

2M11.3059.7

Université de Montréal

**Importance pathophysiologique de l'hyperendothélinémie  
sur la réactivité vasculaire pulmonaire**

Par  
Annik Migneault

Département de physiologie, Université de Montréal  
Faculté de médecine

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

Avril, 2003

©Annik Migneault, 2003



WV  
4  
1158  
2003  
n. 092

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 :

**Importance pathophysiologique de l'hyperendothélinémie  
sur la réactivité vasculaire pulmonaire**

présenté par  
Annik Migneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Thorin

Dr Jocelyn Dupuis, MD

Dr Normand Leblanc

Dr Pierre Moreau

## Résumé

---

De nombreuses études ont confirmé l'activation du système endothéline (ET) dans l'hypertension pulmonaire (HTP). L'impact pathophysiologique de l'hyperendothélinémie isolée sur la circulation pulmonaire et le ventricule droit (VD) est cependant inconnu. **Méthodes :** Des rats ont reçu pendant 7 ou 28 jours une perfusion constante d'ET-1 (10 ng/kg/min) par minipompes osmotiques. Ceci résulta en 4 groupes : témoin-7jrs (n=13), ET-7jrs (n=13), témoin-28jrs (n=12) et ET-28jrs (n=12). Des mesures hémodynamiques et morphométriques ainsi que des relations débits-pressions pulmonaires furent effectuées. La réactivité isométrique de petites artères pulmonaires (250  $\mu$ m; n=6 à 10/groupe) a aussi été évaluée. **Résultats :** Les niveaux veineux et tissulaires pulmonaires d'ET-1 ont doublé après perfusion pendant 7 et 28 jours ( $p < 0.05$ ). Les animaux n'ont pas développés d'HTP et d'hypertrophie VD. Seul le groupe ET-7jrs démontre une relation débit-pression pulmonaire plus élevée que son témoin ( $p < 0.05$ ). La sensibilité du groupe ET-7jrs à l'Ach est augmentée ( $p < 0.05$  pour EC50; EC75). Le groupe ET-28jrs démontre une diminution de sa réponse maximale à l'Ach ( $p < 0.01$ ) ainsi qu'au SNP ( $p < 0.001$ ). La sensibilité du groupe ET-7jrs à l'ET-1 est diminuée de façon significative ( $p < 0.001$  pour EC25; EC50 et  $p < 0.05$  pour EC75). La vasoconstriction maximale au U-46619 est augmentée dans le groupe ET-28jrs ( $p < 0.05$ ). **Conclusion :** La perfusion chronique d'ET-1 n'a pas causée d'HTP ou d'hypertrophie ventriculaire droite. Elle résulte cependant en une modification notable de la réactivité vasculaire pulmonaire caractérisée par une diminution de la réponse musculaire lisse au NO. À plus long terme, ceci pourrait contribuer au développement de l'HTP.

**Mots clés :** acétylcholine, artère pulmonaire, circulation pulmonaire, endothéline, endothélium, hypertension pulmonaire, muscle lisse, oxyde nitrique

## Summary

---

Activation of the endothelin (ET) system contributes to the development of pulmonary hypertension (PH). Although plasma ET levels correlate with the severity of PH, the impact of isolated chronic hyperendothelinemia on the pulmonary circulation and right ventricular (RV) function is unknown. **Methods:** Mini-osmotic pumps were implanted in rats to deliver ET-1 (10ng/kg/min) during 7 or 28 days. Four groups were created (1) control 7-days (n=13), (2) ET 7-days (n=13), (3) control 28-days (n=12) and (4) ET 28-days (n=12). After in vivo hemodynamic measurements, the lungs were isolated to derive pressure-flow relations. Small pulmonary arteries (circa 250  $\mu\text{m}$ , n=6 to 10/group) were mounted on an isometric myograph to study their reactivity. **Results:** Plasma and tissues ET-1 levels approximately doubled ( $p<0.05$ ) after 7 and 28 days. RV systolic pressure and RV weight were not affected by the infusions. The pulmonary pressure-flow relation shifted upward ( $p<0.05$ ) in ET 7-days group, but not in ET 28-days group. ET 7-days displayed increased sensibility to Ach ( $p<0.05$  for EC50; EC75). Dilatations to Ach ( $p<0.01$ ) and SNP ( $p<0.001$ ) in isolated arteries were reduced in the ET 28-days. ET 7-days displayed greatly reduced contractility to ET-1 ( $p<0.001$  for EC25; EC50,  $p<0.05$  for EC75). U-46619 vasoconstriction was increased in the ET 28-days group ( $p<0.05$ ). **Conclusion:** One month of chronic hyperendothelinemia failed to induce PH or RV hypertrophy. However, its causes an important modification of the pulmonary vascular reactivity characterized by a reduced response of smooth muscle to NO. In the long term, this may contribute to the developpement of PH.

**Key words :** acetylcholine, endothelin, endothelium, nitric oxide, pulmonary artery, pulmonary circulation, pulmonary hypertension, smooth muscle

# Table des matières

---

Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction .....	1
1.1 Biologie de l'endothélium.....	1
1.2 Les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium.....	3
1.2.1 Le monoxyde d'azote .....	5
1.2.2 La prostacycline .....	7
1.2.3 Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium .....	8
1.2.4 L'adrénomodulline.....	9
1.2.5 Le facteur natriurétique de type C .....	10
1.3 Les facteurs contractants dérivés de l'endothélium .....	12
1.3.1 La thromboxane A <sub>2</sub> .....	12
1.3.2 L'angiotensine II .....	13
1.3.3 L'anion superoxide .....	15
1.3.4 L'endothéline.....	15
1.4 Biologie du système endothéline.....	16
1.4.1.1 Les enzymes de conversion de l'endothéline-1 .....	19
1.4.1.2 La sécrétion de l'endothéline-1 .....	20
1.4.2 Les récepteurs vasculaires de l'endothéline-1 .....	21
1.4.2.1 Voie de signalisation.....	22
1.4.2.2 Clairance de l'endothéline-1 .....	24
1.4.3 Interaction monoxyde d'azote-endothéline-1.....	25
1.4.4 Physiologie et pathologie du système endothéline-1 .....	26
1.4.4.1 Le développement .....	26
1.4.4.2 Les vaisseaux sanguins.....	27
1.4.4.3 Le muscle cardiaque.....	28
1.4.4.4 Le système rénal .....	29

1.4.4.5 Le foie.....	30
1.4.4.6 Le cerveau.....	31
1.4.4.7 Le système respiratoire .....	32
1.5 La circulation pulmonaire.....	33
1.5.1 Réactivité des artères pulmonaires .....	34
1.5.2 Vasoconstriction pulmonaire hypoxique.....	35
1.5.3 Hypertension pulmonaire .....	36
1.5.3.1 Classification .....	38
1.5.3.2 Modèles animaux .....	42
1.5.4 Traitements de l'hypertension pulmonaire.....	44
1.5.4.1 Les anticoagulants.....	44
1.5.4.2 Les bloqueurs des canaux calciques .....	45
1.5.4.3 Inhalation de monoxyde d'azote .....	45
1.5.4.4 Les analogues de la prostacycline.....	46
1.5.4.5 Les antagonistes de l'endothéline-1 .....	48
1.5.4.6 La transplantation d'organes .....	50
1.6 Évaluation de la circulation pulmonaire .....	52
1.7 Objectif .....	55
Matériels et méthodes .....	57
2.1 Animaux utilisés .....	57
2.2 Méthologie générale.....	57
2.3 Mesures hémodynamiques <i>in vivo</i> .....	58
2.4 Préparation des poumons isolés .....	59
2.4.1 Relations débits-pressions et mesures morphométriques.....	59
2.5 Préparation des petites artères isolées .....	60
2.5.1 Réactivité des petites artères isolées.....	61
2.6 Homogénéisation, extraction et dosage de l'endothéline-1 .....	61
2.7 Composés utilisés .....	64
2.8 Évaluation statistique des données .....	64
2.9 Éthique .....	65
Résultats .....	66



3.1 Dosage de l'endothéline-1 .....	66
3.2 Paramètres hémodynamiques et morphométriques .....	67
3.3 Relations débits-pressions .....	69
3.3.1 Relations débits-pressions avec L-NNA .....	69
3.4 Réactivité des petites artères pulmonaires isolées .....	71
3.4.1 Vasodilatation .....	71
3.4.2 Vasoconstriction .....	75
Discussion .....	78
4.1 Dosage de l'endothéline-1 .....	78
4.2 Paramètres hémodynamiques et morphométriques .....	80
4.3 Relations débits-pressions .....	81
4.4 Réactivité des artères isolées .....	83
4.4.1 Relaxation endothélium-dépendante .....	83
4.4.2 Relaxation endothélium-indépendante .....	85
4.4.3 Vasoconstriction .....	87
4.4.4 Vasoconstriction à l'endothéline-1 .....	88
Conclusion .....	90
Remerciements .....	91
Références .....	92

## *Liste des tableaux*

---

Tableau I : Classification diagnostique de l'HTP .....	39
Tableau II : Antagonistes sélectifs et non-sélectifs des récepteurs à l'ET-1..	49
Tableau III : Paramètres hémodynamiques et morphométriques.....	68
Tableau IV : Niveau de précontriction et effet de l'Ach sur la réactivité vasculaire pulmonaire. ....	73
Tableau V : Niveau de précontriction et effet du SNP sur la réactivité vasculaire pulmonaire. ....	74
Tableau VI : Contraction maximale et effet du U-46619 sur la réactivité vasculaire pulmonaire. ....	76
Tableau VII : Contraction maximale et effet de l'ET-1 sur la réactivité vasculaire pulmonaire. ....	77

## *Liste des figures*

---

Figure 1 : Les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium.....	4
Figure 2 : Les facteurs vasoactifs libérés par l'endothélium .....	5
Figure 3 : Structure primaire des endothélines-1, -2, et -3 humaines, de VIC et de la sarafotoxine-6b.....	17
Figure 4 : Biosynthèse de l'ET-1 .....	18
Figure 5 : Mécanisme de la contraction induite par l'ET-1.....	23
Figure 6 : Relation débit-pression typique .....	52
Figure 7 : Relations débits-pressions diverses.....	53
Figure 8 : Concentrations d'endothéline-1 plasmatiques et tissulaires.....	66
Figure 9 : Relations débits-pressions à 7 et 28 jours.....	70
Figure 10 : Relations débits-pressions sans et avec L-NNA .....	71
Figure 11 : Courbes doses-réponses à l'Ach .....	72
Figure 12 : Courbes doses-réponses au SNP .....	74
Figure 13 : Courbes doses-réponses au U-46619 .....	75
Figure 14 : Courbes doses-réponses à l'ET-1 .....	77

## Liste des abréviations

---

(Lorsque l'abréviation réfère à un terme anglais, ce dernier est inscrit en italique)

AA : acide arachidonique

AC : adénylate cyclase

Ach : acétylcholine

ADP : adénosine diphosphate

AgII : angiotensine II

AM : adrénomodulline

AMP<sub>C</sub> : adénosine monophosphate cyclique

ANP : *atrial natriuretic factor* (facteur natriurétique de l'oreillette)

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BK : bradykinine

BMPR2 : *bone morphogenetic protein receptor 2* (récepteur 2 de la protéine morphogénétique osseuse)

BNP : *brain natriuretic factor* (facteur natriurétique du cerveau)

CNP : *C-type natriuretic factor* (facteur natriurétique de type C)

COX : cyclooxygénase

DAG : 1,2-diacylglycérol

EC : *effective concentration* (concentration effective)

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

ECE : enzyme de conversion de l'endothéline

EDCF : *endothelium-derived contracting factor* (facteur contractant dérivé de l'endothélium)

EDE : enzyme de dégradation de l'endothéline

EDCF : *endothelium-derived contracting factor* (facteur contractant dérivé de l'endothélium)

EDHF : *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium)

EDRF : *endothelium-derived relaxing factor* (facteur relaxant dérivé de l'endothélium)

