **a**, **c** et **e**; 30 minutes pour **b**, **d** et **f**) et de trois différents intervalles de récupération (15 minutes pour **a** et **b**, 30 minutes pour **c** et **d** et 45 minutes pour **e** et **f**) ont été testés. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur type à la moyenne de 5 à 10 anneaux aortiques. \*  $p < 0.05$  E+ vs E-

## **2. Contribution des cannabinoïdes à la tachyphylaxie à la vasopressine**

Lors d'une triple administration d'AVP 100 nM, chaque administration durant 20 minutes et étant séparée de l'administration précédente par une période de 45 minutes, la première contraction à cette hormone était de  $17 \pm 2$  mN chez les E+ et de  $27 \pm 1$  mN chez les E-. En comparaison avec la première contraction, la troisième contraction à l'AVP était de  $15 \pm 2\%$  et de  $46 \pm 8\%$  chez les E+ et les E-, respectivement. L'antagoniste des récepteurs CB<sub>1</sub>, le SR141716A, ainsi que l'antagoniste des récepteurs CB<sub>2</sub>, le SR144528, n'avaient aucun effet sur la tachyphylaxie à l'AVP, tant chez les E+ que chez les E-. De plus, la combinaison de SR141716A ou de SR144528 avec le NNLA n'avait pas d'effets additifs par rapport au NNLA seul, ceci tant chez les E+ que chez les E- (tableau V, page 75).

**Tableau V.** Contribution des cannabinoïdes à la tachyphylaxie à l'AVP

	E+			E-		
	N	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>e</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )	N	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>e</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )
DMSO	10	1.48 ± 0.22	26 ± 9*	7	1.40 ± 0.15	59 ± 11*
+ NNLA	6	1.30 ± 0.08	46 ± 16*	3	1.27 ± 0.04	41 ± 19*
SR141716A	9	1.23 ± 0.22	38 ± 10*	8	1.34 ± 0.09	53 ± 14*
+ NNLA	7	1.27 ± 0.19	52 ± 16*	-	-	-
SR144528	6	1.32 ± 0.39	26 ± 9*	7	1.59 ± 0.29	59 ± 11*
+ NNLA	6	1.31 ± 0.39	25 ± 5*	4	1.50 ± 0.03	78 ± 7*

†p<0.05, en comparaison avec le témoin correspondant

\*p<0.05, en comparaison avec la première contraction à l'AVP

### 3. Contribution des prostaglandines et des acides époxyeicosatriénoïques à la tachyphylaxie à la vasopressine en présence de NO

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par le diclofénac n'avait aucun effet sur la tachyphylaxie à la vasopressine, ni chez les E+, ni chez les E-. De même, l'inhibition de la synthèse des acides époxyeicosatriénoïques par le clotrimazole ne diminuait pas la tachyphylaxie à l'AVP de manière significative, tant chez les E+ que chez les E-. Par contre, l'inhibition concomitante de la synthèse des prostaglandines et des EETs par la combinaison diclofénac-clotrimazole diminuait la tachyphylaxie à l'AVP, ceci chez les E+ seulement (tableau VI, page 76).

#### 4. Contribution des prostaglandines et des acides époxyeicosatriénoïques à la tachyphylaxie à la vasopressine en absence de NO

L'exposition au NNLA 30  $\mu$ M entraînait une réduction marquée de la tachyphylaxie à l'AVP chez les E+ et chez les E- ( $p = 0.001$  et  $p = 0.020$ , respectivement). Lors de l'ajout de diclofénac, de clotrimazole ou de ces deux agents au NNLA, aucun effet additif par rapport au NNLA seul ne pouvait être observé, ceci tant chez les E+ que chez les E- (tableau VI, page 76).

**Tableau VI.** Contribution des prostaglandines et des EETs à la tachyphylaxie à l'AVP en présence et en absence de NO

	E+			E-		
	N	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>e</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )	N	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>e</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )
Témoins	14	0.89 $\pm$ 0.01	15 $\pm$ 2*	14	1.36 $\pm$ 0.05	46 $\pm$ 8*
NNLA	8	1.41 $\pm$ 0.09†	67 $\pm$ 12*†	7	1.43 $\pm$ 0.05	86 $\pm$ 6†
Clotrimazole	6	0.72 $\pm$ 0.11	41 $\pm$ 18*	6	1.30 $\pm$ 0.09	59 $\pm$ 10*
+ NNLA	6	1.44 $\pm$ 0.06†	80 $\pm$ 7*†	6	1.32 $\pm$ 0.05	99 $\pm$ 2†
Diclofénac	5	0.51 $\pm$ 0.17	26 $\pm$ 8*	6	1.26 $\pm$ 0.11	52 $\pm$ 14*
+ NNLA	6	1.14 $\pm$ 0.08	45 $\pm$ 11*	6	1.22 $\pm$ 0.10	75 $\pm$ 11
Clotrimazole + Diclofénac	6	0.81 $\pm$ 0.19	54 $\pm$ 19*†	6	1.47 $\pm$ 0.10	71 $\pm$ 13
+ NNLA	6	1.41 $\pm$ 0.09†	92 $\pm$ 6†	6	1.34 $\pm$ 0.08	90 $\pm$ 8†

† $p < 0.05$ , en comparaison avec le témoin correspondant

\* $p < 0.05$ , en comparaison avec la 1<sup>ère</sup> contraction à l'AVP

## 5. Contribution des canaux potassiques à la tachyphylaxie à la vasopressine

Le blocage des SK<sub>ca</sub> par l'apamine ou le blocage des BK<sub>ca</sub> par l'ibériotoxine n'avait aucun effet sur la tachyphylaxie à la vasopressine, ni chez les E+, ni chez les E-. De plus, le blocage concomitant des BK<sub>ca</sub> et des SK<sub>ca</sub> par une combinaison apamine-ibériotoxine n'entraînait aucun effet significatif pour les E+ et les E-. L'administration d'apamine, d'ibériotoxine ou d'une combinaison de ces deux agents de manière concomitante avec le NNLA n'avait aucun effet, tant chez les E+ que chez les E-. D'autre part, le blocage des K<sub>ATP</sub> par le glibenclamide ne permettait pas de diminuer la tachyphylaxie à l'AVP chez les E+, ni chez les E-. Par contre, l'administration de 4-aminopyridine (4-AP), un bloqueur des K<sub>v</sub>, diminuait significativement la tachyphylaxie à l'AVP chez les E-, cet agent étant sans effet chez les E+ (tableau VII, page 77).

**Tableau VII.** Contribution des canaux potassiques à la tachyphylaxie à l'AVP

	E+			E-		
	n	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>e</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )	n	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>ème</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )
Témoins	8	1.00 ± 0.19	20 ± 3*	11	1.43 ± 0.19	41 ± 9*
Glibenclamide	6	0.88 ± 0.14	25 ± 14*	7	1.35 ± 0.04	44 ± 12*
4-AP	5	0.61 ± 0.15	21 ± 9*	8	1.60 ± 0.17	84 ± 6*†
Apamine	12	1.06 ± 0.18	18 ± 4*	12	1.41 ± 0.17	30 ± 11*
+ NNLA	7	1.30 ± 0.14	60 ± 14*	-	-	-
Ibériotoxine	9	1.34 ± 0.25	33 ± 14*	7	1.29 ± 0.26	46 ± 15*
+ NNLA	6	1.41 ± 0.11	33 ± 12*	-	-	-
Apamine + Ibériotoxine	7	1.56 ± 0.21	34 ± 12*	7	1.37 ± 0.23	40 ± 14*
+ NNLA	6	1.52 ± 0.17	34 ± 9*	-	-	-

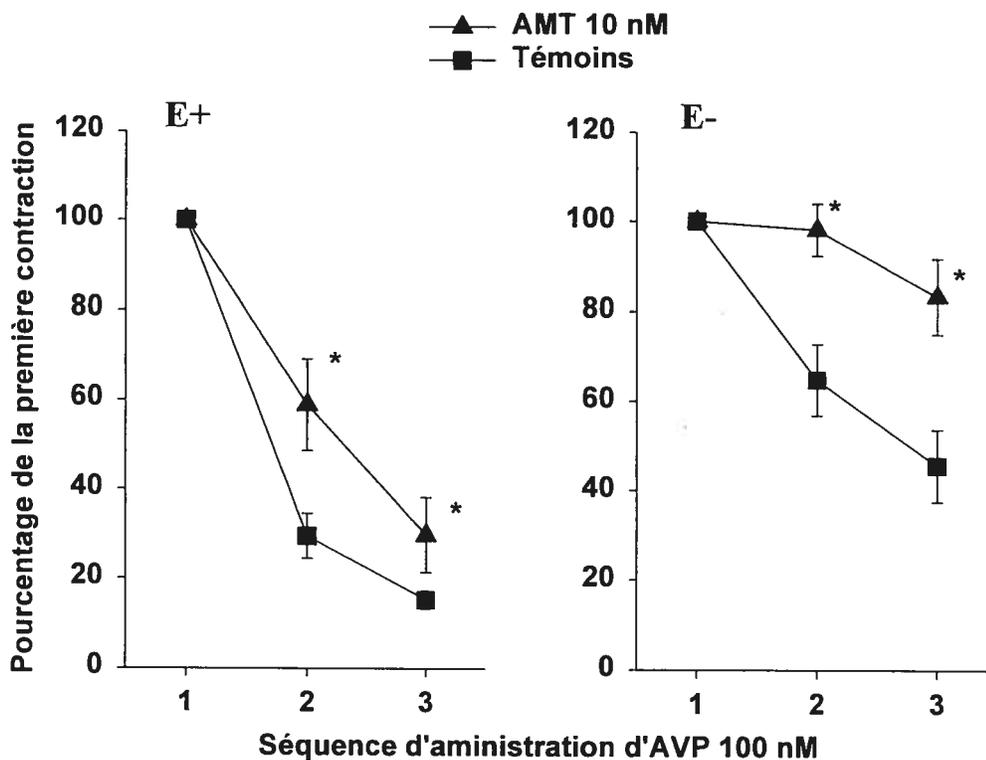
†p<0.05, en comparaison avec le témoin correspondant

\*p<0.05, en comparaison avec la 1<sup>ère</sup> contraction à l'AVP

## **6. Contribution des NO synthétases neuronale et inducible à la tachyphylaxie à la vasopressine**

Les résultats obtenus avec le NNLA chez les E- suggéraient qu'une ou plusieurs isoformes de NO synthétases pouvaient être présente(s) au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires d'aorte, cette ou ces isoforme(s) pouvant participer à la tachyphylaxie à l'AVP. Des expérimentations ont donc été effectuées avec de l'AMT 10 nM, un inhibiteur plus sélectif envers les isoformes neuronale et inducible de NO synthétases, ceci afin d'éliminer l'hypothèse de la présence de NO synthétase endothéliale au niveau du muscle lisse vasculaire. L'AMT diminuait la tachyphylaxie à l'AVP, tant chez les E+ que chez les E- ( $p= 0.041$  et  $p= 0.004$ , respectivement), mais de façon plus marquée chez les E-, ce qui concorde avec l'hypothèse de la présence d'une NO synthétase autre que la eNOS au niveau du muscle lisse vasculaire aortique (figure 10, page 79).