ELISA : *enzyme linked immunosorbent assay* (essai immuno-enzymatique)

ET : endothéline

ET<sub>A</sub> : récepteur à l'endothéline de type A

ET<sub>B</sub> : récepteur à l'endothéline de type B

GC<sub>S</sub> : guanylate cyclase soluble

GMP<sub>C</sub> : guanosine 3',5'-monophosphate cyclique

HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque

HPP : hypertension pulmonaire primaire

HPV : *hypoxic pulmonary vasoconstriction* (vasoconstriction pulmonaire hypoxique)

HTP : hypertension pulmonaire

IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate

L-NAME : N $\omega$ -nitro-L-arginine méthyl ester

L-NMMA : N<sup>G</sup>-monométhyl-L-arginine

L-NNA : N $\omega$ -nitro-L-arginine

MAPK: *mitogen-activated protein kinase* (protéine mitogène kinase activée)

NO : *nitric oxide* (monoxyde d'azote)

NOS : *oxyde nitric synthase* (oxyde nitrique synthétase)

NS : non-significatif

NSCC : *nonselective cation channel* (canal non-sélectif pour cation)

PAP : pression artérielle pulmonaire

PDE : phosphodiesterase

PGH<sub>2</sub> : prostaglandine H<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub> : prostacycline

PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>

PLC : phospholipase C

Po : pression d'ouverture

Pog : pression de l'oreillette gauche

RVP : résistance vasculaire pulmonaire

SNP : sodium nitroprussiate

TFA : *trifluoroacetic acid* (acide trifluoroacétique)

Thr : thrombine

TVC : tension veineuse centrale

TxA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>

U-II : urotensine II

U-46619 : 9,11-dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethanoprostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>

VD : ventricule droit

VEGF : *vascular endothelial growth factor* (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

VG : ventricule gauche

VIC : *vasoactive intestinal constrictor* (peptide vasoconstricteur intestinal)

VIH : virus d'immunodéficience chez l'humain

VOCC : *voltage operated calcium channel* (canal calcique voltage-dépendant)

WHO : *World Health Organization* (Organisation Mondiale de la Santé)

4-AP : 4-aminopyridine

5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

*À toi,  
pour ton aide précieuse,  
mais surtout pour tes  
encouragements  
et ton amour,  
merci.*




## Introduction

---


Les travaux entrepris dans le laboratoire ces dernières années ont visé à explorer et comprendre la biologie du système endothéline, son implication physiologique et pathologique dans l'hypertension pulmonaire afin de permettre le développement et l'optimisation des approches thérapeutiques de cette condition.

Nous évaluerons dans ce mémoire les effets d'une hyperendothélinémie isolée sur la réactivité vasculaire des petites artères pulmonaire chez le rat. Dans un premier temps, nous présenterons la biologie de l'endothélium ainsi que ses différentes composantes et plus précisément l'endothéline, puis nous aborderons la circulation pulmonaire et nous la décrirons en condition physiologique et pathologique ce qui nous permettra de définir la rationnelle de cette étude.



### 1.1 Biologie de l'endothélium

L'endothélium est composé d'une monocouche cellulaire et forme la surface luminale de tous les vaisseaux du système cardiovasculaire. Il est considéré comme un organe dynamique et multifonctionnel constitué de  $1-6 \times 10^{13}$  cellules.<sup>1</sup> L'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules endothéliales est essentielle pour le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. En effet, elles forment une barrière semi-perméable qui contrôle les échanges entre les composants sanguins et les tissus. Elles participent aussi au contrôle du tonus vasculaire en synthétisant et en libérant de nombreuses substances vasoactives qui influencent le muscle lisse vasculaire. De plus, les cellules endothéliales ont des propriétés antiplaquettaires, antithrombotiques, fibrolytiques et immunologiques.





La première substance endothéliale vasoactive découverte a été la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), en 1976, par Moncada *et al.*<sup>2</sup> Ils ont démontré qu'en plus d'exercer une action vasodilatatrice, la  $\text{PGI}_2$  inhibe l'agrégation plaquettaire. Quelques années plus tard, en 1980, le groupe de Furchgott et Zawadski ont démontré que la présence de l'endothélium est essentielle à la réponse vasodilatatrice de l'acétylcholine (Ach) sur des anneaux d'aorte de lapin.<sup>3</sup> Ces deux chercheurs ont postulé que cet effet provient de la liaison de Ach à des récepteurs muscariniques situés sur les cellules endothéliales. Cette association provoque la libération d'une ou de plusieurs substances qui agissent sur le muscle lisse. Ces substances vasodilatrices inconnues ont été qualifiées de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF). Par la suite, en tenant compte de plusieurs similarités avec les nitrates, Furchgott a identifié la nature de l'EDRF comme étant le monoxyde d'azote ( $\text{NO}$ ).<sup>4</sup> Il est à noter que Palmer et Moncada ont présenté les premières évidences de la synthèse de  $\text{NO}$ , par les cellules mammifères, en 1987 et ont aussi suggéré la parité entre l'EDRF et le  $\text{NO}$ .<sup>5</sup> De plus, lors de la même année, Greenberg a rapporté les premières évidences d'une dilatation endothélium-dépendante dans les artères pulmonaires humaines.<sup>6</sup>

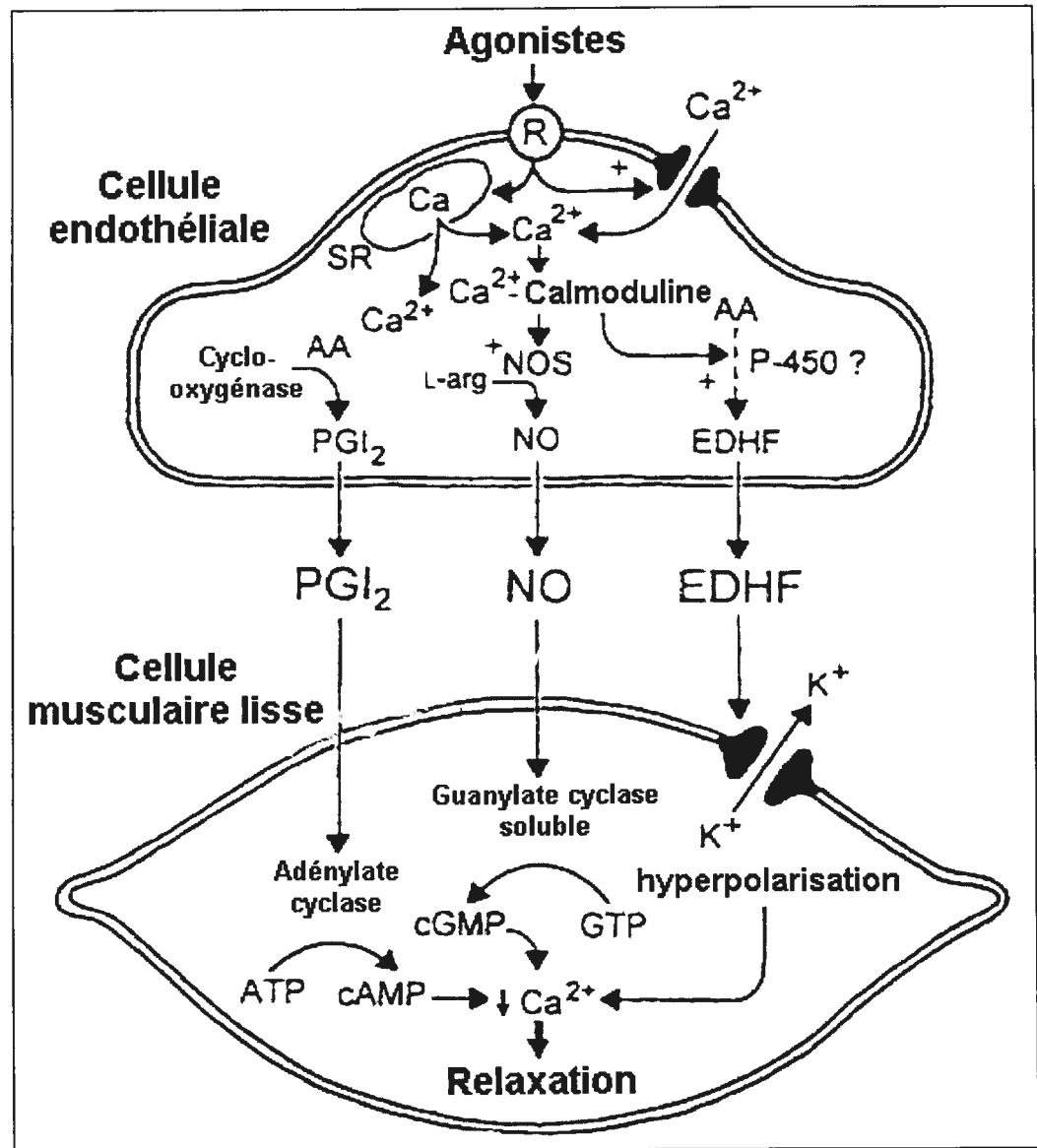
Les cellules endothéliales produisent aussi des facteurs contractiles dont l'activité peut être réduite lors de l'endommagement endothélial. Ceci a été prouvé en 1981 par De Mey et Vanhoutte; leurs résultats ont démontré une diminution significative des contractions induites par de grandes concentrations de potassium ( $\text{K}^+$ ) à la suite de la destruction de l'endothélium.<sup>7</sup> Ce ou ces facteurs, par homologie avec l'EDRF, ont été nommés facteur contractant dérivé de l'endothélium (EDCF). En 1985, il fut évident, par l'utilisation d'antagonistes spécifiques, que ce facteur était libéré par les cellules endothéliales en présence de calcium extracellulaire et indépendamment des systèmes  $\alpha$ -adrénergiques, cholinergiques, sérotoninergiques et histaminiques.<sup>8,9</sup> Ce facteur a été caractérisé en 1988 par l'équipe du Dr Masaki au Japon. Le peptide de 21 acides aminés a été

isolé à partir d'un milieu de culture de cellules endothéliales d'aorte de porc et nommé endothéline (ET).<sup>10</sup> Considérée depuis la fin des années 80 comme le plus puissant vasoconstricteur, l'endothéline a récemment été déclassée par l'urotensine II (U-II) humaine.<sup>11</sup> Toutefois, cette affirmation ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique puisque les effets de l'U-II sont variables dans les tissus vasculaires des différentes espèces mammifères.<sup>12</sup> Il est à noter que l'endothélium pulmonaire joue un rôle de modulateur. En effet, l'Ach, la bradykinine (BK), l'histamine et l'acide arachidonique (AA) provoquent la vasoconstriction des vaisseaux pulmonaires lorsque celui-ci est absent ou endommagé et une vasodilatation lorsqu'il est intact.<sup>13-16</sup>

## 1.2 Les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium

Conformément à ce qui a été mentionné dans les paragraphes précédents, l'endothélium vasculaire joue un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire par la libération de substances vasodilatatrices telles que le NO ou EDRF, la PGI<sub>2</sub>, le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), l'adrénomodulline et le facteur natriurétique de type C (CNP). (Figure 1)

Figure 1 : Les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium



Résumé schématique de la libération des facteurs relaxants ( $PGI_2$ , NO et EDHF) par les cellules endothéliales et leurs effets subséquents sur les cellules musculaires lisses. L'adrénomodulline n'est pas représentée. Tiré de « Functions of the healthy endothelium » par Kharbanda, R.K. & Deanfield, J.E..<sup>17</sup>

### 1.2.1 Le monoxyde d'azote

Le NO est libéré par les cellules endothéliales en réponse aux forces de cisaillements produites par le flot sanguin et suite à la liaison de la thrombine (Thr), l'histamine, l'ADP, l'ET, Ach et la BK à leur récepteur tel que présenté à la droite de la figure 2.<sup>18</sup>

**Figure 2 : Les facteurs vasoactifs libérés par l'endothélium**

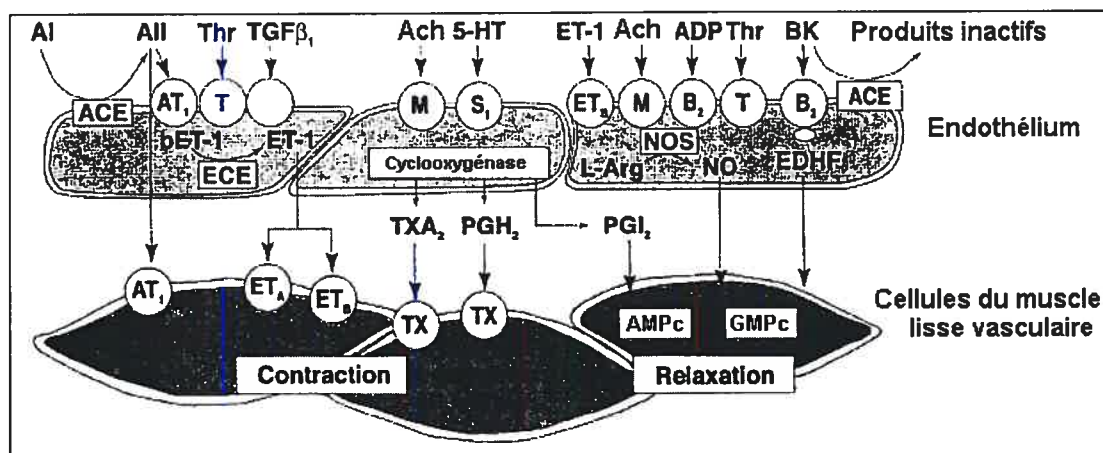


Schéma représentant les différents facteurs vasoactifs produits par l'endothélium suite à la liaison agoniste-récepteur et leurs effets constricteurs (gauche) et relaxants (droite) sur le muscle lisse vasculaire. Tiré et traduit de « Biology of the endothelium » par Lüscher, T.F. & Barton, M..<sup>19</sup>

Le NO a des effets vasodilatateurs et antiprolifératifs sur le muscle lisse vasculaire et inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire.<sup>20</sup> Il est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine par la NO synthétase (NOS).<sup>21</sup> Il existe trois isoformes de la NOS : endothéliale (eNOS ou NOS III), neuronale (nNOS ou NOS I) et induite par les cytokines (iNOS ou NOS II). Deux profils d'expression sont possibles pour ces trois formes : la eNOS et la nNOS sont exprimées de façon constitutive à de faibles niveaux et peuvent rapidement être activées en présence d'ions calciques (Ca<sup>2+</sup>) et de calmoduline. En effet, sous sa forme inactive, la eNOS est retrouvée dans

une cavéole attachée à une cavéoline. Une augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  par des stimuli chimiques et physiques, permet l'activation de la calmoduline qui déplace la calvéoline ce qui favorise l'activation de la eNOS.<sup>22</sup> Cette isoforme a été clonée à partir de cellules endothéliales humaines et bovines et elle est responsable de la production du NO nécessaire au tonus vasculaire basal.<sup>23;24</sup> Pour ce qui est de la nNOS, sa localisation neuronale a été démontrée en 1990 ainsi que la première évidence d'une association entre le NO et les neurones.<sup>25</sup> La iNOS, par contre, est induite par les cellules endothéliales ou des macrophages lorsque ceux-ci sont activés par des cytokines lors de réponses inflammatoires et immunitaires. Cette enzyme a été découverte et clonée en 1992, lorsque des macrophages ont été exposés à des cytokines et à des produits bactériens.<sup>26;27</sup> Elle est  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendante et elle est inhibée par les glucocorticoïdes.<sup>28</sup>

Le développement d'analogues de la L-arginine a permis une meilleure connaissance du système du NO ainsi que de son rôle physiologique. En effet, l'activité de la eNOS peut être inhibée pharmacologiquement par l'utilisation de  $\text{N}^{\omega}$ -monométhyl-L-arginine (L-NMMA) qui compétitionne avec la L-arginine pour le site catalytique de la NOS.<sup>29</sup> L'utilisation de L-NMMA en infusion, dans l'artère brachiale de volontaires sains, a permis de révéler le rôle fondamental du NO dans la régulation du tonus vasculaire basal.<sup>30</sup> De plus, une étude similaire réalisée sur la circulation pulmonaire confirme l'importance de la production endothéliale de NO pour la régulation de la circulation sanguine chez l'humain.<sup>31</sup> Le  $\text{N}^{\omega}$ -nitro-L-arginine (L-NNA) et le  $\text{N}^{\omega}$ -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) sont aussi des inhibiteurs stéréospécifiques de la NOS dont les effets sur le tissu vasculaire sont similaires à ceux observés avec le L-NMMA.<sup>32;33</sup>

Puisque la demi-vie biologique du NO est très courte, de l'ordre de quelques secondes, il diffuse rapidement vers le muscle lisse vasculaire par la membrane basale de la cellule endothéliale.<sup>34</sup> Le NO augmente les concentrations de  $\text{GMP}_C$  par l'activation de l'enzyme guanylate cyclase soluble ( $\text{GC}_S$ ).<sup>35</sup> Dans plusieurs expériences, le bleu de méthylène est utilisé pour inhiber cette enzyme alors que des composés donneurs de NO comme le sodium nitroprussiate (SNP) la stimulent. Les niveaux élevés de  $\text{GMP}_C$  provoquent une diminution de l'influx calcique par les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendant de type L et par conséquent, favorise la relaxation du muscle lisse. Le  $\text{GMP}_C$  agit de façon directe et indirecte sur les canaux  $\text{Ca}^{2+}$ . Premièrement, une protéine kinase  $\text{GMP}_C$ -dépendante peut phosphoryler le canal  $\text{Ca}^{2+}$  ou alors une phosphoprotéine associée au canal ce qui cause une diminution de la probabilité d'ouverture de celui-ci indépendamment du voltage.<sup>36</sup> Deuxièmement, de façon indirecte, une protéine kinase  $\text{GMP}_C$ -dépendante peut causer une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux potassiques ( $\text{K}^+$ ), ce qui hyperpolarise la cellule et provoque une désactivation voltage-dépendante des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>37</sup> De plus, ce nucléotide stimule aussi l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique vers l'extérieur de la cellule. Cet effet semble être causé par une stimulation de la pompe Ca-ATPase de la membrane plasmique.<sup>38;39</sup> Le NO peut aussi directement activer les canaux  $\text{K}^+$  calcium-dépendant ( $\text{BK}^+_{Ca}$ ) sans avoir recours au  $\text{GMP}_C$  tel qu'il a été démontré par Bolotina *et al.* en 1994.<sup>40</sup> Conséquemment, les mécanismes qui favorisent l'activation des canaux  $\text{K}^+$  semblent être responsables de la diminution de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  et de la relaxation subséquente du muscle lisse.

### 1.2.2 La prostacycline

L'endothélium vasculaire synthétise et libère de la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) en réponse à plusieurs substances telles que la thrombine, la thromboxane

$A_2$  ( $TxA_2$ ), la vasopressine, l'angiotensine II, l'ET et les forces de cisaillements. Elle est synthétisée à partir de l'AA par la prostaglandine  $H_2$  ( $PGH_2$ ) synthétase qui possède deux activités catalytiques : une activité cyclo-oxygénase et une activité peroxydase.<sup>2</sup> C'est l'activité cyclo-oxygénase (COX) qui est inhibée par l'aspirine et l'indométacine.<sup>41;42</sup> La  $PGI_2$  a une courte demi-vie et de faibles niveaux plasmatiques, c'est un autacoïde locale.<sup>43</sup> Elle est inactivée par la PG-15 hydroxydéhydrogénase qui est retrouvée en grande quantité dans les artères et les veines.<sup>44</sup> En se liant à son récepteur (IP) couplé à une protéine  $G_s$ , la  $PGI_2$  active l'enzyme adénylate cyclase (AC) ce qui augmente les niveaux intracellulaires d' $AMP_C$  des cellules du muscle lisse et permet une vasodilatation.<sup>45;46</sup> La  $PGI_2$  inhibe aussi l'activation des plaquettes.<sup>47</sup> Donc, les effets inhibiteurs de la  $PGI_2$  sur l'adhésion leucocytaire et l'agrégation plaquettaire combinés à ceux du NO, permettent à l'endothélium d'avoir une importante activité antithrombotique.<sup>48</sup>

### 1.2.3 Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Ce ou ces composés, encore non identifiés, produisent une hyperpolarisation endothélium-dépendante des cellules du muscle lisse.<sup>49</sup> Ce phénomène présent chez différentes espèces n'est pas influencé par les analogues de la L-arginine ou les inhibiteurs de la COX.<sup>50;51</sup> L'hyperpolarisation du muscle lisse induit une vasodilatation en diminuant la probabilité d'ouverture des canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants.<sup>52</sup> Le changement de polarité cellulaire est observé sans augmentation intracellulaire des nucléotides cycliques tels que l' $AMP_C$  et le  $GMP_C$ .<sup>50</sup> De plus, les inhibiteurs des canaux  $BK^+_{Ca}$ , des canaux  $K^+$  voltage et ATP-dépendants du muscle lisse vasculaire entravent cette hyperpolarisation.<sup>53-55</sup>

L'identité de l'EDHF est toujours controversée, mais un acide époxyeicosatriénoïque (EET) synthétisé par le cytochrome P450, a été

proposé.<sup>56</sup> De même, en 1996, Randall a postulé que l'EDHF pourrait être un cannabinoïde, l'anandamide, dans les lits mésentériques et coronaires artériels chez le rat.<sup>57</sup> Cependant, cette hypothèse a bien vite été rejetée, car l'anandamide ne produit pas d'hyperpolarisation dans les vaisseaux sanguins des autres espèces. De récentes évidences scientifiques démontrent l'ouverture de canaux  $K^+$  sensibles à la charybdotoxine et à l'apamine dans les cellules endothéliales suite à la liaison de substances neurohumorales démontrant par le fait même la possibilité que le  $K^+$  soit l'EDHF. L'augmentation des concentrations  $K^+$  provoquerait l'hyperpolarisation et la relaxation du muscle lisse sous-adjacent par l'activation des canaux  $K^+$  sensibles au  $Ba^{2+}$  ainsi que de la pompe  $Na^+/K^+$  ATPase.<sup>58;59</sup> Finalement, des molécules ayant une courte demie-vie telle que le monoxyde de carbone (CO), les radicaux hydroxyles ( $HO^\cdot$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) de même que le NO et la  $PGI_2$  produisent une hyperpolarisation et sont considérés comme des EDHF. Néanmoins, celui-ci ou ceux-ci ne sont toujours pas identifiés avec certitude.

#### 1.2.4 L'adrénomodulline

Découvert en 1993, ce peptide de 52 acides aminés a été isolé et purifié à partir de cellules tumorales de la médullo-surrénale (phéochromocytome).<sup>60</sup> L'expression du gène de l'adrénomodulline (AM), retrouvé sur le chromosome 11, est régulée par une grande variété de stimuli humoraux. L'AM est majoritairement synthétisée par les cellules endothéliales de divers organes dont le poumon et à un moindre degré par différents autres types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses.<sup>61</sup> Elle produit une vasodilatation puissante et soutenue chez l'homme.<sup>62</sup> Les faibles niveaux circulants de celle-ci suggèrent une activité autocrine/paracrine. Toutefois, les concentrations plasmatiques sont augmentées significativement dans plusieurs pathologies liées aux systèmes



cardiovasculaire, respiratoire, rénal et endocrinien.<sup>63</sup> Ceci suggère un rôle hypotenseur en condition pathologique confirmé par des études chez l'homme et le rat où une infusion d'AM à des niveaux élevés provoque une importante chute de la pression artérielle systémique.<sup>64;65</sup>

L'AM exerce ses effets principalement par l'augmentation des niveaux d'AMP<sub>C</sub> dans le muscle lisse et par libération de NO par les cellules endothéliales.<sup>66;67</sup> Deux types de récepteurs pour l'AM ont récemment été décrits.<sup>68;69</sup> Ceux-ci sont constitués de deux éléments qui sont essentiels à la liaison agoniste-récepteur. Le premier élément possède sept domaines transmembranaires et se nomme *calcitonin receptor-like receptor* (CRLR). Il se lie à un deuxième élément, une molécule de chaperronage désignée *receptor activity modifying proteins* (RAMP1) pour former le récepteur CGRP1. Deux autres molécules, RAMP2 et RAMP3, qui ont aussi un domaine transmembranaire, ont la possibilité de se lier au CRLR pour constituer le deuxième récepteur qui est spécifique à l'AM. Par conséquent, les niveaux tissulaires de ces molécules de chaperronage influencent fortement la densité et la nature des récepteurs de l'AM. L'AM circulante est en majorité liée à une protéine de liaison spécifique l'*adrenomedullin binding protein* (AMBP<sub>1</sub>) identifiée comme le facteur H du complément.<sup>70</sup> Celui-ci agirait à titre de transporteur et de réservoir permettant à l'AM de s'accumuler localement pour stimuler ses récepteurs. En outre, plusieurs études suggèrent un rôle majeur du poumon dans la clairance de l'AM.<sup>71;72</sup> Cependant, les données publiées demeurent qualitatives et indirectes et des études structurées sont nécessaires afin de bien caractériser ce phénomène.