**Figure 10.** Contribution des NO synthétases inductible et neuronale à la tachyphylaxie à l'AVP



**Légende :** La figure 10 représente le pourcentage de contraction à la vasopressine en comparaison avec la première contraction obtenue lors d'une triple administration de [Arg]<sup>8</sup>-vasopressine (AVP) 100 nM. Le panneau de gauche représente les résultats obtenus avec des anneaux dont l'endothélium est intact, tandis que le panneau de droite représente les résultats obtenus avec des anneaux dénudés de leur endothélium. \*p < 0,05 AMT par rapport au témoin correspondant.

## **7. Expression protéique des NO synthétases inductible et neuronale au niveau du muscle lisse vasculaire aortique de rat**

Des immunobuvardages pour la iNOS et la nNOS ont été effectuées afin de déterminer quelle(s) isoforme(s) de NO synthétase(s) était impliquée dans la tachyphylaxie à la vasopressine au niveau du muscle lisse vasculaire. En ce qui a trait à l'expression de la iNOS, des anneaux prélevés immédiatement après le sacrifice de rats (contrôle négatif), des anneaux exposés à une triple administration d'AVP et des anneaux de rats traités au LPS (contrôle positif) étaient utilisés. Aucun signal ne put être détecté concernant la iNOS au niveau des anneaux aortiques fraîchement prélevés, ni au niveau des anneaux exposés à une triple administration d'AVP, malgré une forte expression de cette protéine pour les anneaux isolés de rats traités au LPS (figure 11, page 81). L'expression protéique de nNOS fut évaluée au niveau d'anneaux prélevés immédiatement après le sacrifice de rats et d'anneaux exposés à une triple administration d'AVP. Dans ce cas-ci, le contrôle positif était un extrait d'hypophyse de rats (BD Transduction Laboratories). Des bandes pour cette protéine (à une hauteur d'environ 160 kDa) furent obtenues pour les anneaux fraîchement prélevés, les anneaux exposés à une triple administration d'AVP et au niveau de l'extrait d'hypophyse de rats (figure 11, page 81).

**Figure 11.** Expression protéique de la iNOS et de la nNOS au niveau du muscle lisse vasculaire aortique de rat. Chaque puits renferme des protéines extraites de trois aortes de rats.

## iNOS



**Sacrifice LPS AVP**

## nNOS



**Contrôle AVP Sacrifice**  
+

**Légende :** La figure 11 représente l'expression de la NO synthétase inductible (iNOS, panneau supérieur) et de la NO synthétase neuronale (nNOS, panneau inférieur) au niveau d'aortes de rats. Pour l'expression de la iNOS, le contrôle négatif est une aorte prélevée immédiatement après le sacrifice du rat sans aucun traitement et le contrôle positif est une aorte prélevée six heures après l'injection de lipopolysaccharides bactériens à un rat. Pour l'expression de la nNOS, le contrôle positif est un extrait d'hypophyse de rat et le sacrifice correspond comme pour la iNOS à une aorte prélevée immédiatement après le sacrifice du rat sans aucun traitement. Dans les deux cas, AVP signifie l'exposition de l'aorte à une triple administration de vasopressine 100 nM.

## 8. Contribution de la protéine kinase C à la tachyphylaxie à la vasopressine

L'inhibition de la protéine kinase C (PKC), tant par la chébérythrine que par le bis I, entraînait une diminution significative de la tachyphylaxie à l'AVP chez les E-, tandis qu'aucun effet n'était obtenu chez les E+. La combinaison de la chébérythrine ou du bis I avec du NNLA n'avait pas d'effets additifs par rapport au NNLA, à la chébérythrine ou au bis I chez les E-. Les associations chébérythrine-NNLA ou bis I-NNLA n'avaient aucun effet additif par rapport au NNLA seul chez les E+. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans cette série expérimentale, le NNLA diminuait tellement la tachyphylaxie à l'AVP en lui-même qu'il devenait difficile de mettre en évidence un effet supplémentaire. L'association de la chébérythrine ou du bis I avec du SNP entraînait une perte de l'effet de diminution de la tachyphylaxie par ces inhibiteurs de la PKC chez les E-. Chez les E+, l'association du SNP avec chacun des deux inhibiteurs de PKC n'avait aucun effet significatif (tableau VIII, page 82).

**Tableau VIII.** Contribution de la PKC à la tachyphylaxie à l'AVP en présence et en absence de NO

	E+			E-		
	N	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>ème</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )	N	1 <sup>ère</sup> contraction (AVP/KCl)	3 <sup>ème</sup> contraction (% de 1 <sup>ère</sup> )
Témoins	7	0.83 ± 0.12	27 ± 7*	6	1.49 ± 0.04	78 ± 4*
NNLA	5	1.05 ± 0.1	59 ± 13*	5	1.65 ± 0.30	93 ± 3*
SNP	5	0.36 ± 0.14	16 ± 5	5	0.56 ± 0.12	31 ± 10
Chébérythrine	6	0.88 ± 0.14	19 ± 5*	5	1.76 ± 0.18	95 ± 5 †
+ NNLA	6	1.04 ± 0.12	70 ± 10*	5	1.84 ± 0.49	103 ± 6
+ SNP	6	0.43 ± 0.13	25 ± 9	6	0.88 ± 0.18	21 ± 9*
Bis I	6	0.86 ± 0.04	50 ± 11*	4	1.31 ± 0.16	113 ± 4 †
+ NNLA	5	1.24 ± 0.07	70 ± 10*	4	1.84 ± 0.49	103 ± 6
+ SNP	6	0.34 ± 0.06	27 ± 9	6	0.88 ± 0.18	21 ± 9*

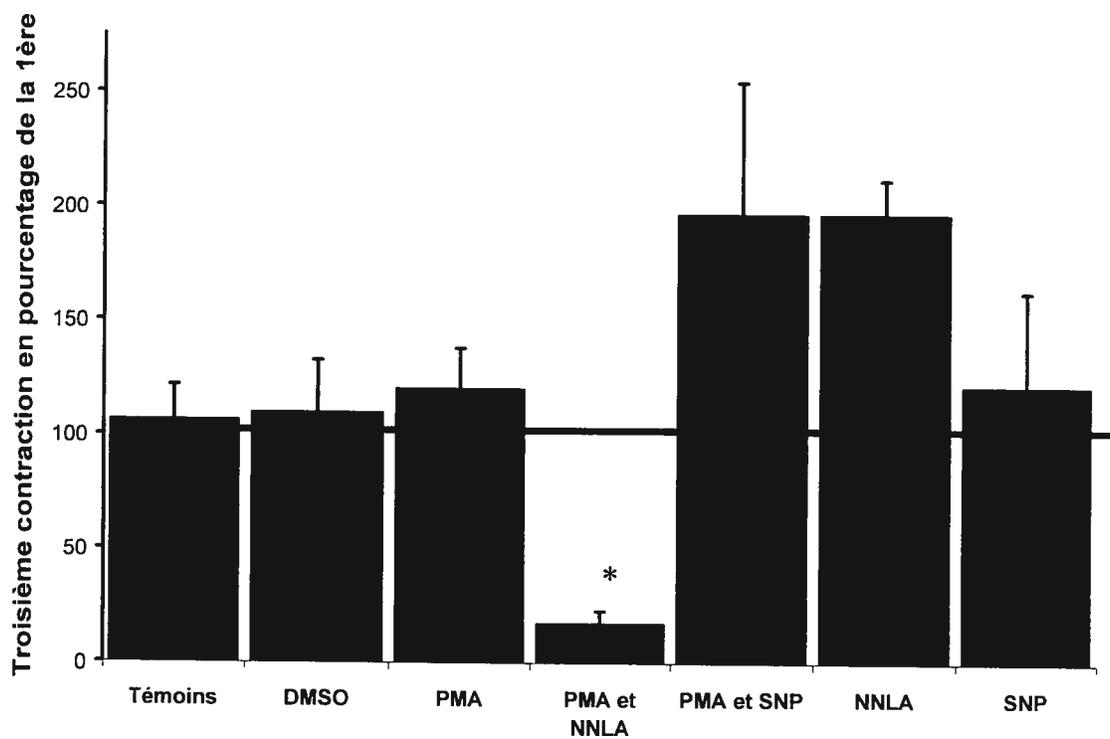
†p<0.05, en comparaison avec le témoin correspondant

\*p<0.05, en comparaison avec la 1<sup>ère</sup> contraction à l'AVP

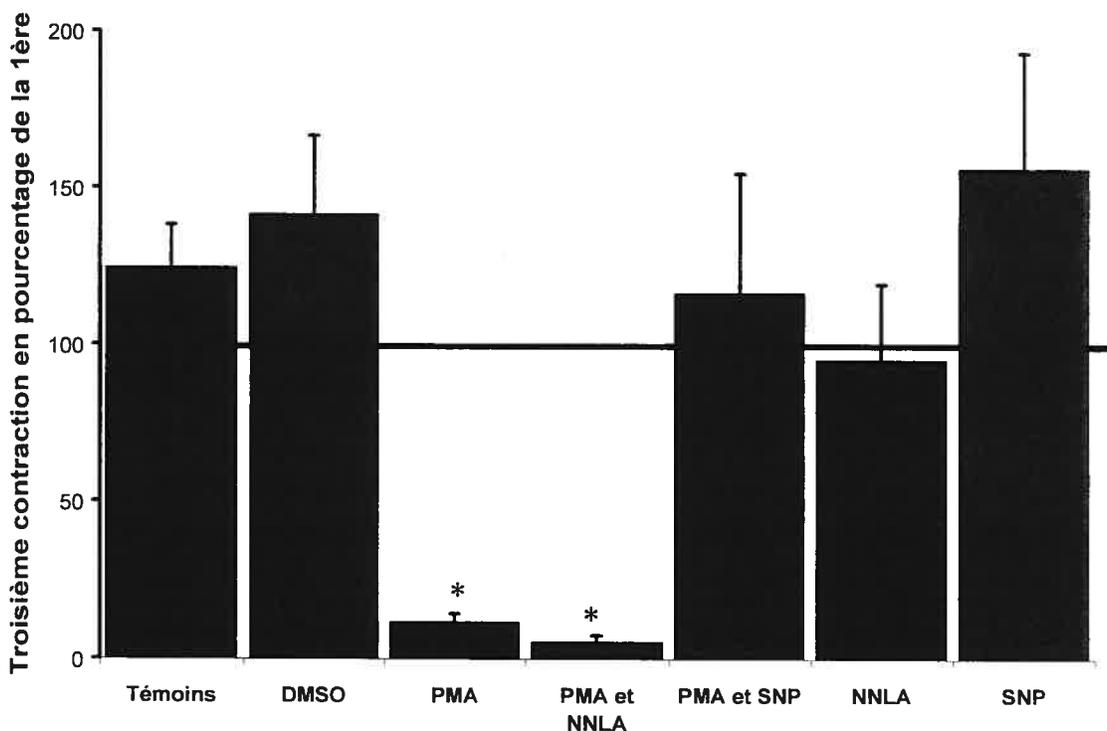
L'exposition des anneaux aortiques au PMA, un activateur de la PKC, mimait la tachyphylaxie à la vasopressine, ceci seulement chez les anneaux dont l'endothélium avait été dénudé. Cet agent n'avait aucun effet significatif chez les anneaux dont l'endothélium était intact. L'association du PMA avec du NNLA n'avait pas d'effets additifs par rapport au PMA seul chez les E-. De plus, cette association mimait la tachyphylaxie à l'AVP chez les E+. La combinaison du SNP avec le PMA n'était pas différente du SNP ou du PMA seuls chez les E+. Par contre, cette association entraînait une perte des effets de diminution de la réponse à l'AVP par le PMA chez les E- (figure 12, pages 84 et 85).

**Figure 12.** Contribution de la PKC à la tachyphylaxie à l'AVP en présence et en absence de NO.

**a PMA, NNLA et SNP chez les E+**



### b PMA, NNLA et SNP chez les E-



**Légende :** La figure 12 a (chez les E+) et la figure 12 b (chez les E-) représentent la contraction obtenue avec une exposition de 20 minutes à l'AVP 100 nM, ceci suite à deux expositions soit à du tampon Krebs-Henseleit (témoins), à du diméthylsulfoxyde (DMSO), ou à du phorbol-12-myristate-13-acétate. De plus, certains anneaux ont été traités à l'aide de N- $\omega$ -nitro-L-arginine (NNLA) ou du sodium nitroprussiate (SNP) 30 et 15 minutes respectivement avant les deux expositions au PMA, au DMSO, au Krebs ainsi qu'avant l'exposition à l'AVP. La contraction à l'AVP est exprimée en pourcentage de la première exposition à l'AVP d'un groupe correspondant (témoins, NNLA ou SNP; ceci parce que le PMA et le salin ne causent pas de contraction). Une diminution significative de la réponse à l'AVP après deux expositions au PMA, comparativement à la réponse observée lors d'une première exposition à l'AVP dans les mêmes conditions expérimentales (100%), peut être considérée comme une tachyphylaxie mimée par le PMA. \*  $p < 0.05$  vs témoin correspondant (témoin, NNLA ou SNP).

## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS**

## 1. Discussion

Lors de mon projet de maîtrise, nous avons observé que des variations dans la durée d'exposition à la vasopressine ou au niveau des intervalles de récupération entre ces expositions avaient peu d'effets sur la tachyphylaxie à cette hormone chez les anneaux dont l'endothélium était intact. Par contre, une augmentation des durées d'exposition à l'AVP ou une diminution des intervalles de récupération contribuaient à augmenter la tachyphylaxie à cette hormone chez les anneaux dénudés de leur endothélium. Nous avons de même démontré que les cannabinoïdes n'avaient pas de rôle à jouer dans la tachyphylaxie à la vasopressine des aortes de rats. Les résultats obtenus au cours de ce projet suggèrent que les prostaglandines et les EETs n'auraient un effet dans la tachyphylaxie à l'AVP que lors de leur association. Le NO serait le principal facteur endothélial impliqué dans la tachyphylaxie à la vasopressine, tant chez les anneaux intacts que pour les anneaux dénudés. La présence d'une NO synthétase neuronale constitutive pourrait expliquer l'effet du NO au niveau du muscle lisse vasculaire aortique. Au meilleur de nos connaissances, il s'agit de la première fois qu'une implication physiologique est rapportée en ce qui a trait à une nNOS constitutive au niveau du muscle lisse vasculaire aortique. Finalement, nous avons observé que la protéine kinase C était impliquée dans la tachyphylaxie à l'AVP seulement en absence d'endothélium, le NO semblant diminuer les effets de cette kinase.

### 1.1. Cinétique de désensibilisation et de resensibilisation du récepteur $V_{1a}$ à l'AVP

Au cours de mon projet de maîtrise, nous avons pu observer que les durées d'exposition à la vasopressine et les intervalles de récupération entre les administrations de celle-ci avaient peu d'effets sur la tachyphylaxie à cette hormone chez les anneaux intacts. Toutefois, une diminution des intervalles de récupération ou une augmentation des durées d'exposition à l'AVP augmentaient de manière marquée la tachyphylaxie à cette hormone chez les anneaux dénudés. Ceci suggère que l'endothélium aurait un rôle à jouer dans la resensibilisation des récepteurs  $V_{1a}$  plutôt que dans leur désensibilisation. La cinétique de désensibilisation et de resensibilisation des récepteurs  $V_{1a}$  n'est pas parfaitement connue à ce jour. Néanmoins, il a été rapporté dans la littérature, que la désensibilisation de ces récepteurs surviendrait en cinq minutes au niveau de cellules musculaires lisses aortiques de rats en culture, cette désensibilisation étant semi-maximale après dix minutes et maximale à trente minutes (Grier, III et al. 1989; Nambi et al. 1989). La resensibilisation serait quant à elle presque complète après une à deux heures suite à l'arrêt de l'exposition du récepteur  $V_{1a}$  à l'AVP au niveau d'oocytes de *Xenopus* (Ancellin & Morel 1998; Nathanson et al. 1994). Cette cinétique de resensibilisation concorde avec une réponse à l'AVP moins importante après trente minutes de stabilisation qu'après 45 minutes et pourrait expliquer le retour partiel de la sensibilité à l'AVP après 45 minutes chez les E-. Des périodes de resensibilisation beaucoup plus longues, pouvant aller jusqu'à 24 heures, ont été rapportées pour les cellules WRK1 (Cantau et al. 1988). Ces différences pourraient s'expliquer par des variations inter-espèces ou des variations au niveau des protocoles utilisés. De plus amples études devront être effectuées afin de déterminer de façon précise la cinétique et les processus d'internalisation, de séquestration et de recyclage à la membrane des récepteurs  $V_{1a}$ .

## 1.2. Désensibilisation croisée AVP-phényléphrine

Il est à noter que la désensibilisation des récepteurs  $V_{1a}$  au niveau des aortes de rats est probablement un phénomène se produisant au niveau du récepteur lui-même, plutôt qu'un phénomène post-récepteur. En effet, des expérimentations évaluant la désensibilisation croisée de la phényléphrine et de la vasopressine ont été effectuées dans le laboratoire du Dr Daniel Lamontagne avant mon arrivée (données non publiées). Ces expérimentations consistaient en une administration de phényléphrine 100  $\mu$ M, suivie de deux administrations de vasopressine 100 nM, puis d'une seconde administration de phényléphrine 100  $\mu$ M. Toutes ces administrations duraient vingt minutes et étaient séparées par des intervalles de récupération de 45 minutes. La première administration de phényléphrine entraînait une diminution de moitié de la réponse subséquente à l'administration de vasopressine. La deuxième administration d'AVP était quant à elle de l'ordre de 3 à 5 %. Cependant, l'administration de phényléphrine suivant les deux administrations d'AVP entraînait une réponse équivalente à la première administration de phényléphrine. Ceci suggère que la désensibilisation à l'AVP serait dépendante de certaines voies de signalisation communes à cette hormone et à la phényléphrine. Par contre, la désensibilisation à l'AVP ne serait pas due à une altération de ces voies de signalisation, une réponse normale à la phényléphrine pouvant être obtenue suite aux deux administrations d'AVP. Ceci suggère que la désensibilisation à l'AVP n'est pas causée par une déplétion des réserves intracellulaires d'inositols phosphates ou de calcium. D'autres auteurs ont démontré que la déplétion des réserves intracellulaires d'inositols phosphates n'était pas impliquée dans la tachyphylaxie à l'AVP (Ancellin & Morel 1998; Cantau et al. 1988). De plus, plusieurs études démontrent que des altérations ou des variations en ce qui a trait au calcium intracellulaire n'étaient pas non plus impliquées dans la tachyphylaxie à l'AVP (Ancellin & Morel 1998; Ancellin et al. 1999; Ancellin et al. 1997; Nathanson et al. 1994).

Néanmoins, certains auteurs ont observé l'implication d'une déplétion des réserves intracellulaires d'inositols phosphates dans la désensibilisation à l'AVP (Grier, III et al. 1989; Nambi et al. 1989). Ces études étant réalisées en culture cellulaire, les mécanismes de désensibilisation pourraient différer des études menées sur des organes isolés. Une hypothèse possible serait que des cellules musculaires lisses isolées en culture utilisent tous les substrats présents dans le milieu, par manque d'enzymes nécessaire à leur apport, tandis qu'il serait possible à ces substrats de se régénérer au niveau de vaisseaux isolés ou d'autres systèmes d'expression en culture.

### **1.3. Rôle des cannabinoïdes dans la tachyphylaxie à l'AVP**

Les résultats obtenus lors de mon projet de maîtrise rejettent l'hypothèse d'une implication des cannabinoïdes à la tachyphylaxie à l'AVP. En effet, un blocage des récepteurs CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> n'avait aucun effet sur la désensibilisation à l'AVP. De plus, l'inhibition de la synthèse de NO en concomitance avec l'administration d'antagonistes aux cannabinoïdes ne démasquait pas un rôle de ceux-ci dans la tachyphylaxie à l'AVP. Il a été rapporté dans la littérature que les cannabinoïdes peuvent produire une désensibilisation homologue de leurs propres récepteurs, ce qui serait responsable du phénomène de tolérance observé avec le delta-9-tétrahydrocannabinol, ainsi qu'une désensibilisation hétérologue des récepteurs à l'adénosine (Ruibno et al. 2000; Kouznetsova et al. 2002). Les mécanismes de désensibilisation homologue induite par les cannabinoïdes comprennent le recrutement d'arrestines, tandis que la désensibilisation hétérologue des récepteurs à l'adénosine pourrait être médiée par une augmentation des taux intracellulaires d'AMPc causée par les cannabinoïdes (Ruibno et al. 2000; Kouznetsova et al. 2002). Suite à une revue non exhaustive de la littérature, il semble que les cannabinoïdes ne soient impliqués dans aucun autre phénomène de désensibilisation. Il est à noter que lors de nos expérimentations concernant les cannabinoïdes, ceux-ci étaient encore considérés comme des candidats potentiels pour le rôle d'EDHF.