### 1.2.5 Le facteur natriurétique de type C

Le CNP originalement mis en évidence dans le cerveau porcin, est le troisième membre de la famille des peptides natriurétiques qui inclut l'ANP et

le BNP; deux peptides vasoactifs essentiels à l'homéostasie cardiovasculaire.<sup>73</sup> Quoique structurellement similaire, ce peptide est génétiquement distinct. La forme biologiquement active est composée de 22 acides aminés et elle est produite par les cellules endothéliales de différentes espèces, dont l'humain, le porc, le chien et le rat.<sup>74</sup> Sa sécrétion est régulée par les cytokines, les facteurs de croissance, le stress oxydatif et les forces de cisaillements.<sup>74;75</sup> De plus, l'ANP et le BNP stimulent fortement son expression génique en plus de sa libération dans les cellules endothéliales bovines.<sup>76</sup> Le CNP possède plusieurs effets cardiovasculaires tels qu'une diminution des pressions de remplissage et d'éjection cardiaque secondaire à une vasorelaxation et d'une diminution du retour veineux.<sup>76</sup> En effet, celui-ci est un venodilatateur endothélium indépendant, il inhibe la production d'aldostérone et il possède également une activité inhibitrice sur la prolifération du muscle lisse vasculaire *in vitro* et possiblement *in vivo*.<sup>77;78</sup>

Le CNP exerce ses actions biologiques par trois types de récepteurs NPR-A, NPR-B et NPR-C. Ceux-ci possèdent une protéine kinase intracellulaire liée à un domaine contenant une guanylyl cyclase.<sup>79</sup> La formation du GMPc ainsi que l'ouverture des canaux K<sup>+</sup> par l'activation d'une protéine kinase GMPc-dépendante sont responsables des effets vasodilatateurs du CNP.<sup>80</sup> Toutefois, ceux-ci dépendent de l'activité de phosphodiésterases intracellulaires qui dégradent le cGMP et préviennent son accumulation.<sup>81</sup> Il est à noter que le NPR-C a été identifié comme un récepteur de clairance puisque plusieurs études démontent l'internalisation et le recyclage de celui-ci suite à la dégradation du peptide natriurétique lié dans les lysosomes.<sup>82</sup> De plus, le CNP peut être dégradé par une endopeptidase neutre 24.11 (NEP) qui est retrouvée dans les poumons, le cœur, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires.

## 1.3 Les facteurs contractants dérivés de l'endothélium

L'endothélium ne produit pas seulement des substances vasodilatatrices, mais joue plutôt le rôle d'un chef d'orchestre dans l'homéostasie vasculaire en conservant une harmonie fragile entre les composés vasoactifs dilatateurs et constricteurs. Il synthétise des facteurs contractants tels que la  $\text{TxA}_2$ , l'ET et l'anion superoxide et régule le système rénine-angiotensine ainsi que celui des kinines.

### 1.3.1 La thromboxane $\text{A}_2$

La  $\text{TxA}_2$  est produite dans plusieurs types cellulaires, mais plus principalement dans les plaquettes.<sup>83</sup> Elle est formée par une enzyme microsomale, la thromboxane synthétase, et sa demi-vie est de l'ordre de quelques secondes.<sup>84</sup> De même que pour la  $\text{PGI}_2$ , la  $\text{TxA}_2$  est un produit de la cascade de l'AA. Chez les humains, il existe deux types de récepteurs pour la  $\text{TxA}_2$ ,  $\text{TP}\alpha$  et  $\text{TP}\beta$ , et ils proviennent du même gène.<sup>85</sup> Ils sont retrouvés sur les plaquettes et également sur les cellules endothéliales et musculaires lisses.<sup>86</sup> Fait intéressant, le récepteur TP peut être désensibilisé et subir une rétroaction négative par l'augmentation d' $\text{AMP}_C$  induite par la liaison de la  $\text{PGI}_2$  à son récepteur IP.<sup>87</sup>

La liaison de la  $\text{TxA}_2$  à son récepteur active la phospholipase C et favorise l'augmentation des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. De plus, il a été démontré que la stimulation des récepteurs TP inactive les canaux  $\text{BK}^+_{\text{Ca}}$  et empêchent ainsi l'hyperpolarisation cellulaire.<sup>88</sup> La  $\text{TxA}_2$  stimule fortement l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction du muscle lisse, de même que la mitogénèse et l'hypertrophie des cellules qui le compose.<sup>89;90</sup> Par conséquent, elle joue un rôle majeur dans le développement et le maintien des maladies cardiovasculaires telles que l'angine instable,

l'ischémie myocardique, l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose ainsi que dans plusieurs pathologies rénales.<sup>91;92</sup> Toutefois, la PGI<sub>2</sub> contrebalance ces effets en condition physiologique et un dérèglement de cette homéostasie donne lieu à des conditions propices au développement de pathologies. Le composé U-46619 (9,11-dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethanoprostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ) est un analogue mimétique de la TxA<sub>2</sub> fréquemment utilisé dans les études scientifiques.

Il est à noter que l'AA est aussi transformée par les lipoxygénases de la voie linéaire en plusieurs acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HPETE) et la présence de ce système dans l'endothélium vasculaire a clairement été démontrée.<sup>93</sup> Les leucotriènes et les lipoxines, des HPETE, sont majoritairement synthétisées dans les globules blancs. Les lipoxines sont encore peu connues, mais les leucotriènes sont considérées comme des vasoconstricteurs puissants, des activateurs et des chemoattractants leucocytaires et elles augmentent la perméabilité membranaire. Par conséquent, elles sont des médiateurs importants du choc circulatoire et de l'ischémie en plus de jouer un rôle prépondérant dans les réactions allergiques et inflammatoires.<sup>94</sup>

### 1.3.2 L'angiotensine II

Le système rénine-angiotensine exerce un rôle central dans la physiologie et la pathologie cardiovasculaire. L'AgII est formée à partir de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) que l'on retrouve à la surface des cellules endothéliales. L'ET-1 accélère cette formation dans les cellules endothéliales pulmonaires.<sup>95</sup> L'AgII est un vasoconstricteur impliqué dans le contrôle vasculaire local et systémique, dans la filtration glomérulaire et elle a des propriétés prothrombotiques et oxidatives. Deux types distincts de récepteurs, AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, ont été

identifiés.<sup>96;97</sup> La densité de ceux-ci est régulée par des facteurs hormonaux et leur expression est grandement influencée par les processus pathologiques.<sup>98</sup> Le récepteur AT<sub>1</sub> se retrouve dans le coeur, les reins et certaines régions du cerveau. Il est présent au niveau des cellules endothéliales et des fibres musculaires lisses de l'ensemble du lit artériel.<sup>98</sup> La liaison l'AngII/AT<sub>1</sub> permet l'activation des phospholipases A<sub>2</sub>, C et D, l'ouverture des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendant et une diminution de l'activité de l'AC. Ces actions se concluent par une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire.<sup>99</sup> De surcroît, de nombreuses tyrosines kinases sont stimulées et plusieurs radicaux libres sont formés. L'ensemble de ces réactions provoque la croissance et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses et endothéliales, la formation d'une matrice extracellulaire, du stress oxydatif et des réactions inflammatoires en plus des effets vasoconstricteurs et de la sécrétion d'ET et de catécholamines.

Quant au récepteur AT<sub>2</sub>, il est exprimé en grande quantité dans les tissus foetaux et son expression diminue rapidement à la naissance. On le retrouve au niveau des cellules endothéliales de la majorité des artères.<sup>98</sup> Plusieurs évidences provenant de laboratoires indépendants suggèrent les effets bénéfiques du récepteur AT<sub>2</sub> pour contrebalancer les actions pressives et prolifératrices du récepteur AT<sub>1</sub>.<sup>100</sup> Effectivement, la stimulation de l'AT<sub>2</sub> est associée à une augmentation de NO, de bradykinine et de GMPc.<sup>101;102</sup> Toutefois, l'expression cellulaire, la régulation et les actions de celui-ci nécessitent des études plus approfondies.

De plus, l'endothélium libère aussi la bradykinine, une kinine qui produit une réponse hypotensive de faible durée chez l'homme, lorsqu'injectée par voie intraveineuse.<sup>103</sup> Ses effets sont causés par un récepteur B<sub>2</sub> couplé à une protéine G à la surface des cellules endothéliales. La liaison agoniste-récepteur provoque plusieurs événements intracellulaires incluant la mobilisation du Ca<sup>2+</sup>, la formation de NO et l'activation de l'AC.

Des évidences récentes suggèrent que l'EDHF est beaucoup plus important que le NO et la PGI<sub>2</sub> dans les effets vasodilatateurs induits par la bradykinine dans les vaisseaux de résistance de l'avant-bras humain.<sup>104</sup> Cette kinine est presque complètement métabolisée par la kininase II, identique à la ECA, lors d'un passage unique dans le lit vasculaire pulmonaire.<sup>105</sup> Il a été souligné dans une étude intéressante de Horning, que les effets bénéfiques de l'utilisation des inhibiteurs de ECA sont attribués en grande partie à leurs actions sur la bradykinine.<sup>106</sup>

### 1.3.3 L'anion superoxide

Les cellules endothéliales humaines sont également une source d'anion superoxide dont la formation est stimulée par les cytokines ainsi que par la pulsation sanguine sur la paroi vasculaire.<sup>107-109</sup> Celui-ci est considéré comme un facteur contractant dérivé de l'endothélium (EDCF) et il est habituellement inactivé par le NO. Toutefois, la NOS peut également produire ce facteur vasoconstricteur lorsque les concentrations de L-arginine sont faibles.<sup>110</sup> Par conséquent, les effets biologiques bénéfiques du NO sont attribuables à son rôle de régulateur de l'anion superoxide en plus de ses effets classiques vasodilatateurs et antiprolifératifs.

### 1.3.4 L'endothéline

La découverte et la caractérisation de l'ET, il y a maintenant 15 ans, ont généré de nombreuses interrogations et études scientifiques qui nous ont permis de mieux comprendre ce système. La biosynthèse, les récepteurs, les rôles physiologiques et pathologiques de ce puissant peptide vasoconstricteur seront discutés de façon détaillée dans la prochaine section de ce mémoire.