Dans l'année suivant ces expérimentations, plusieurs données expérimentales provenant de partout à travers le monde ont réfuté cette hypothèse (Harris et al. 1999; McGuire et al. 2001; White & Hiley 1997).

#### **1.4. Rôle du NO dans la tachyphylaxie à l'AVP**

L'inhibition de la synthèse de NO par le NNLA diminuait de manière marquée la tachyphylaxie à l'AVP, tant chez les anneaux intacts que chez les anneaux dénudés. Ceci suggère un rôle important du NO dans la tachyphylaxie à l'AVP au niveau des aortes de rats. Les résultats obtenus lors de mon projet de maîtrise confirment ceux obtenus lors d'une étude antérieure accomplie dans le laboratoire du Dr Lamontagne, lors de laquelle il fut découvert que le NO était le médiateur principal dans la tachyphylaxie à l'AVP plus prononcée chez les E+ que chez les E- (Millette & Lamontagne 1996). Le monoxyde d'azote a également été impliqué dans d'autres désensibilisations endothélium-dépendantes, dont celle du récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique chez le rat conscient. Contrairement à notre étude, certains auteurs ont démontré que le monoxyde d'azote n'était pas impliqué dans la tachyphylaxie endothélium-dépendante des récepteurs à l'angiotensine II (AngII) (de Haas et al. 2002; Jerez et al. 2001). Dans cette étude, les prostaglandines et un produit du cytochrome P-450 étaient les médiateurs majeurs de cette tachyphylaxie. Une explication possible concernant les différences entre les études sont les variations inter-espèces en ce qui a trait à la production et/ou la contribution de l'EDHF ou des EETs. Malgré le fait que l'AVP peut augmenter la libération de NO dans certains lits vasculaires, il est peu probable que la tachyphylaxie endothélium-dépendante observée au cours de mon projet de maîtrise soit due à ce phénomène (Howl & Wheatley 1995). En effet, une étude a été réalisée dans le laboratoire du Dr Lamontagne avant mon arrivée, cette étude évaluant l'effet de l'AVP sur la production de NO au niveau d'anneaux aortiques de rats (Millette & Lamontagne 1996). Il ne fut alors pas possible de détecter une augmentation de la libération de NO suite à une exposition à l'AVP (Millette & Lamontagne 1996).

De plus, il était possible de mimer la tachyphylaxie à l'AVP chez les E- en exposant ces anneaux au SNP, ce qui simule une libération basale de NO (Millette & Lamontagne 1996). Par conséquent, la tachyphylaxie à l'AVP plus prononcée chez les E+ que chez les E- serait due à une libération basale de NO au niveau des anneaux aortiques isolés de rats, et non pas à une augmentation de la libération de NO suite à une exposition à l'AVP. Un mécanisme possible de désensibilisation du récepteur  $V_{1a}$  par le NO est une diminution de la palmitoylation de ce récepteur par cette molécule. En effet, le NO peut interférer avec la palmitoylation ou entraîner la dépalmitoylation de certaines protéines en interagissant avec celles-ci pour former des liens nitroso-cystéine (Adam & Bouvier 1999). L'interférence avec la palmitoylation peut également être indirecte et dépendre du statut énergétique cellulaire (Bizzozero et al. 2001). La palmitoylation a été rapportée en ce qui a trait aux récepteurs  $V_{1a}$  et il a été démontré qu'un défaut dans ce processus augmentait l'internalisation et la séquestration de ces récepteurs. Cette diminution de la palmitoylation du récepteur  $V_{1a}$  diminuerait également le degré de phosphorylation de celui-ci par différentes kinases.

### **1.5. Rôle des prostaglandines et des EETs dans la tachyphylaxie à l'AVP**

La contribution des prostaglandines et des EETs à la tachyphylaxie à l'AVP semble faible, étant donné le fait que l'administration de diclofénac ou de clotrimazole seuls n'avait aucun effet sur la désensibilisation à cette hormone. Seule l'inhibition simultanée de la synthèse des prostaglandines et des EETs entraînait une diminution de la tachyphylaxie à l'AVP. Par contre, lors de l'inhibition de la synthèse de NO, la contribution de ces facteurs endothéliaux semblait accentuée, malgré un effet non significatif des combinaisons diclofénac-NNLA, clotrimazole-NNLA ou diclofénac-clotrimazole-NNLA par rapport au NNLA seul. Ceci peut s'expliquer par le fait que le NNLA diminuait tellement la tachyphylaxie en lui-même qu'il devenait difficile de mettre en évidence un effet supplémentaire. De plus, les expérimentations étaient réalisées au niveau de l'aorte, qui est une grosse artère de conductance.

Il a été observé que la synthèse des prostaglandines et des EETs était peu importante au niveau des vaisseaux de conductance et augmentait graduellement au niveau des petites artères de résistance (Medhora et al. 2001). Les résultats obtenus auraient donc pu différer si les expérimentations avaient été réalisées au niveau d'artères de résistance, par exemple au niveau des artères mésentériques. Il est possible de faire un parallèle entre les résultats mentionnés plus haut et le phénomène de vasodilatation. En effet, le principal médiateur de la vasodilatation au niveau des gros troncs artériels est le NO, tandis que la contribution des EETs ou de l'EDHF augmente dans les petites artères de résistance (De Wit et al. 2000). Certaines prostaglandines ont été impliquées dans la désensibilisation homologue de leur propre récepteur et hétérologue de plusieurs récepteurs, dont les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par la PGE<sub>2</sub>, le récepteur TP $\alpha$  aux thromboxanes et le récepteur canal nicotinique par la PGD<sub>2</sub> (Mehats et al. 2001; Foley et al. 2001; Nojima et al. 2000). Les prostaglandines et les EETs pourraient tous deux être impliqués dans la désensibilisation endothélium-dépendante des récepteurs à l'angiotensine II (de Haas et al. 2002; Jerez et al. 2001). Les mécanismes possibles de désensibilisation du récepteur V<sub>1a</sub> par les prostaglandines pourraient impliquer une phosphorylation directe ou indirecte de ce récepteur par la protéine kinase C ou la protéine kinase A, selon le type de prostaglandines synthétisées. La phosphorylation indirecte du récepteur V<sub>1a</sub> par l'une ou l'autre de ces kinases aurait lieu via une activation des GRKs par phosphorylation de celles-ci (Mehats et al. 2001; Laporte et al. 1998). La désensibilisation du récepteur V<sub>1a</sub> par les EETs pourrait également être médiée par la PKA, mais plus probablement par un autre mécanisme, étant donné les effets synergiques de l'inhibition concomitante de la synthèse des prostaglandines et des EETs dans la tachyphylaxie à l'AVP (Wong et al. 2000; Imig et al. 1999). Cet autre mécanisme pourrait être la phosphorylation du récepteur V<sub>1a</sub> par une tyrosine kinase cytosolique de la famille src (Hoebel & Graier 2003; Chen et al. 1998).

## 1.6. Rôle des courants potassiques dans la tachyphylaxie à l'AVP

Les résultats observés au cours de mon projet de maîtrise suggèrent que seuls les canaux potassiques dépendants du voltage et sensibles au 4-aminopyridine ( $K_v$ ) sont impliqués dans la tachyphylaxie à la vasopressine au niveau des aortes de rats, ceci seulement chez les anneaux dénudés de leur endothélium. Il a été rapporté dans la littérature que l'inhibition des canaux  $K_v$  pouvait inhiber la désensibilisation induite par les agonistes de certains récepteurs, dont les récepteurs canaux nicotiques (Brazil et al. 1989). De plus, l'activation de certains canaux potassiques serait responsable de la tachyphylaxie à l'angiotensine II au niveau de l'iléon de cochon d'Inde. Le mécanisme de désensibilisation de la réponse à l'angiotensine II par des canaux potassiques serait une repolarisation cellulaire, qui entraînerait la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage responsables de l'influx calcique maintenant la contraction (Silva et al. 1999). Tel que mentionné auparavant, le NO pourrait activer entre autres les canaux potassiques dépendants du voltage (Li et al. 1997). Une hypothèse possible concernant les effets différentiels du 4-aminopyridine sur la tachyphylaxie à l'AVP chez les E- par rapport aux E+ pourrait être qu'une faible production de NO par la nNOS pourrait activer les canaux  $K_v$ , ceux-ci pouvant participer à la désensibilisation à l'AVP chez les E-. Toutefois, chez les E+, la production plus importante de NO par l'endothélium comparativement au muscle lisse vasculaire pourrait mettre en branle des processus de désensibilisation ne pouvant être observés à de plus faibles concentrations de NO. L'effet des canaux  $K_v$  sur la tachyphylaxie à l'AVP observé chez les E- serait ainsi surclassé ou masqué chez les E+ par des mécanismes plus importants. Afin d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse, il faudrait procéder à des expérimentations avec le 4-aminopyridine en présence de NNLA chez les E+ et en présence de SNP chez les E-. Le blocage des canaux potassiques dépendants du calcium de faible conductance et/ou de haute conductance, ainsi que le blocage des canaux potassiques dépendants de l'ATP n'avaient aucun effet sur la tachyphylaxie à l'AVP.

L'absence d'effet des BK<sub>ca</sub> concorde avec l'absence d'effet du clotrimazole seul, un des mécanismes d'action principal des EETs étant l'ouverture de ces canaux. De plus, les résultats obtenus suggèrent une absence d'implication de l'EDHF dans la tachyphylaxie à l'AVP, puisque le blocage simultané des BK<sub>ca</sub> et des SK<sub>ca</sub> n'avait pas d'effets dans ce phénomène. Toutefois, afin d'éliminer complètement l'hypothèse de la contribution d'un ou des EDHFs dans la désensibilisation à l'AVP, il faudrait tester les effets d'une association de charybdotoxine et d'apamine.

### **1.7. Production de NO au niveau du muscle lisse vasculaire**

La diminution de la tachyphylaxie à la vasopressine chez les anneaux dénudés suite à l'exposition de ceux-ci au NNLA suggère la production de NO au niveau du muscle lisse vasculaire aortique de rats. Étant donné la faible probabilité qu'une NO synthétase endothéliale soit présente au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, cette production de NO est probablement accomplie par une NO synthétase neuronale ou une NO synthétase inductible. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'AMT, un inhibiteur plus sélectif envers les isoformes inductible et neuronale de NOS entraîne le même effet que le NNLA, un inhibiteur non sélectif envers les trois isoformes de NOS, chez les E-, mais un effet moindre que celui-ci chez les E+. D'autre part, il ne fut pas possible de détecter de signal en ce qui a trait à l'expression protéique de la iNOS au niveau d'anneaux aortiques prélevés de rats sacrifiés depuis peu ou au niveau d'anneaux exposés à une triple administration d'AVP 100 nM, malgré un signal prononcé au niveau d'anneaux aortiques de rats traités au LPS. Cependant, il fut possible de détecter la présence d'une NOS neuronale tant chez des anneaux de rats tout juste sacrifiés que d'anneaux exposés à une triple administration d'AVP, ceci suggérant la présence constitutive de cette isoforme au niveau du muscle lisse vasculaire aortique, ces résultats étant en accord avec ceux d'autres études (Cheah et al. 2002; Ebrahimian et al. 2003).

Cette nNOS constitutive pourrait être responsable de la production de NO contribuant à la tachyphylaxie à l'AVP chez les E-. Les données obtenues suggèrent également que l'incubation d'anneaux aortiques dans des chambres d'organes isolés pendant une durée approximative de sept heures ou que l'exposition à l'AVP sont des stimuli insuffisants pour l'induction de la iNOS. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études, lors desquelles un stimulus additionnel, tel des cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) ou du LPS, était nécessaire pour induire l'expression de cette protéine (Chou et al. 1998; Kauser et al. 1998; Teng et al. 2002). Cependant, nos résultats sont en désaccord avec d'autres études, pour lesquelles la dénudation mécanique de l'endothélium ou l'incubation dans des bains d'organes étaient suffisantes à l'induction de la iNOS (Binko et al. 1999; Zheng et al. 1997). Dans l'étude de Binko et al, évaluant l'effet de la dénudation endothéliale dans l'expression de la iNOS, les anneaux aortiques étaient incubés pendant 24 heures après la dénudation de l'endothélium avant que la réactivité vasculaire et l'expression protéique de la iNOS ne soient évaluées. Dans notre étude, ces deux paramètres étaient évalués dans les sept heures du retrait de l'endothélium. Une explication possible est donc que la iNOS n'est pas induite pendant le court laps de temps que duraient nos expérimentations. En ce qui a trait à l'étude de Zheng et al, évaluant l'induction spontanée de la iNOS au niveau de bains d'organes isolés, cette étude a été effectuée au niveau de muscle lisse vasculaire gastrique, où des macrophages sont présents. Les auteurs rapportent que l'induction de la iNOS a lieu au niveau des macrophages, et non pas au niveau des cellules musculaires lisses elles-mêmes. La présence de macrophage étant beaucoup plus faible ou totalement absente au niveau d'anneaux aortiques isolés, ceci peut expliquer les différences observées entre cette étude et la nôtre.

### **1.8. Rôle de la PKC dans la tachyphylaxie à l'AVP et interaction entre la PKC et le NO**

Les expériences réalisées démontrent que la PKC n'a un rôle à jouer dans la tachyphylaxie à l'AVP que chez les anneaux dénudés ou en absence de NO chez les anneaux intacts. Une explication possible est le fait que les facteurs endothéliaux, plus particulièrement une importante production de NO, pourraient inhiber l'activité de certaines isoformes de PKC (Tazi et al. 2002; Chagneau et al. 2000). Chez les E-, la PKC pourrait jouer un rôle dans la tachyphylaxie à l'AVP étant donné la production plus faible de NO par la nNOS au niveau du muscle lisse vasculaire aortique, tandis que chez les E+, la production plus importante de NO par la eNOS pourrait diminuer ou annihiler les effets de la PKC en ce qui a trait à la tachyphylaxie à l'AVP (Chagneau et al. 2000). Les effets observés chez les E- pourraient correspondre à certaines situations lors desquelles la production de NO est altérée, par exemple l'hypertension ou le diabète (Fenster et al. 2003). Il est à noter que les inhibiteurs de PKC utilisés étant non sélectifs envers les isoformes de cette protéine présentes dans le muscle lisse vasculaires, soit les PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  et PKC $\zeta$ , il nous est impossible de postuler sur les isoformes impliquées dans la tachyphylaxie à l'AVP; il nous faudra donc discuter de façon plus générale. Le NO pourrait diminuer l'activité de la PKC en opérant une S-nitrosylation de certains acides aminés. L'oxydation subséquente des résidus S-nitrosyl permettrait la proximité de résidus cystéines de la PKC, cette proximité étant nécessaire à la formation de ponts disulfure à l'intérieur de cette protéine. Ces ponts disulfure pourraient ensuite empêcher la PKC de phosphoryler d'autres protéines (Gopalakrishna et al. 1993). Un autre mécanisme par lequel le NO pourrait inhiber la PKC serait l'inhibition de la production d'inositols phosphates et de l'efflux de calcium à partir du réticulum endoplasmique médiée par le GMPc ceci pouvant diminuer l'activation de la PKC (Chagneau et al. 2000; Murthy et al. 1993). D'autre part, certaines études ont rapporté une activation ou une augmentation de l'activité de certaines isoformes de la PKC par le NO (Ping et al. 1999; Balafanova et al. 2002).

Toutefois, cette activation de la PKC par le NO est le plus souvent secondaire à la formation de peroxy-nitrite et est donc dépendante de la présence d'une certaine quantité d'anions superoxyde dans le milieu (Ping et al. 1999; Balafanova et al. 2002). Il a également été démontré que la PKC pouvait augmenter la production de NO et l'expression de la iNOS. (Li et al. 1998). L'augmentation de l'expression de la iNOS par la PKC $\alpha$  est accomplie par une activation du facteur nucléaire  $\kappa B$  (*nuclear factor  $\kappa B$* , NF- $\kappa B$ ). La PKC pourrait de plus augmenter la production de NO en induisant l'expression protéique d'un transporteur d'acides aminés cationiques (*cationic amino acid transporter*, CAT), ceci augmentant la disponibilité du L-arginine pour les NOS (Li et al. 1998). Il est peu probable que ce phénomène survienne dans notre modèle ou que ce phénomène soit impliqué dans la tachyphylaxie à l'AVP, si l'on tient compte du fait qu'une exposition à l'AVP ne permettait pas de détecter une augmentation de la production de NO, tel que mentionné auparavant. Les mécanismes possibles en ce qui a trait à l'effet de la PKC dans la tachyphylaxie à l'AVP au niveau des aortes de rats pourraient consister en une phosphorylation directe ou indirecte via des GRKs du récepteur V<sub>1a</sub>. Cette phosphorylation d'acides aminés spécifiques au niveau du récepteur pourrait recruter certaines protéines d'échafaudage, puis enclencher les processus d'internalisation et de séquestration du récepteur. Il a été observé que l'internalisation de certains récepteurs est une étape essentielle à la resensibilisation de ceux-ci (Nilius et al. 2000; Shih & Malbon 1996; Bhattacharyya et al. 2002). La protéine kinase C pourrait donc contribuer indirectement à la resensibilisation du récepteur V<sub>1a</sub> en participant à l'internalisation de ce récepteur. Suite à la phosphorylation des récepteurs V<sub>1a</sub> par la PKC, environ 80% de ces récepteurs sont recyclés à la membrane au niveau des oocytes de *Xenopus* après une heure, ce qui concorde avec les résultats obtenus pour différentes durées d'exposition à l'AVP et différents intervalles de récupération (Ancellin et al. 1997).

## 1.9. Hypothèses

Les résultats obtenus lors de mon projet de maîtrise ainsi que plusieurs données rapportées dans la littérature permettent d'émettre l'hypothèse suivante en ce qui a trait à la tachyphylaxie à la vasopressine plus prononcée chez les E+ que chez les E-. La PKC pourrait entraîner la phosphorylation des récepteurs  $V_{1a}$  en absence de NO, recrutant ainsi des protéines d'échafaudage puis contribuant à l'internalisation et la séquestration des récepteurs. Cette séquestration des récepteurs dans des endosomes pourrait permettre la déphosphorylation du récepteur par des phosphatases et le retour de celui-ci à son état actif, puis son recyclage à la membrane. Par contre, en présence de NO, cette molécule diminuant la palmitoylation du récepteur  $V_{1a}$  et diminuant la phosphorylation de celui-ci, une internalisation et une séquestration des récepteurs indépendantes de la PKC pourraient survenir. La resensibilisation secondaire à cette forme d'internalisation pourrait demander un laps de temps plus long que la resensibilisation secondaire à une internalisation du récepteur par la PKC, ceci pouvant expliquer la différence de réponse à l'AVP entre les E+ et les E- après 45 minutes de stabilisation (figure 13, page 101 et 102).

## 2. Conclusions générales

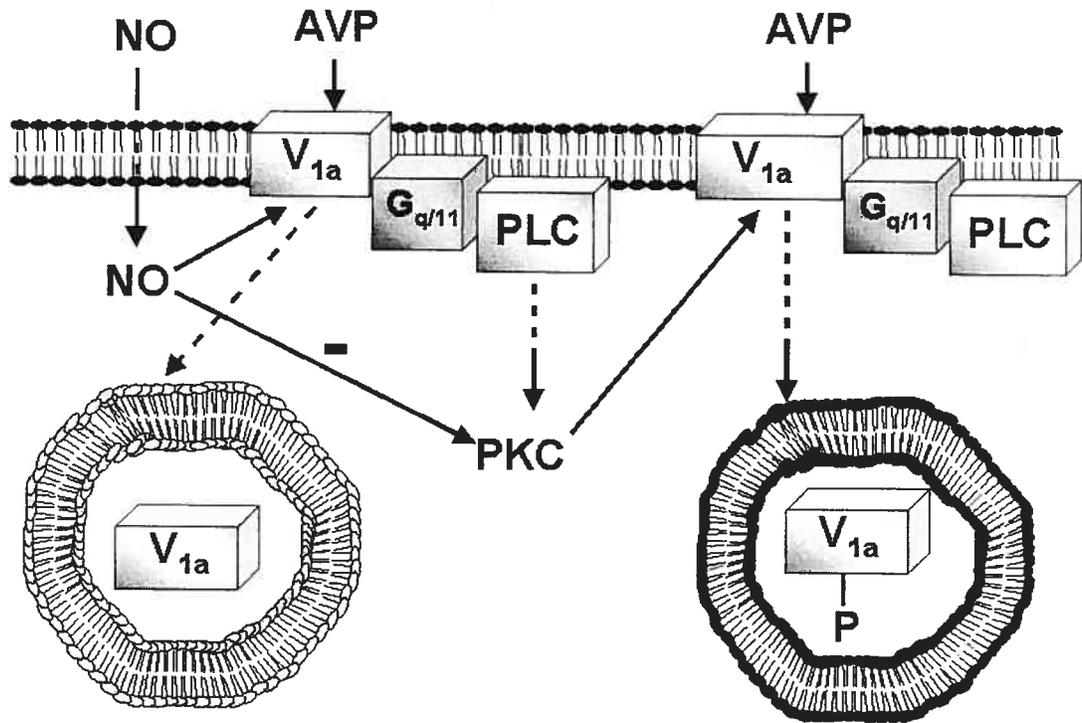
En conclusions, nous avons observé que l'augmentation des durées d'exposition à l'AVP ou une diminution des intervalles de récupération augmentait la tachyphylaxie à cette hormone chez les anneaux dénudés de leur endothélium, tandis que ces paramètres n'avaient aucun effet sur la tachyphylaxie chez les anneaux dont l'endothélium était intact. Nous avons démontré que le NO est le médiateur principal de la tachyphylaxie à l'AVP, tant chez les E+ que chez les E-, alors que les prostaglandines et les EETs ne contribuent que faiblement à cette tachyphylaxie chez les E+ seulement. Seuls les canaux  $K_v$  ont un rôle à jouer dans la désensibilisation à l'AVP, chez les E- seulement.