## 1.4 Biologie du système endothéline

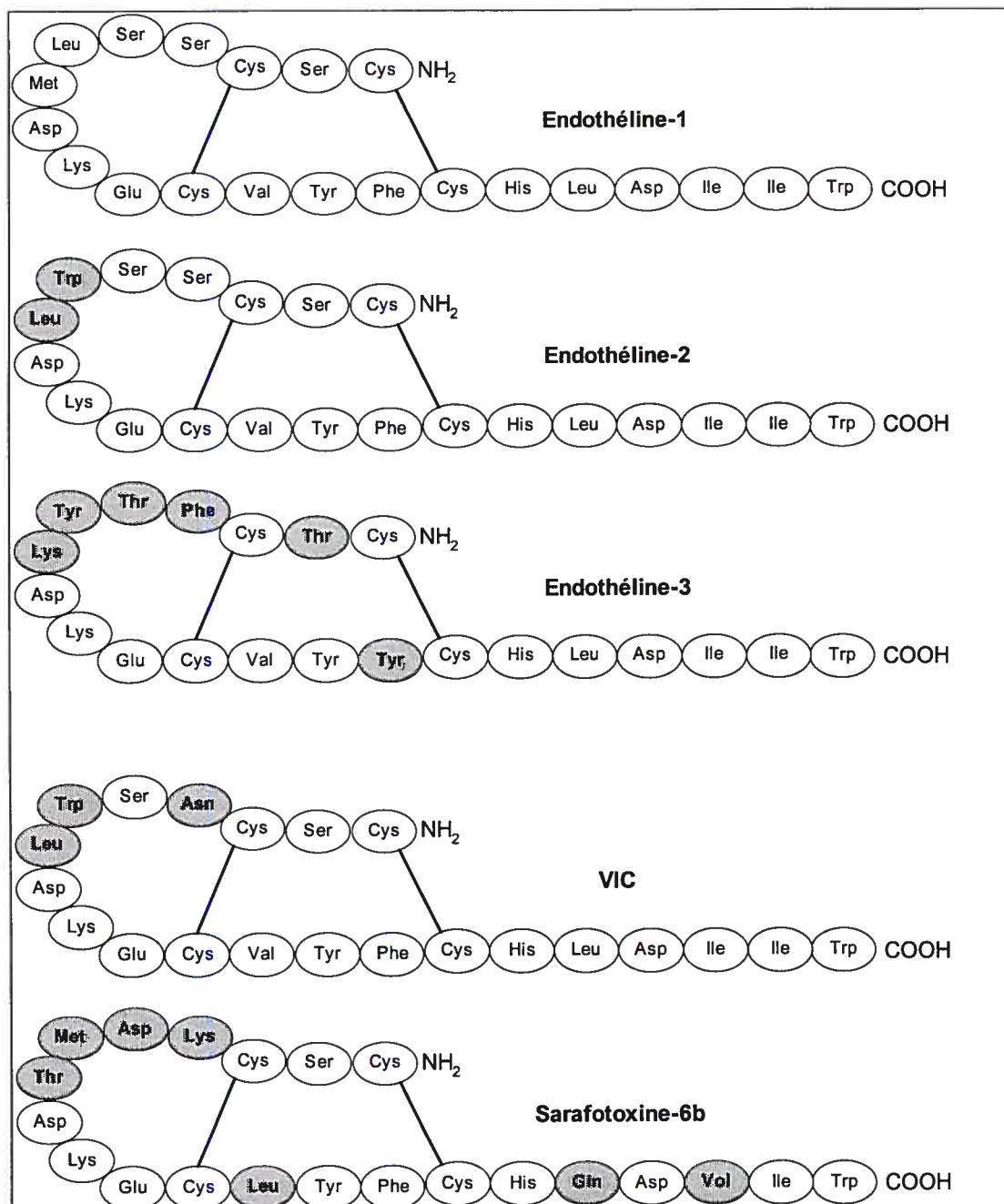
L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide vasoactif qui possède une activité vasoconstrictrice et des effets mitogènes sur le muscle lisse.<sup>10;111</sup> Elle est composée de 21 acides aminés et caractérisée par deux domaines terminaux et deux ponts disulfures entre les cystéines en position 1-15 et 3-11.(Figure 3) Le domaine N-terminal détermine l'affinité pour le récepteur alors que le domaine C-terminal contient le site de liaison pour l'agoniste. Deux isoformes, ET-2 et ET-3, ayant une structure très similaire et provenant de gènes différents, ont été caractérisées.<sup>112</sup> Une quatrième isoforme, ET-4, le peptide vasoconstricteur intestinal (VIC) a aussi été identifié dans le système intestinal de la souris.<sup>113</sup> Quoique les trois isoformes humaines soient largement distribuées, l'ET-1 est la plus puissante et la plus connue. Elle est la seule présente au niveau des cellules endothéliales du système vasculaire. En outre, il est intéressant de remarquer que la structure des endothélines possède une grande homologie avec une autre famille de peptide, les sarafotoxines (-6a, -6b, -6c et -6d). Celles-ci sont des neurotoxines qui proviennent du venin de serpent (*Atractaspis egaddensis*) et qui provoquent une vasoconstriction généralisée de la proie de ce reptile.

### 1.4.1 La biosynthèse de l'endothéline

Le précurseur de chaque isoforme est codé par un gène différent : la pré-proendothéline-1 (préproET-1) est retrouvée sur le chromosome humain 6p23-24, la préproET-2 sur le chromosome 1p34 et la préproET-3 sur le chromosome 20q13.2-13.3. L'expression génique de l'ARNm des ETs peut être stimulée par plusieurs facteurs : la Thr, les facteurs de croissance, les cytokines, l'insuline, la vasopressine, l'AgII, les catécholamines, la BK, l'hypoxie et l'ET elle-même. En outre, elle peut aussi être inhibée par le NO, la  $PGI_2$ , le peptide natriurétique de l'oreillette, l'héparine et les

oestrogènes.<sup>114</sup> De plus, l'expression de l'ARNm de l'ET de même que la production de ce peptide par les cellules endothéliales, sont régulées par les forces de cisaillements et l'ischémie.

**Figure 3 :** Structure primaire des endothélines-1, -2, et -3 humaines, de VIC et de la sarafotoxine-6b.



VIC : peptide vasoconstricteur intestinal. Les acides aminés ombragés représentent les différences par rapport à l'endothéline-1.<sup>115</sup>



Donc, la préproET-1, une protéine de 212 acides aminés, est clivée protéolytiquement par une endopeptidase entre les résidus 52-53 et par une carboxypeptidase entre les résidus 91-92.<sup>116</sup>(Figure 4) Un peptide intermédiaire de 38 acides aminés, la proET-1 plus communément nommée big-ET-1, est ainsi formée. La big-ET-1 est ensuite clivée entre les résidus tryptophane et valine en position 21 et 22 par une autre endopeptidase, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), pour engendrer la forme active de l'ET-1. L'ECE est une métalloprotéinase qui est inhibée par le phosphoramidon.<sup>117</sup> Il est à noter que la big-ET-1 peut aussi être clivée par une chymase entre les résidus Try<sup>31</sup> et Gly<sup>32</sup> et former une ET de 31 acides aminés qui a aussi des propriétés vasoconstrictrices.<sup>118</sup>

**Figure 4 : Biosynthèse de l'ET-1**

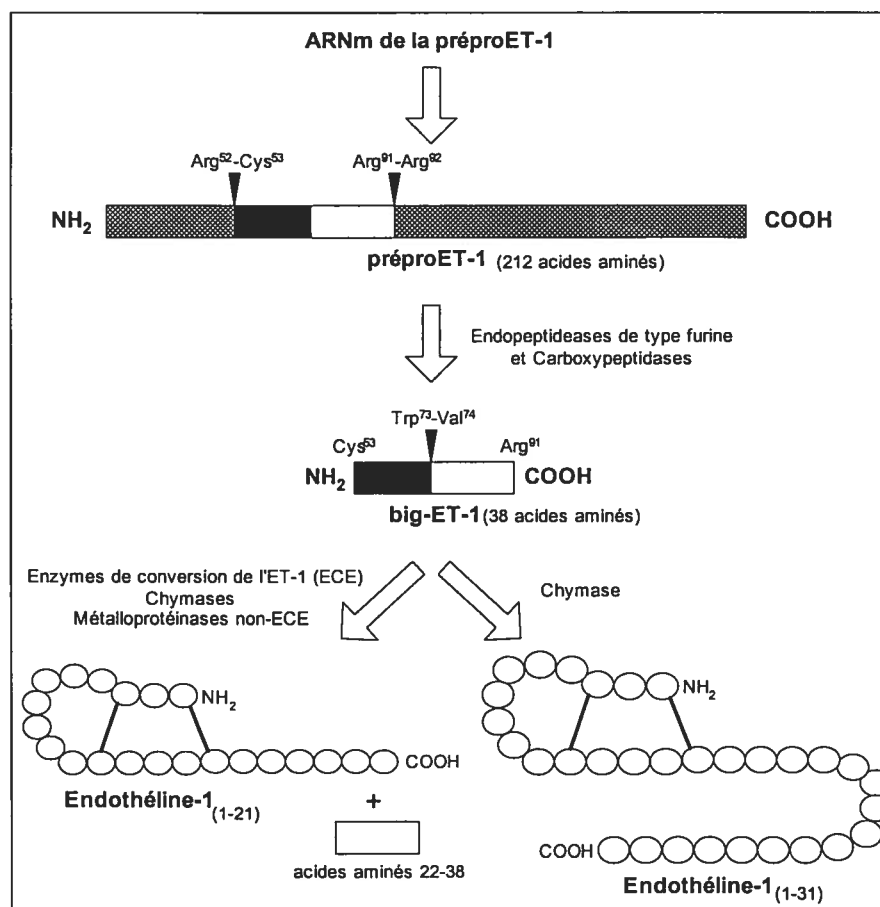


Schéma représentant la voie de la biosynthèse de l'endothéline-1 (ET-1) de 21 et de 31 acides aminés; ceux-ci sont représentés par les petits cercles.<sup>10</sup>

La conversion de la big-ET-1 en ET-1 est essentielle pour l'activité biologique de celle-ci, car *in vivo*, la big-ET-1 a seulement 1 % de l'activité contractile du peptide mature.<sup>119</sup> La biosynthèse des deux autres isoformes de l'ET se fait exactement de la même façon, mais avec leurs enzymes et précurseurs respectifs. Puisque que l'ensemble de mon travail de maîtrise porte sur la réactivité vasculaire et que l'ET-1 est la seule isoforme présente au niveau de l'endothélium vasculaire, les aspects biologiques et physiologiques de ET-1 seront privilégiés dans les prochaines sections.

#### 1.4.1.1 Les enzymes de conversion de l'endothéline-1

L'ECE-1 a été la première enzyme de cette famille à avoir été identifiée. Elle a initialement été purifiée et clonée à partir du poumon de rat.<sup>120;121</sup> C'est une métalloendopeptidase zinc-dépendante et elle présente une grande homologie structurale avec l'endopeptidase neutre (NEP)-24.11. Elle est codée par le chromosome humain 1p36 et quatre isoformes (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d) ont été découvertes jusqu'à maintenant.<sup>122</sup> Celles-ci sont formées par l'utilisation alternative de deux promoteurs et par un épissage complexe. L'ECE-1 est non-sélective pour les différentes big-ET et elle agit à pH neutre.<sup>123</sup> Elle est omniprésente dans l'endothélium vasculaire humain et particulièrement au niveau pulmonaire où elle catalyse la conversion de la big-ET-1 en ET-1 biologiquement active. Par contre, l'ECE-1 est exprimée de façon faible à modérée dans les cellules musculaires lisses.<sup>124</sup> L'immunofluorescence a démontré des différences claires entre les localisations cellulaires des différentes ECE. L'ECE-1b est localisée intracellulairement alors que les deux autres isoformes sont exclusivement (ECE-1a) et majoritairement (ECE-1c) retrouvées sur la membrane plasmique.<sup>125</sup>