La présence d'une NO synthétase neuronale constitutive au niveau du muscle lisse vasculaire aortique permet d'expliquer l'effet du NO chez les E-. Finalement, la PKC n'aurait un rôle à jouer dans la tachyphylaxie à l'AVP que chez les E-, la présence de NO semblant diminuer les effets de cette kinase.

### 3. Perspectives

Malgré tous les travaux effectués jusqu'à maintenant en ce qui a trait à la désensibilisation du récepteur  $V_{1a}$ , plusieurs questions demeurent. En effet, bien que certaines GRKs semblent phosphoryler ce récepteur et que certaines arrestines semblent impliquées dans l'internalisation de celui-ci dans des modèles *in vitro*, la participation de ces molécules à la désensibilisation à l'AVP n'a pas été confirmée *in vivo*. De plus, les isoformes de PKC phosphorylant le récepteur  $V_{1a}$  sont inconnues à ce jour. Les mécanismes moléculaires exacts participant à l'internalisation et au recyclage des récepteurs  $V_{1a}$  suite à la phosphorylation du récepteur par des GRKs ou des protéines kinases dépendantes des seconds messagers sont toujours à déterminer tant *in vitro* qu'*in vivo*. La participation d'autres facteurs endothéliaux, tels l'endothéline, à la tachyphylaxie à l'AVP n'a pas été étudiée. De plus, le NO interagissant fortement avec le VEGF qui possède des récepteurs au niveau des cellules endothéliales, il serait intéressant de déterminer si ce facteur de croissance est impliqué d'une manière directe ou indirecte dans la désensibilisation à l'AVP. Enfin, la présence de la tachyphylaxie à l'AVP dans l'aorte de rat n'a pas été vérifiée *in vivo*. La pertinence physiologique d'un tel phénomène en conditions normales et en conditions pathologiques devrait également être établie.

**Figure 13.** Hypothèses concernant la tachyphylaxie différentielle chez les E<sup>+</sup> et les E<sup>-</sup>



**Légende Figure 13** : En absence de NO (chez les E-), la PKC pourrait phosphoryler les récepteurs  $V_{1a}$ , ce qui contribue au recrutement de protéines d'échafaudage comme les arrestines, puis à l'internalisation et à la séquestration des récepteurs. La présence des récepteurs dans des endosomes pourrait permettre la déphosphorylation des récepteurs par des phosphatases et le retour de ceux-ci à leur état actif, puis à leur recyclage au niveau de la membrane plasmique. Le NO semblant diminuer l'activité de la PKC et diminuant également la palmitoylation du récepteur, ceci pourrait entraîner une internalisation et une séquestration des récepteurs indépendamment de la PKC chez les E+. La resensibilisation suite à ce type d'internalisation pourrait être plus long que celui obtenu suite à une phosphorylation du récepteur  $V_{1a}$  par la PKC, ce qui pourrait expliquer la différence observable entre les E+ et les E- après 45 minutes de stabilisation lors de la deuxième ou troisième exposition à l'AVP.  $V_{1a}$  : récepteurs  $V_{1a}$  à la vasopressine, AVP : [Arg]<sup>8</sup>-vasopressine,  $G_{q/11}$  : protéine G couplée à la voie de la phospholipase C, PLC : phospholipase C, PKC : protéine kinase C, NO : monoxyde d'azote, P : groupement phosphate.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abboud,F.M., Floras,J.S., Aylward,P.E., Guo,G.B., Gupta,B.N., and Schmid,P.G.  
1990. Role of vasopressin in cardiovascular and blood pressure regulation.  
*Blood Vessels* **27**: 106-115.
- Abrams,J. 2002. Cardiovascular Therapy : How to series; How to use nitrates.  
*Cardiovasc. Drug. Ther.* **16**: 511-514.
- Adam,L. and Bouvier,M. 1999. Nitric oxide modulates beta(2)-adrenergic receptor  
palmitoylation and signaling. *J. Biol. Chem.* **274**: 26337-26343.
- Alderton,W.K., Cooper,C.E., and Knowles,R.G. 2001. Nitric oxide synthases:  
structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**: 593-615.
- Ancellin,N. and Morel,A. 1998. Homologous and heterologous acute  
desensitization of vasopressin V1a receptor in *Xenopus* oocytes. *Cell  
Signal.* **10**: 217-223.
- Ancellin,N., Preisser,L., Corman,B., and Morel,A. 1997. Role of protein kinase C  
and carboxyl-terminal region in acute desensitization of vasopressin V1a  
receptor. *FEBS Lett.* **413**: 323-326.
- Ancellin,N., Preisser,L., Le Maout,S., Barbado,M., Creminon,C., Corman.B., and  
Morel,A. 1999. Homologous and heterologous phosphorylation of the  
vasopressin V1a receptor. *Cell Signal.* **11**: 743-751.

- Andrew,P.J. and Mayer,B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* **43**: 521-531.
- Balafanova,Z., Bolli,R., Zhang,J., Zheng,Y., Pass,J.M., Bhatnagar,A., Tang,X.L., Wang,O., Cardwell,E.M., and Ping,P. 2002. Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon- RACK2 interactions : a novel mechanism for no-triggered activation of PKCepsilon. *J. Biol. Chem.* **277**: 15021-15027.
- Bankir,L. 2001. Antidiuretic action of vasopressin : quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc. Res.* **51**: 372-390.
- Bardell,A.L. and MacLeod,K.M. 2001. Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**: 252-259.
- Baron,A., Frieden,M., and Beny,J.L. 1997. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-dependent k<sup>+</sup> channel on pig coronary artery endothelial cells. *J. Physiol.* **504**: 537-543.
- Barton,C.H., Ni,Z., and Vaziri,N.D. 2001. Effect of severe aortic banding above the renal arteries on nitric oxide synthase isotype expression. *Kidney Int.* **59**: 654-661.

- Bauersachs,J., Rudiger,P., Hecker,M., Sauer,E., Fleming,I., and Busse,R. 1996.  
Nitric oxide attenuates the release of Endothelium-derived  
Hyperpolarizing Factor. *Circulation* **94**: 3341-3347.
- Beach,P.K., Spain,D.A., Kawabe,T., Harris,P.D., and Garrison,R.N. 2001. Sepsis  
increases NOS-2 activity and decreases non-NOS-mediated acetylcholine-  
induced dilation in rat aorta. *J. Surg. Res.* **96**: 17-22.
- Bennett,T. and Gardiner,S.M. 1985. Involvement of vasopressin in cardiovascular  
regulation. *Cardiovasc. Res.* **19**: 57-68.
- Berecek,K.H. and Swords,B.H. 1990. Central role for vasopressin in  
cardiovascular regulation and the pathogenesis of hypertension.  
*Hypertension* **16**: 213-224.
- Bhattacharyya,S., Puri,S., Miledi,R., and Panicker,M.M. 2002. Internalization and  
recycling of 5-HT<sub>2A</sub> receptors activated by serotonin and protein kinase C-  
mediated mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**: 14470-14475.
- Binko,J., Meachem,S., and Majewski,H. 1999. Endothelium removal induces  
iNOS in rat aorta in organ culture, leading to tissue damage. *Am. J.*  
*Physiol.* **276**: E125-E134.
- Birnbaumer,M., Antaramian,A., Themmen,A.P., and Gilbert,S. 1992.  
Desensitization of the human V<sub>2</sub> vasopressin receptor. Homologous effects  
in the absence of heterologous desensitization. *J. Biol. Chem.* **267**: 11783-  
11788.

- Bisset,G.W. and Chowdrey,H.S. 1988. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q. J. Exp. Physiol* **73**: 811-872.
- Bizzozero,O.A., Bixler,H., Parkhani,J., and Pastuszyn,A. 2001. Nitric oxide reduces the palmitoylation of rat myelin proteolipid protein by an indirect mechanism. *Neurochem. Res.* **26**: 1127-1137.
- Boer,R., Ulrich,W.R., Klein,T., Mirau,B., Haas,S., and Baur,I. 2000. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol. Pharmacol.* **58**: 1026-1034.
- Bogdan,C. 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* **11**: 66-75.
- Bowen-Pidgeon,D., Innamorati,G., Sadeghi,H., and Birnbaumer,M. 2001. Arrestin effects on internalization of vasopressin receptors. *Mol. Pharmacol.* **59**: 1395-1401.
- Brazil,O.V., Fontana,M.D., and Pavani,N.J. 1989. Effect of 4-aminopyridine on the postsynaptic action of polymixin B. *Eur. J. Pharmacol.* **159**: 47-51.
- Britow,M.R., Shakar,S.F., Linseman,J.V., and Lowes,B.D. 2001. Inotropes and beta-blockers : Is there a need for new guidelines? *J. Card. Fail.* **7**: 8-12.
- Bucher,M., Hobbhahn,J., and Kurtz,A. 2001. Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis. *Crit. Care Med.* **29**: 1750-1755.

- Bunnemann,M. and Hosey,M. 1999. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J. Physiol.* **517**: 5-23.
- Bunnemann,M., Lee,K.B., Pals-Rylaarsdam,R., and Roseberry,A.G. 1999. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 169-192.
- Burbach,J.P., Adan,R.A., Lolait S.J., van Leeuwen F.W., Mezey,E., Palkovits,M., and Barberis,C. 1995. Molecular neurobiology and Pharmacology of the vasopressin/oxytocin receptor family. *Cell. Mol. Neurobiol.* **15**: 573-595.
- Busse,R., Edwards,G., Feletou,M., Fleming,I., Vanhoutte,PM., and Weston,AH. 2002. EDHF : bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 374-380.
- Cantau,B., Guillon,G., Alaoui,M.F., Chicot,D., Balestre,M.N., and Devilliers,G. 1988. Evidence of two steps in the homologous desensitization of vasopressin- sensitive phospholipase C in WRK1 cells. Uncoupling and loss of vasopressin receptors. *J. Biol. Chem.* **263**: 10443-10450.
- Casabona,G. 1997. Intracellular signal modulation: A pivotal role for protein kinase C. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **21**: 407-425.
- Chagneau,C., Tazi,K.A., Heller,J., Sogni,P., Poirel,O., Moreau,R., and Lebrec,D. 2000. The role of nitric oxide in the reduction of protein kinase C-induced

- contractile response in aortae from rats with portal hypertension. *J. Hepatology* **33**: 26-32.
- Cheah,L.S., Gwee,M., Das,R., Ballard,H., Yang,Y.F., Daniel,E.E., and Kwan,C.Y. 2002. Evidence for the existence of a constitutive nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **29**: 725-727.
- Chen,J.K., Falck,J.R., Reddy,K.M., Capdevila,J., and Harris,R.C. 1998. Epoxyeicosatrienoic acids and their sulfonimide derivatives stimulate tyrosine phosphorylation and induce mitogenesis in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 29254-29261.
- Chiu,T., Wu,S.S., Santiskulvong,C., Tangkijvanich,P., Yee,H.F., and Rozengurt,E. 2002. Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C434-C450.
- Chou,T.C., Yen,M.H., Li,C.Y., and Ding,Y.A. 1998. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* **31**: 643-648.
- Chuang,T.T., Iacovelli,L., Sallese,M., and De Blasi,A. 1996. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**: 416-421.
- Clauser,E. 2000. Synthesis and local and distant actions of vasoactive peptides. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **61**: 10-15.