L'ECE-2, quant à elle, a été clonée à partir de cellules endothéliales bovines et elle possède 59 % d'homologie avec l'ECE-1.<sup>126</sup> Elle est exprimée dans les cellules endothéliales humaines.<sup>127</sup> Le pH optimal pour son activité enzymatique est acide (pH=5.5). Par conséquent, selon certains chercheurs elle serait localisée dans un compartiment intracellulaire tel que le réseau *trans*-Golgi ou alors associée à celui-ci.<sup>126</sup> Cette enzyme est plus vulnérable au phosphoramidon que l'ECE-1 et elle convertit plus efficacement la big-ET-1 que la big-ET-2 et la big-ET-3. Récemment quatre isoformes de l'ECE-2 (ECE-2a-1, ECE-2a-2, ECE-2b-1, ECE-2b-2) ont été isolées et caractérisées chez la souris et le bovin.<sup>128</sup> Toutefois, leurs fonctions physiologiques sont toujours inconnues. Un autre type de ECE (ECE-3) a aussi été purifié à partir de microsomes de l'iris bovin. Elle clive sélectivement la big-ET-3 et elle semble avoir un rôle au niveau neuronal mais celui-ci n'est toujours pas confirmé.<sup>129</sup>

#### 1.4.1.2 La sécrétion de l'endothéline-1

Deux théories contradictoires s'affrontent quant au mode de sécrétion de l'ET-1. Dans le premier cas, les cellules productrices d'ET-1 telles que les cellules endothéliales vasculaires, ne contiennent pas de granules de sécrétion dans lesquelles l'ET-1 peut être emmagasinée puis relâchée ultérieurement.<sup>130</sup> L'ET-1 est sécrétée de façon constitutive et l'étape limitante de sa biosynthèse est le niveau de transcription. De nombreux facteurs peuvent stimuler et supprimer la synthèse d'ET-1 tel que mentionné dans une précédente section. Plusieurs évidences laissent suggérer que l'ET-1 est libérée constitutivement pour le maintien du tonus vasculaire de base et les concentrations plasmatiques physiologiques de l'ET-1 sont approximativement de 1 fmol /mL.<sup>131</sup> Toutefois, un groupe de chercheurs a émis une hypothèse voulant qu'une seconde voie de sécrétion pour l'ET-1, la voie régulée, s'ajoute à la première précédemment énoncée.<sup>132</sup> En effet, il

existe des vésicules de sécrétion, les vésicules Weidel-Palade, associées à l'ECE et dans lesquelles la big-ET-1 est transformée en ET-1 et où celle-ci est emmagasinée.<sup>133</sup>

Des lésions endothéliales, différents stimuli chimiques ou de faibles forces de cisaillements stimulent la sécrétion d'ET-1 et celle-ci est alors relâchée à de fortes concentrations.<sup>134</sup> Des études ont démontré que la libération d'ET-1 était trop rapide pour être attribuée à une synthèse *de novo* soutenant par le fait même la présence de granules de sécrétion intracellulaires.<sup>135</sup> L'ET-1 agit préférentiellement de façon autocrine/paracrine puisqu'environ 80 % de sa synthèse est délivrée vers la membrane basolatérale pour agir sur le muscle lisse.<sup>136</sup> La concentration de l'ET-1 dans le tissu vasculaire est environ 100 fois celle retrouvée au niveau plasmatique. Toutefois, une très grande proportion du peptide vasoactif est liée à ses récepteurs.<sup>137</sup> Il est à noter que la demie-vie de l'ET-1 dans le sang est d'environ sept minutes parce qu'elle se lie promptement à ses récepteurs et qu'une enzyme de dégradation (EDE) la métabolise rapidement.<sup>138</sup>

#### 1.4.2 Les récepteurs vasculaires de l'endothéline-1

L'ET agit via deux types de récepteurs, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>.<sup>139;140</sup> Ces récepteurs ont sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G. Le récepteur ET<sub>A</sub> humain est codé à partir du chromosome 4, il est formé de 427 acides aminés et lie avec une grande affinité l'ET-1 et l'ET-2 et faiblement l'ET-3. Le récepteur ET<sub>B</sub>, quant à lui, est retrouvé sur le chromosome 13, il est composé de 442 acides aminés et lie indifféremment les trois isoformes de l'ET. Ces deux récepteurs sont distribués en différentes proportions dans une grande variété de cellules et de tissus. Dans le lit vasculaire, le récepteur ET<sub>A</sub> est situé sur le muscle lisse où il cause la vasoconstriction et a des effets promitogènes. L'ET<sub>B</sub> est retrouvé au niveau

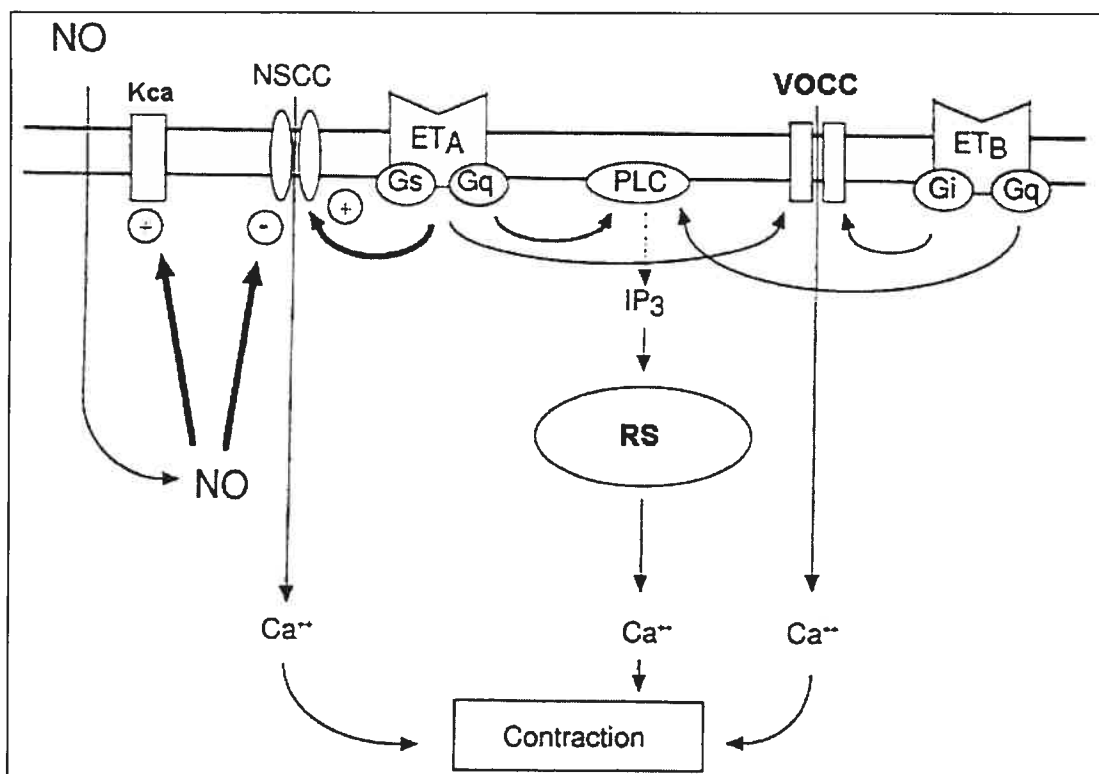
des cellules endothéliales où il favorise la vasorelaxation en permettant la relâche de NO et de PGI<sub>2</sub>. Certains facteurs peuvent affecter l'expression de ces récepteurs. Par exemple, l'insuline et le NO promeuvent l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> alors que les facteurs de croissances et les cytokines affectent positivement l'ET<sub>B</sub>.<sup>141;142</sup> Un récepteur ET<sub>C</sub> spécifique à l'ET-3 a aussi été cloné, mais il est seulement présent dans les mélanophores de la grenouille *Xenopus leavis*.<sup>143</sup> Jusqu'à maintenant, aucun récepteur homologue n'a été découvert dans les cellules de mammifères.

Afin d'élucider les mécanismes d'action de l'ET-1, l'utilisation d'antagonistes sélectifs et non-sélectifs des récepteurs à l'ET-1 s'est révélée un outil précieux. Au cours des dernières années, plusieurs d'entre eux ont été développés permettant des découvertes importantes et jouant un rôle essentiel dans le traitement de certaines pathologies. Par exemple, des études pharmacologiques ont confirmé l'existence de deux localisations pour les récepteurs ET<sub>B</sub> : sur les cellules endothéliales (ET<sub>B1</sub>) et sur les cellules musculaires lisses (ET<sub>B2</sub>).<sup>144</sup> Toutefois, leurs actions physiologiques sont contradictoires; sur l'endothélium, les récepteurs ET<sub>B</sub> permettent la libération de facteurs relaxants alors que sur le muscle lisse, ils sont responsables de la vasoconstriction. Les antagonistes des récepteurs à l'ET-1 seront discutés plus en détail dans une prochaine section.

#### 1.4.2.1 Voie de signalisation

La liaison de l'ET-1 à son récepteur ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> sur le muscle lisse stimule une protéine G qui active la phospholipase C (PLC) et augmente la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire.(Figure 5) La PLC activée hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en deux sous-produits : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le 1,2-diacylglycérol (DAG).

**Figure 5 : Mécanisme de la contraction induite par l'ET-1**



NSCC : canal non-sélectif pour cations; VOCC : canal  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendant; RS: réticulum sarcoplasmique. Tiré de « Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system » par Masaki, T. *et al.*<sup>145</sup>

L' $\text{IP}_3$  est responsable de l'augmentation initiale du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par la mobilisation des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ , le réticulum sarcoplasmique. Par contre, l'augmentation soutenue est produite par un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire par différents canaux ioniques. En effet, le DAG active une protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle directement ou indirectement les canaux  $\text{K}^+$ . Ceci provoque leur inhibition et une dépolarisation de la cellule activant par le fait même les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants de type L. De plus, les canaux non-sélectifs pour cations (NSCC) permettent aussi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>146</sup> L'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  peut également stimuler les canaux  $\text{Cl}^-$   $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant favorisant ainsi la dépolarisation cellulaire.<sup>145</sup> La PKC stimule aussi directement ou indirectement la croissance et la différenciation cellulaire des cellules endothéliales et musculaires lisses

ainsi que des fibroblastes en activant la voie de la MAP kinase qui stimule à son tour les proto-oncogènes c-Jun et c-Fos.<sup>147;148</sup> Ceci induit des changements structuraux tels que la déposition d'une matrice extracellulaire et la synthèse de collagène dans la paroi vasculaire. Ces effets sont généralement associés au récepteur ET<sub>A</sub>.

De surcroît, la liaison de l'ET-1 à son récepteur ET<sub>B</sub> sur la cellule endothéliale active une importante voie de signalisation intracellulaire qui module les effets nets de l'ET-1. Par une protéine G couplée au récepteur, la eNOS est stimulée et le NO formé diffuse vers le muscle lisse vasculaire où il active la GC<sub>S</sub>.<sup>119</sup> La synthèse de la PGI<sub>2</sub> est aussi activée. Celle-ci augmente les concentrations d'AMP<sub>C</sub> qui stimule une protéine kinase A (PKA) et provoque la phosphorylation de la pompe Ca<sup>2+</sup> interne. Par cette voie, ET-1 stimule elle-même une rétroaction négative sur ses effets constricteurs et mitogènes. De plus, la liaison ET-1/ET<sub>B</sub> affecte aussi négativement l'expression de l'ARNm de l'ECE-1 en modifiant sa transcription et/ou sa stabilité.<sup>149</sup>

#### 1.4.2.2 Clairance de l'endothéline-1

La clairance de l'ET-1 est particulièrement importante dans la circulation pulmonaire, mais on la retrouve aussi dans les reins et le foie. Il a été démontré que les antagonistes des récepteurs ET<sub>B</sub> réduisent l'élimination de l'ET-1 dans ce lit vasculaire établissant ainsi la responsabilité des ET<sub>B</sub> dans la régulation des niveaux plasmatiques d'ET-1.<sup>150;151</sup> Chez l'humain sain, l'endothélium pulmonaire élimine, lors d'un passage unique, près de 50 % de l'ET-1 contenue dans le sang veineux. Il libère aussi dans la circulation une quantité similaire de ce peptide; il n'y a pas ou alors un très faible gradient artério-veineux d'ET-1 dans le poumon.<sup>152</sup> Une étude a démontré que la déficience en récepteurs ET<sub>B</sub>, chez le rat transgénique,

prédispose au développement de l'hypertension pulmonaire (HTP) caractérisée par une diminution de la production de NO et une augmentation des niveaux d'ET-1 circulants.<sup>153</sup> De plus, l'expression de l'ARNm des ET<sub>B</sub> dans les poumons de rats avec HTP est diminuée.<sup>154</sup> L'internalisation du complexe ET-1/ET<sub>B</sub> a été suggérée comme mécanisme de régulation négative suite à une stimulation soutenue de ce récepteur. Après internalisation, le complexe serait séquestré à l'intérieur de lysosomes où l'environnement acide faciliterait sa dissociation.<sup>155</sup> L'ET-1 serait ainsi récupérée par les cellules endothéliales.<sup>156</sup> Néanmoins, le récepteur ET<sub>B</sub> pourrait aussi agir comme transporteur trans-endothélial et libérer l'ET-1 à la surface abluminale de l'endothélium mais cette hypothèse n'est toujours pas confirmée.

#### 1.4.3 Interaction monoxyde d'azote-endothéline-1

Tel qu'il a été mentionné dans les sections précédentes, en condition physiologique, le flot sanguin ainsi qu'une grande variété de substances régulent la production d'ET-1 et de NO. Lorsque les forces de cisaillements augmentent, l'expression de la eNOS est induite et les niveaux de GMP<sub>C</sub> augmentent. Celui-ci affecte négativement la production et l'activité de l'ET-1 et par conséquent les effets vasodilatateurs et antiproliférateurs du NO l'emportent sur les effets vasoconstricteurs et promitogéniques de l'ET-1. Lorsqu'il y a dysfonction endothéliale, par exemple dans l'HTP, cette balance homéostatique est perturbée et le tonus vasculaire est augmenté. Il a été démontré *in vivo* que l'administration de L-NMMA augmente significativement l'effet vasoconstricteur de l'ET-1.<sup>157</sup> Cet effet s'explique par une libération physiologique basale de NO endogène dont les effets vasodilatateurs l'emportent sur les réponses vasoconstrictrices de l'ET-1.<sup>158</sup> Effectivement, plusieurs études effectuées au niveau de la circulation brachiale, coronaire et pulmonaire démontrent l'importance de cette production de NO dans la régulation du flot sanguin chez l'humain.<sup>30;31;159</sup>



#### 1.4.4 Physiologie et pathologie du système endothéline-1

L'ET-1 est un peptide régulateur et un puissant vasoconstricteur à des concentrations beaucoup moins élevées que la quasi-totalité des autres substances cardiovasculaires. Ses rôles sont ambivalents; en situation physiologique, ils sont bénéfiques alors qu'une perturbation de son homéostasie peut avoir d'importantes conséquences pathologiques dans une très grande variété de tissus.

##### 1.4.4.1 Le développement

L'ET-1 joue un rôle *sine qua non* dans le développement foetal. Son interaction avec le récepteur ET<sub>A</sub> est essentielle dans le développement postmigratoire des cellules de la crête neurale cardiaque menant à la formation et au développement du coeur, de l'arc aortique ainsi que des structures artérielles.<sup>119</sup> De plus, elle joue aussi un rôle dans la croissance des cellules originaires de la crête neurale céphalique qui formeront les structures faciales. De même, l'interaction ET-3/ET<sub>B</sub> est indispensable à la stimulation des cellules de la crête neurale qui se divisent et se différencient rapidement en mélanocytes et en entéricytes.<sup>160</sup>

L'absence d'ET-1 et de récepteurs ET<sub>A</sub> produit des malformations craniales sévères qui affectent la respiration et des anomalies cardiaques souvent non viables.<sup>161</sup> Par contre, une carence en ET-3 et en récepteurs ET<sub>B</sub> empêche le développement fonctionnel du système intestinal (mégacolon aganglionnaire) en plus d'une pigmentation anormale due à une différenciation incorrecte des mélanocytes.

#### 1.4.4.2 Les vaisseaux sanguins

Conformément à ce qui a été mentionné précédemment, l'ET-1 est la seule isoforme présente au niveau vasculaire. Le ratio de ses deux récepteurs  $ET_A:ET_B$  varie selon le lit vasculaire, mais il est généralement plus faible au niveau des veines. Par contre, l'ET-1 provoque une vasoconstriction autant artérielle que veineuse.<sup>10</sup> L'administration d'un bolus intraveineux d'ET-1 génère un effet dépresseur transitoire puis un effet presseur soutenu. La diminution initiale de la résistance vasculaire est attribuée à la libération de NO et de  $PGI_2$  par les récepteurs  $ET_B$  au niveau des cellules endothéliales. Ceci a été confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de ces deux facteurs vasodilatateurs et par des antagonistes  $ET_B$  *in vivo* et *in vitro*.<sup>162;163</sup> Par la suite, l'effet presseur est rattaché au récepteur  $ET_A$  du muscle lisse vasculaire tel que démontré par l'usage d'antagonistes qui ont atténué cette réponse pressive.<sup>164</sup>

Le système ET joue un rôle majeur dans l'athérosclérose.<sup>165</sup> Celle-ci est une maladie inflammatoire de l'endothélium vasculaire caractérisée par une accumulation de lipides sur et à l'intérieur de la paroi artérielle. Des facteurs athérosclérotiques tels que la cigarette, le diabète et l'hyperlipidémie avivent ce système dans les vaisseaux sanguins. Dans cette pathologie, les cellules endothéliales et les macrophages libèrent de l'ET-1 qui stimule les récepteurs  $ET_A$  sur les macrophages, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. L'interaction ET-1/ $ET_A$  a des effets mitogéniques et prolifératifs sur les cellules du muscle lisse et les fibroblastes. De plus, elle stimule la synthèse de fibronectine dans le muscle lisse et de cytokines dans les macrophages.<sup>160</sup> La présence des récepteurs à l'ET-1 a aussi été confirmée dans les plaques athérosclérotiques. Tous ces facteurs contribuent à la progression de la lésion athérosclérotique par la formation d'une matrice extracellulaire, la déposition de collagène et la migration des cellules musculaires lisses.

### 1.4.4.3 Le muscle cardiaque

L'ET-1, l'endothéline prédominante au niveau cardiaque, est produite par les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes cardiaques.<sup>160</sup> Les deux types de récepteurs de l'ET-1 sont retrouvés sur les cardiomyocytes, les fibroblastes et les artères coronaires et les ET<sub>A</sub> représentent 90 % des récepteurs présents sur les myocytes.<sup>166</sup> Ce peptide vasoactif est un puissant constricteur des artères coronaires humaines, c'est un agent inotrope et chronotrope pour le muscle cardiaque et il a des effets sur la prolongation du potentiel d'action.<sup>10;167</sup>

Le système ET est impliqué dans la pathophysiologie de l'infarctus du myocarde et dans l'insuffisance cardiaque congestive. L'occlusion d'une artère coronaire génère un infarctus et les survivants ont un risque élevé de développer de l'insuffisance cardiaque.<sup>168</sup> Plusieurs observations indiquent que l'ET-1 a des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque et la réparation tissulaire quelques jours après l'infarctus. Toutefois, à long terme, ses effets sont délétères et une insuffisance cardiaque congestive se développe. L'ET-1 augmente la masse ventriculaire et stimule le remodelage cardiaque par ses effets promitogènes sur les cardiomyocytes et les fibroblastes. De fait, les patients ont des niveaux plasmatiques d'ET-1 et tissulaires d'ET-1 et d'ET<sub>A</sub> augmentés et ceux-ci reflètent la sévérité des dommages cardiaques et un faible pronostic de survie.<sup>169;170</sup> De plus, les niveaux plasmatiques d'ET-1 corrélaient fortement avec l'augmentation de la pression pulmonaire ainsi que la résistance vasculaire pulmonaire chez les patients qui développent une hypertension pulmonaire secondaire à l'insuffisance cardiaque congestive.<sup>171</sup>

Les antagonistes ET<sub>A</sub>, par exemple le BQ-123, sont bénéfiques dans ces pathologies. En effet, leur administration dans un modèle canin durant 90 minutes à la suite d'une occlusion coronaire a diminué la taille de l'infarctus de 40 %.<sup>172</sup> L'inhibition des effets toxiques de l'ET-1 sur les cardiomyocytes

et la prévention de l'ischémie cardiaque par la dilatation des vaisseaux collatéraux sont les principaux objectifs des antagonistes ET<sub>A</sub>. En effet, ceux-ci démontrent d'importants effets bénéfiques quant à une diminution de la résistance systémique et pulmonaire ainsi qu'une augmentation de l'éjection cardiaque.<sup>173</sup> Il a également été démontré avec certitude que les antagonistes des récepteurs ET<sub>A</sub> améliorent le taux de survie des rats avec insuffisance cardiaque chronique.<sup>174;175</sup> Quoique les antagonistes ET<sub>A</sub> améliorent nettement la condition clinique des personnes avec insuffisances cardiaques, plusieurs petites études cliniques dont les résultats ne sont pas connus, s'intéressent présentement à leurs effets à long terme sur la survie des patients.

Chez les patients hypertendus avec insuffisance rénale ou maladie vasculaire, on retrouve des niveaux plasmatiques d'ET-1 dépassant 10 fois la normale.<sup>131</sup> Ceci suggère une diminution de la clairance de l'ET-1 et/ou une augmentation de sa production. Comme mentionné plus tôt, ce peptide participe à l'hypertrophie vasculaire et cardiaque associée à l'hypertension. Il est de surcroît impliqué par ses effets rénaux et endocriniens. En effet, l'ET-1 stimule l'activité sympathique, le système rénine-AngII-aldostérone et la synthèse d'adrénaline ce qui contribue à maintenir la pression artérielle et la résistance vasculaire élevées.<sup>176;177</sup>

#### 1.4.4.4 Le système rénal

Le système endothéline est intimement lié à la physiologie rénale. Quoique l'ET-1 soit un puissant vasoconstricteur de tous les lits vasculaires, un groupe de recherche a constaté que la circulation rénale est 10 fois plus sensible à ce peptide que les autres lits vasculaires.<sup>178</sup> L'ET-1 est synthétisée par les cellules endothéliales des vaisseaux rénaux et par les différentes cellules qui composent le néphron. Les deux types de récepteurs sont

présents, mais l'ET<sub>B</sub> est prédominant.<sup>179</sup> Le système ET contrôle le flot sanguin rénal, la réabsorption de l'eau et du sodium (Na<sup>+</sup>) ainsi que la balance acide-base. Ainsi, il est grandement impliqué dans l'homéostasie volumique.<sup>180</sup> Ses effets ont été démontrés par l'administration d'ET-1 dans les artères rénales chez le lapin anesthésié.<sup>181</sup> Le traitement a réduit le débit sanguin rénal, le taux de filtration glomérulaire, le flot urinaire et l'excrétion de Na<sup>+</sup>. Certaines évidences scientifiques suggèrent également que les récepteurs ET<sub>B</sub> présents dans les reins, régulent la pression sanguine

L'ET-1 a un rôle actif dans le développement et la progression de l'insuffisance rénale, car la sévérité de cette pathologie corrèle avec ses niveaux rénaux.<sup>182;183</sup> Elle est responsable des changements structuraux du parenchyme rénal impliquant l'hypertrophie, la prolifération cellulaire et la déposition de collagène. De surcroît, elle diminue la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire nette, deux indices de la fonction rénale.<sup>184</sup> À vrai dire, il y a plusieurs évidences d'un système ET intra-rénal qui contrôle l'homéostasie ionique des fluides corporels ainsi que la pression sanguine.<sup>185</sup>

#### 1.4.4.5 Le foie

L'endothéline est un puissant vasoconstricteur du lit vasculaire hépatique et elle augmente la glycolyse c'est-à-dire l'éjection hépatique du glucose.<sup>186</sup> De ce fait, l'insuline est augmentée afin de contrer la hausse de glucose dans le sang. Cependant, elle stimule aussi l'expression du gène de l'ET-1 et la libération de celle-ci par les cellules endothéliales favorisant ainsi une élévation de ces niveaux plasmatiques chez l'homme.<sup>187-189</sup> De plus, en présence d'une résistance à l'insuline, l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> sur les cellules musculaires lisses est augmentée et ceux-ci ont une sensibilité accrue à l'ET-1.<sup>190;191</sup> Par conséquent, cette boucle entre insuline

et l'ET-1 se conclut par une rétroaction positive entre ces deux substances et par des niveaux plasmatiques de glucose et d'ET-1 augmentés.