- Cuadra,A.E. and El Fakahany,E.E. 1998. Up-regulation of the neuronal form of nitric oxide synthase in response to prolonged muscarinic M1 receptor stimulation. *J. Neurochem.* **71**: 571-579.
- Davidge,S.T. 2001. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ. Res.* **89**: 650-660.
- de Groote,P. 2002. Vasopressin antagonists. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **95 Spec 4**: 59-61.
- de Haas,S.L., Wilkinson,I.B., Boyd,J.L., and Webb,D.J. 2002. Local nitric oxide release does not affect tachyphylaxis to angiotensin II in dorsal hand veins in man in the presence of prostaglandin synthesis inhibition. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **53**: 193-195.
- De Wit,C., Bolz,S.S., and Pohl,U. 2000. Interaction of endothelial autacoids in microvascular control. *Z. Kardiol.* **89**: IX/113-IX/116.
- Doris,P.A. 1984. Central cardiovascular regulation and the role of vasopressin: a review. *Clin. Exp. Hypertens. A* **6**: 2197-2217.
- Dumoulin,M., Salvail,D., Gaudreault,S.B., Cadieux,A., and Rousseau,E. 1998. Epoxyeicosatrienoic acids relax airway smooth muscles and directly activate reconstituted kca channels. *Am. J. Physiol.* **275**: L423-L431.
- Ebrahimian,T., Mathieu,E., Sylvestre,J.S., and Boulanger,C.M. 2003. Intraluminal pressure increases vasculare neuronal nitric oxide synthase expression. *J. Hypertens.* **21**: 937-942.

- Erwald,R. 1976. Vasopressin tachyphylaxis. A study in conscious man. *Acta Chir. Scand.* **142**: 30-35.
- Feletou,M. and Vanhoutte,P.M. 2000. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **21**: 1-18.
- Fenster,B.E., Tsao,P.S., and Rockson,S.G. 2003. Endothelial dysfunction : Clinical strategies for treating oxidant stress. *Am. Heart J.* **146**: 218-226.
- Ferguson,S.S., Zhang,J., Barak,L.S., and Caron,M.G. 1998. Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci.* **62**: 1561-1565.
- Fleming,I., Schermer,B., Popp,R., and Busse,R. 1999. Inhibition of the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cannabinoid receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* **126**: 949-960.
- Fleming,M., Mihic,S.J., and Harris,R.A. 2001. Ethanol. *In* Hardman,J.G. and Limbird,L.E., eds. *Goodman & Gilman's- The pharmacological basis of therapeutics.* McGraw-Hill, Nashville, pp 429-445.
- Foley,J.F., Kelley,L.P., and Kinsella,B.T. 2001. Prostaglandin D(2) receptor-mediated desensitization of the alpha isoform of the human thromboxane A(2) receptor. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 229-239.
- Freedman,N.J. and Lefkowitz,R.J. 1996. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res.* **51**: 319-351.

- Fulton, D., Gratton, J.P., and Sessa, W.C. 2001. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: Why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**: 818-824.
- Furchgott, R.F. and Vanhoutte, P.M. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**: 2007-2018.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.
- Furfine, E.S., Harmon, M.F., Paith, J.E., Knowles, R.G., Salter, M., Kiff, R.J., Duffy, C., Hazelwood, R., Oplinger, J.A., and Garvey, E.P. 1994. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J. Biol. Chem.* **269**: 26677-26683.
- Geeson, J., Larsson, K., Hourani, S.M., and Toms, N.J. 2002. Sodium nitroprusside-induced rat fundus relaxation is ryanodine-sensitive and involves L-type Ca<sup>2+</sup> channel and small conductance Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channel components. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **22**: 297-301.
- Geller, D.A. and Billiar, T.R. 1998. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metast. Rev.* **17**: 7-23.

- Gilbert,E.M. and Port,J.D. 2002. Deactivation of the sympathetic nervous system in patients with chronic congestive heart failure. *Curr. Cardiol. Rep.* **2**: 225-232.
- Gopalakrishna,R., Chen,Z.H., and Gundimeda,U. 1993. Nitric Oxide and Nitric Oxide-generating Agents Induce a Reversible Inactivation of Protein Kinase C Activity and Phorbol Esther Binding. *J. Biol. Chem.* **268**: 27180-27185.
- Gosgnach,W., Messika-Zeitoun,D., Gonzalez,W., Philipe,M., and Michel,J.B. 2000. Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**: C1880-C1888.
- Grier,C.E., III, Nambi,P., Aiyar,N., and Crooke,S.T. 1989. Molecular mechanisms of homologous and heterologous desensitization mediated by vasopressin in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 5384-5391.
- Grozdanic,Z. 2001. NO message from muscle. *Microsc. Res. Tech.* **55**: 148-153.
- Guilmard,C., Auguet,M., and Chabrier,P.E. 1998. Comparison between endothelial and neuronal nitric oxide pathways in rat aorta and gastric fundus. *Nitric Oxide* **2**: 147-154.
- Harris,D., Kendall,D.A., and Randall,M.D. 1999. Characterization of cannabinoid receptors coupled to vasorelaxation by endothelium-derived

hyperpolarizing factor. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **359**: 48-52.

Hawtin,S.R., Tobin,A.B., Patel,S., and Wheatley,M. 2001. Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J. Biol. Chem.* **276**: 38139-38146.

Hoebel,B.G. and Graier,W.F. 2003. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates tyrosine kinase activity in porcine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **346**: 115-117.

Hofmann,F., Ammendola,A., and Schlossmann,J. 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* **113**: 1671-1676.

Howl,J. and Wheatley,M. 1995. Molecular pharmacology of V1a vasopressin receptors. *Gen. Pharmacol.* **26**: 1143-1152.

Hsueh,W. and Quinones,M. 2003. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am. J. Cardiol.* **92**: 10J-17J.

Huang,P.L. 1999. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**: 1353-1359.

Huys,I., Dyason,K., Waelkens,E., Verdonck,F., van Zyl,J., du Plessis,J., Muller,G.J., van der Walt,J., Clynen,E., Schoofs,L., and Tytgat,J. 2002. Purification, characterization and biosynthesis of parabutoxin 3, a

component of *Parabuthus transvaalicus* venom. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1854-1865.

Imig, J.D., Inscho, E.W., Deichmann, P.C., Reddy, K.M., and Falck, J.R. 1999. Afferent arteriolar vasodilation to the sulfonimide analog of 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid involves protein kinase A. *Hypertension* **33**: 408-413.

Innamorati G., Sadeghi H., and Birnbaumer M. 1998. Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 7155-7161.

Innamorati, G., Sadeghi, H.M., Tran, N.T., and Birnbaumer, M. 1998. A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 2222-2226.

Inoue, T., Nonoguchi, H., and Tomita, K. 2001. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc. Res.* **51**: 470-480.

Jackson, E.K. 2001. Vasopressin and other agents affecting the renal conservation of water. *In* Hardman, J.G. and Limbird, L.E., eds. *Goodman & Gilman's- The pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, Nashville, pp 789-808.

Jerez, S., de Bruno, M.P., and Coviello, A. 2001. Endothelium-dependent desensitization to angiotensin II in rabbit aorta: the mechanisms involved. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 481-489.

- Johnston,C.I. 1985. Vasopressin in circulatory control and hypertension. *J. Hypertens.* **3**: 557-569.
- Joiner,W.J., Basavappa,S., Vidyasagar,S., Nehrke,K., Krishnan,S., Binder,H.J., Boulpaep,E.L., and Rajendran,V.M. 2003. Active K<sup>+</sup> secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**: G185-G196.
- Kaczorowski,G.J. and Garcia,M.L. 1999. Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 448-458.
- Kagota,S., Yamaguchi,Y., Nakamura,K., Sugiura,R., Waku,K., and Kunimoto.M. 2001. 2-Arachidonoylglycerol, a candidate for endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Eur. J. Pharmacol.* **415**: 233-238.
- Kauser,K., Sonnenberg,D., Diel,P., and Rubanyi,G.M. 1998. Effect of 17beta-oestradiol on cytokine-induced nitric oxide production in rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 1089-1096.
- Kelm,M. and Schrader,J. 1990. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ. Res.* **66**: 1561-1575.
- Kieffer,B.L. and Evans,C.J. 2002. Opioid Tolerance- In Search of the Holy Grail. *Cell* **108**: 587-590.

- Kouznetsova,M., Kelley,B., Shen,M., and Thayer,S.A. 2002. Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between hippocampal neurons in culture. *Mol. Pharmacol.* **61**: 477-485.
- Kroncke,K.D., Fehsel,K., and Kolb-Bachofen,V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **113**: 147-156.
- Kroncke,K.D., Fehsel,K., Suschek,C., and Kollo-Bachofen,V. 2001. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* **1**: 1407-1420.
- Landry,Y. and Gies,J.P. 2003. Récepteurs heptahélicoïdaux, protéines G trimériques et signalisation par l'AMP cyclique. *In*Pharmacologie, Des cibles vers l'indication Thérapeutique. Paris, pp 183-207.
- Lane,P. and Gross,S.S. 2000. The autoinhibitory control element and calmodulin conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity. *Adv. Pharmacol.* **168**: 53-63.
- Laporte,J.D., Moore,P.E., Panettieri,R.A., Moeller,W., Heyder,J., and Shore,S.A. 1998. Prostanoids mediate IL-1beta-induced beta-adrenergic hyporesponsiveness in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **275**: L491-L501.
- Lepicier,P., Bouchard,J.F., Lagneux,C., and Lamontagne,D. 2003. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischemia. *Br. J. Pharmacol.* **139**: 805-815.

- Li,P.L., Zou,A.P., and Cambell,W.B. 1997. Regulation of potassium channels in coronary arterial smooth muscle by endothelium-derived vasodilators. *Hypertension* **29**: 262-267.
- Li,S., Huang,F.L., Feng,Q., Liu,J., Fan,S.X., and McKenna,T.M. 1998. Overexpression of protein kinase C alpha enhances lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* **176**: 402-411.
- Linder,M.E. and Deschesnes,R.J. 2003. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* **42**: 4312-4320.
- Liu,W.S. and Heckman,C.A. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.* **10**: 529-542.
- Martinez-Arizala,A., Holaday,J.W., and Long,J.B. 1989. Cardiovascular responses to intrathecal vasopressin in conscious and anesthetized rats. *Am. J. Physiol.* **256**: R193-R200.
- Mashimo,H., He,X.D., Huang,P.L., Fishman,M.C., and Goyal,R.K. 1996. Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *J. Clin. Invest.* **98**: 8-13.
- McDonald,P.H. and Lefkowitz,R.J. 2001. beta Arrestins: New roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal.* **13**: 683-689.

- McGuire,J.J., Ding,H., and Triggle,C.R. 2001. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 443-470.
- Medhora,M., Narayanan,J., Harder,D., and Maier,K.G. 2001. Identifying endothelium-derived hyperpolarizing factor ; recent approaches to assay the role of epoxyeicosatrienoic acids. *Jpn. J. Pharmacol.* **86**: 369-375.
- Mehats,C., Tanguy,G., Dallot,E., Cabrol,D., Ferre,F., and Leroy,M.J. 2001. Is up-regulation of phosphodiesterase 4 activity by PGE2 involved in the desensitization of beta-mimetics in late pregnancy human myometrium? *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**: 5358-5365.
- Michel,JB. and Arnal,JF. 1993. Monoxyde d'azote et hypertension arterielle. *Med. Sci.* **10**: 1061-1067.
- Millette,E. and Lamontagne,D. 1996. Endothelium-dependent and NO-mediated desensitization to vasopressin in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* **119**: 899-904.
- Mohr,E. and Richter,D. 1994. Vasopressin in the regulation of body functions. *J. Hypertens.* **12**: 345-348.
- Morel,A., Lolait,S.J., and Brownstein,M.J. 1993. Molecular cloning and expression of rat V1a and V2 arginine vasopressin receptors. *Regul. Pept.* **45**: 53-59.
- Morello,J.P. and Bichet,D.G. 2001. Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu. Rev. Physiol.* **63**: 607-630.

- Morello, J.P. and Bouvier, M. 1996. Palmitoylation : a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors. *Biochem. Cell. Biol.* **74**: 449-457.
- Morrow, J.D. and Roberts, L.J. 2001. Lipid-derived autacoids : eicosanoids and platelet-activating factor. *In* Hardman, J.G. and Limbird, L.E., eds. Goodman & Gilman's- The pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, Nashville, pp 669-685.
- Murthy, K.S., Severi, C., Grider, J.R., and Makhlouf, G.M. 1993. Inhibition of IP3 and IP3-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization by cyclic nucleotides in isolated gastric muscle cells. *Am. J. Physiol.* **264**: G967-G974.
- Nagasaki, M., Komori, S., Tamaki, H., and Ohashi, H. 1993. Effect of trimebutine on K<sup>+</sup> current in rabbit ileal smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **235**: 197-203.
- Nambi, P., Aiyar, N., Whitman, M., Grier, C.E., III, and Crooke, S.T. 1989. Homologous and heterologous desensitization mediated by vasopressin in smooth muscle cells. *Cell Signal.* **1**: 241-251.
- Nathanson, M.H., Burgstahler, A.D., Orloff, J.J., Mani, A., and Moyer, M.S. 1994. Mechanism of desensitization of the cloned vasopressin V1a receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **267**: C94-C103.

- Nelson, M.T. and Quayle, J.M. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **268**: C799-C822.
- Newton, A.C. 2001. Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* **101**: 2353-2364.
- Nguyen, M.K., Nielsen, S., and Kurtz, I. 2003. Molecular pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus. *Clin. Exp. Nephrol.* **7**: 9-17.
- Nilius, S.M., Hasse, A., Kuger, P., Schror, K., and Meyer-Kirchrath, J. 2000. Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett.* **484**: 211-216.
- Nojima, H., Sasaki, T., and Kimura, I. 2000. Arachidonic acid and prostaglandin D2 cooperatively accelerate desensitization of nicotinic acetylcholine receptor channel in mouse skeletal muscles. *Brain Res.* **852**: 233-238.
- Noll, G. and Luscher, T.F. 1998. The endothelium in acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* **19 Suppl C**: C30-C38.
- Nomura, Y. 2001. NF-kappa B activation and I kappa B alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci.* **68**: 1695-1701.

- Papapetropoulos,A., Rudic,R.D., and Sessa,W.C. 1999. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **43**: 509-520.
- Perreault,M. and Marrette,A. 2001. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat. Med.* **7**: 1138-1143.
- Pertwee,R.G. 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* **74**: 129-180.
- Petersson,J., Zygmunt,P.M., and Hogestatt,E.D. 1997. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.* **120**: 1344-1350.
- Pilz,R.B. and Casteel,D.E. 2003. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ. Res.* **93**: 1034-1046.
- Ping,P., Takano,H., Zhang,J., Tang,X.L., Qiu,Y., Li,R.C., Banerjee,A., Dawn,B., Balafanova,Z., and Bolli,R. 1999. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits : a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia induced preconditioning. *Circ. Res.* **84**: 587-604.
- Preisser,L., Ancellin,N., Michaelis,L., Creminon,C., Morel,A., and Corman.B. 1999. Role of the carboxyl-terminal region, di-leucine motif and cysteine

residues in signalling and internalization of vasopressin V1a receptor.

FEBS Lett. **460**: 303-308.

Qanbar,R. and Bouvier,M. 2003. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* **97**: 1-33.

Ramis,I., Bioque,G., Lorente,J., Jares,P., Quesada,P., Rosello-Catafau,J., Gelpi,E., and Bulbena,O. 2000. Constitutive nuclear factor-kappaB activity in human upper airway tissues and nasal epithelial cells. *Eur. Respir. J.* **15**: 582-589.

Randall,M.D. and Kendall,D.A. 1998. Endocannabinoids: a new class of vasoactive substances. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**: 55-58.

Rastaldo,R., Paolocci,N., Chiribiri,A., Penna,C., Gattullo,D., and Pagliaro,P. 2001. Cytochrome P-450 metabolite of arachidonic acid mediates bradykinin-induced negative inotropic effect. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **280**: H2823-H2832.

Razzak,M.A. and Naguib,M. 1967. Effect of repeated administration of synthetic vasopressin on hemodynamics in dogs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **170**: 388-395.

Ready,J.B., Robertson,A.D., and Rector,W.G., Jr. 1991. Effects of vasopressin on portal pressure during hemorrhage from esophageal varices.

*Gastroenterology* **100**: 1411-1416.

- Reid,I. 1994. Role of nitric oxide in the regulation of renin and vasopressin secretion. *Front. Neuroendocrinol.* **15**: 351-383.
- Roman,R.J. 2002. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.* **82**: 131-185.
- Ross,E.M. and Kenakin,T.P. 2001. Pharmacodynamics : mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. *In* Hardman,J.G. and Limbird,L.E., eds. *Goodman & Gilman's- The pharmacological basis of therapeutics.* McGraw-Hill, Nashville, pp 31-43.
- Ruibno,T., Vigano,D., Costa,B., Colleoni,M., and Parolaro,D. 2000. Loss of cannabinoid-stimulated guanosine 5'-O-(3-[(35)S]Thiophosphate) binding without receptor down-regulation in brain regions of anandamide-tolerant rats. *J. Neurochem.* **75**: 478-484.
- Ruiz-Opazo,N. 1998. Identification of a novel dual angiotensin II/vasopressin receptor. *Nephrologie* **19**: 417-420.
- Schini,V.B. and Vanhoutte,P.M. 1993. Nitric oxide and homeostasis of the smooth vascular muscle. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **86 Spec No 1**: 83-89.
- Schwarz,P.M., Kleinert,H., and Forstermann,U. 1999. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 2584-2590.

- Shewey,L.M., Boer,G.J., Szot,P., and Dorsa,D.M. 1989. Regulation of vasopressin receptors and phosphoinositide hydrolysis in the septum of heterozygous and homozygous Brattleboro rats. *Neuroendocrinology* **50**: 292-298.
- Shih,M. and Malbon,C.C. 1996. Protein kinase C deficiency blocks recovery from agonist-induced desensitization. *J. Biol. Chem.* **271**: 21478-21483.
- Silva,B.A., Nouailhetas,V.L., and Aboulafia,J. 1999. Desensitization to ANGII in guinea pig ileum depends on membrane repolarization : role of maxi-K(+) channel. *Am. J. Physiol.* **277**: C739-C745.
- Stuehr,D.J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**: 217-230.
- Szabo,C. and Thiemermann,C. 1995. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Adv. Pharmacol.* **34**: 113-153.
- Szczepanska-Sadowska,E. 1996. Interaction of vasopressin and angiotensin II in central control of blood pressure and thirst. *Regul. Pept.* **66**: 65-71.
- Tazi,K.A., Barriere,E., Moreau,R., Poirrel,O., and Lebrec,D. 2002. Relationship between protein kinase C alterations and nitric oxide overproduction in cirrhotic rat aortas. *Liver* **22**: 178-183.
- Teng,X., Zhang,H., Snead,C., and Catravas,J.D. 2002. Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 beta and IFN-gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C144-C152.

- Tobin,A.B. 1997. Phosphorylation of phospholipase C-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **75**: 135-151.
- Viaro,F., Nobre,F., and Evora,P.R. 2000. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arq. Bras. Cardiol.* **74**: 380-393.
- Watking,K.J. 2001. *Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction.* Sigma-RBI.
- Weiger,T.M., Hermann,A., and Levitan,I.B. 2002. Modulation of calcium-activated potassium channels. *J. Comp. Physiol. A.* **188**: 79-87.
- White,R. and Hiley,C.R. 1997. A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* **122**: 1573-1584.
- Wilcox,J.N., Subramanian,R.R., Sundell,C.L., Tracey,W.R., Pollock,J.S., Harrison,D.G., and Marsden,P.A. 1997. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 2479-2488.
- Wong,J.M. and Billiar,T.R. 1995. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv. Pharmacol.* **34**: 155-170.

- Wong,P.Y.M., Lai,P.S., and Falck,J.R. 2000. Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **62**: 321-333.
- Zheng,X.L., Sharkey,K.A., and Hollenberg,M.D. 1997. Induction of nitric oxide synthase in rat gastric smooth muscle preparations. *Am. J. Physiol.* **273**: G1101-G1107.
- Zygmunt,P.M., Edwards,G., Weston,A.H., Larsson,B., and Hogestatt,E.D. 1997. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. *Br. J. Pharmacol.* **121**: 141-149.