La cirrhose est aussi une pathologie où les niveaux d'ET-1 sont à la hausse.<sup>192</sup> L'ET-1 a un rôle très clair dans la vasoconstriction rénale associée au syndrome hépatorénal. Celui-ci est une complication commune et fréquente de la cirrhose caractérisée par une diminution de la fonction rénale, une perturbation de la circulation artérielle et une activation des systèmes vasoactifs.<sup>193</sup> L'ET-1 diminue la filtration glomérulaire et favorise la rétention sodique et hydrique. En effet, les patients cirrhotiques développent des ascites qui sont des accumulations de fluides qui peuvent atteindre quelques litres, dans la cavité péritonéale. De plus, la synthèse d'ET-1 par les cellules stellaires situées à l'intérieur du foie, contribue à augmenter la résistance vasculaire intra-hépatique. L'accumulation de collagène provenant de l'activation des fibroblastes par l'ET-1, s'accompagne d'une perte de fenestrations des cellules endothéliales sinusoidale. Ceci empêche les échanges entre les hépatocytes et le plasma et favorise la dysfonction hépatique.

#### 1.4.4.6 Le cerveau

La présence, au niveau des cellules vasculaires, neuronales et gliales, de l'ET-1 et de l'ET-3 ainsi que des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  suggère que ceux-ci jouent un rôle important dans le contrôle des actions neuronales. L'ET-1 est la principale endothéline retrouvée dans le cerveau à l'exception de la glande pituitaire où l'ET-3 est majoritaire.<sup>194</sup> Une injection intraventriculaire d'ET-1 produit une augmentation transitoire de plusieurs minutes, de la fréquence cardiaque et respiratoire, de la pression artérielle et de l'activité sympathique rénale.<sup>195</sup> Suite à ce changement transitoire, des doses élevées d'ET-1 causent une dépression à long terme de ces paramètres. De plus, les


ETs contrôlent la libération de neurotransmetteurs, par exemple les catécholamines, elles sont impliquées dans la modulation du comportement et du métabolisme et elles influencent le système sympathique.<sup>160</sup>

Le rôle de l'ET-1 dans le vasospasme cérébral à la suite d'une hémorragie subarachnoïdienne est connu ainsi que dans les détériorations neurologiques subséquentes. Ses niveaux plasmatiques sont élevés dans le liquide cébrospinal des patients atteints.<sup>196</sup> Elle est libérée en réponse à l'inflammation et à l'ischémie et provoque une vasoconstriction massive des vaisseaux cérébraux.

#### 1.4.4.7 Le système respiratoire

Dans le poumon, l'ET-1 est exprimée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses des voies respiratoires, les cellules neuroendocrines pulmonaires et par les macrophages. Les isoformes ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c sont présentes et très abondantes dans le poumon comparativement aux autres tissus humains.<sup>115</sup> L'expression de l'ET-1 dans les voies respiratoires est régulée par les médiateurs de l'inflammation. L'ET-1 influence le tonus basal des muscles lisses trachéaux et bronchiques.<sup>197</sup> Les deux types de récepteurs à l'ET-1 sont exprimés au niveau pulmonaire toutefois, les ET<sub>B</sub> représentent la majorité des récepteurs au niveau du muscle lisse bronchique et sont responsables de la bronchoconstriction.<sup>198</sup>

L'ET-1 est impliquée dans les diverses formes de l'hypertension pulmonaire ainsi que dans l'inflammation chronique des voies respiratoires; l'asthme. Cette pathologie est caractérisée par une vasoconstriction, une hyperactivité du muscle bronchique à l'ET-1, un influx de cellules inflammatoires, une sécrétion de mucus et un remodelage des voies respiratoires. Chez les patients asthmatiques, les niveaux d'ET-1 dans le




fluide broncho-alvéolaire sont très élevés et sont responsables des effets ci-haut mentionnés.<sup>199</sup> L'ET-1 stimule la croissance des fibroblastes pulmonaires et la sécrétion de collagène par ceux-ci dans les voies respiratoires des personnes souffrant d'asthme.<sup>200</sup>

Essentiellement, le poumon est un organe cible du système ET. La circulation pulmonaire est un lit vasculaire clé pour le métabolisme de l'ET-1 circulante. Par conséquent, toutes les conditions qui affectent la circulation pulmonaire et modulent les niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1, créent une dysfonction endothéliale pulmonaire. Puisque mon mémoire porte sur la réactivité des petites artères pulmonaire, la prochaine section sera consacrée à ce lit vasculaire ainsi qu'à l'hypertension pulmonaire une pathologie fortement inhérente aux niveaux plasmatiques d'ET-1.



## 1.5 La circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire est en étroit contact avec l'air alvéolaire dont elle est séparée par une fine membrane de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. C'est une circulation de faible résistance mais à grande compliance qui accomode la totalité du débit sanguin éjecté par le ventricule droit du muscle cardiaque. Dans un poumon humain normal, le volume sanguin pulmonaire est généralement d'environ 450 ml c'est-à-dire 9 % à 12 % du volume sanguin total. Le débit sanguin est pulsatile dans tout ce lit vasculaire mais son amplitude diminue dans les capillaires puis dans les veines. La pression systolique normale de l'artère pulmonaire (PAP) est d'environ 25 mmHg soit la même valeur que la pression systolique du ventricule droit. La PAP moyenne varie entre 10 et 17 mmHg et augmente avec l'âge.



Fonctionnellement et structurellement, la circulation pulmonaire comporte deux parties : la macrocirculation artérielle et veineuse et la



microcirculation capillaire. Cette dernière est très adaptative, le recrutement et la distensibilité des capillaires sont les mécanismes prédominants pour répondre à une élévation du débit sanguin et prévenir l'oedème pulmonaire. De plus, les capillaires pulmonaires sont plus distensibles que ceux de la circulation systémique. Le tonus basal pulmonaire physiologique est faible et est régulé par l'ET-1 et le NO.<sup>201;202</sup> Il a été démontré que les récepteurs ET<sub>B</sub> joue un rôle mineur dans la régulation du tonus vasculaire de base en absence d'HTP.<sup>203</sup>

### 1.5.1 Réactivité des artères pulmonaires

Dans le poumon normal, l'ET-1 cause une vasoconstriction principalement par l'activation des récepteurs ET<sub>A</sub> dans les artères pulmonaires de conductance. En effet, il y a prédominance de ceux-ci dans l'artère pulmonaire principale.<sup>204</sup> Toutefois, dans les artères de résistance murines et humaines, il a été démontré que les récepteurs ET<sub>B</sub> sont aussi responsables de cette même vasoconstriction.<sup>158;205</sup> De plus, il a été établi que ces petites artères pulmonaires sont les déterminants majeurs de la résistance vasculaire pulmonaire, de la vasoconstriction hypoxique et de l'hypertension pulmonaire *in vivo*.<sup>206</sup> Par conséquent, il est important de noter que la réactivité vasculaire au niveau pulmonaire varie beaucoup selon la grosseur des artères étudiées. Les études de Leach en 1989 sont les premières à mettre ce fait en évidence.<sup>207</sup> Il a démontré que les artères ayant un diamètre interne de 200 à 400  $\mu\text{m}$  développent une force plus importante en réponse à une dépolarisation potassique que les autres types d'artères; 100-200  $\mu\text{m}$  et 400-2000  $\mu\text{m}$ . Ce fait expliquerait leur responsabilité dans la génération de la résistance vasculaire pulmonaire.

En outre, ce même chercheur a révélé de nombreuses et importantes différences dans les réponses des petites (100-300  $\mu\text{m}$ ) et grandes (1-2 mm)

artères pulmonaires à plusieurs agents pharmacologiques.<sup>208</sup> Une autre équipe de recherche a aussi confirmé ces données en démontrant des différences régionales marquées dans la réactivité des segments artériels et veineux de la circulation pulmonaire du mouton à des agonistes vasodilatateurs et vasoconstricteurs.<sup>209</sup> Pour ces raisons, il peut être aberrant d'extrapoler des données recueillies à partir de préparations d'artères pulmonaires de grand diamètre ou de poumons perfusés qui représentent l'ensemble de la vascularisation pulmonaire à de petites artères de résistance.

### 1.5.2 Vasoconstriction pulmonaire hypoxique

Ce phénomène, décrit en 1946, a été rapporté il y a plus de 100 ans.<sup>210</sup> Contrairement à la circulation systémique, la résistance pulmonaire augmente jusqu'à cinq fois sa valeur normale lorsque les niveaux d'oxygène diminuent. Cette vasoconstriction unique à la circulation des poumons a pour but de détourner le débit sanguin pulmonaire vers les alvéoles les mieux oxygénées et ainsi maintenir une balance optimale entre la ventilation et la perfusion. L'hypoxie survient à la suite de nombreuses pathologies respiratoires telles que la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'asthme, l'emphysème ou la pneumonie. La vasoconstriction pulmonaire hypoxique (HPV) est le résultat d'une augmentation de la résistance pulmonaire en réponse à l'hypoxie.<sup>211</sup> Toutefois, le mécanisme précis sous-jacent à cette vasoconstriction demeure vague.

En réalité, des études de *patch clamp* avec des cellules du muscle lisse pulmonaire ont démontré que l'hypoxie inhibe les courants  $K^+$  sortants et par le fait même génère une dépolarisation qui favorise l'activation des canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants.<sup>212;213</sup> Les canaux  $K^+$  inhibés sont voltage-dépendants et sensibles à la 4-aminopyridine (4-AP).<sup>214</sup> Toutefois, la

localisation des canaux  $K^+$  (artères de résistance vs artères de conductance) influence fortement la modulation de l'HPV selon certaines évidences scientifiques.<sup>215</sup> Une étude récente a démontré la participation de l'ET-1 à l'HPV par sa liaison à son récepteur  $ET_A$  qui supprime l'activité des canaux  $K^+$  ATP-dépendants.<sup>216</sup> De plus, en présence d'hypoxie chronique un remodelage vasculaire est présent en réponse à l'augmentation de la pression sanguine ainsi qu'à ses effets directs sur plusieurs gènes : ET, facteurs de croissance, protéines matricielles.<sup>217</sup>

La très grande majorité des chercheurs acceptent les artères pulmonaires précapillaires comme étant le lieu déterminant de la vasoconstriction hypoxique et celles-ci démontrent une réponse biphasique à l'hypoxie.<sup>211;218</sup> La première phase est constituée d'une augmentation rapide et transitoire (5 à 10 min) du tonus vasculaire puis d'une diminution qui n'atteint généralement pas le tonus basal. L'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire par la libération des réserves intracellulaires et l'activation des canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants est responsable de cette étape initiale.<sup>219</sup> Puis, la seconde phase est caractérisée par une augmentation lente et soutenue du tonus qui atteint un plateau après environ 40 minutes. Notons que cette deuxième partie est sensible à un dénuement endothélial.<sup>220</sup> Ceci suggère la présence d'un médiateur, dérivé de l'endothélium, responsable de cette seconde phase. Toutefois, son identité est toujours inconnue, de même que son mécanisme d'action.


### 1.5.3 Hypertension pulmonaire

On qualifie l'HTP selon l'importance de l'élévation de la PAP moyenne : HTP légère pour une PAP moyenne entre 20 et 30 mmHg, moyenne entre 30 et 50 mmHg, et sévère lorsqu'au-dessus de 50 mmHg. L'HTP est caractérisée par une augmentation du tonus vasculaire

pulmonaire, de la vasoréactivité et de la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire pulmonaire. Ceci résulte en une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) qui conduit progressivement à une hypertrophie ventriculaire droite.<sup>221</sup> En effet, si l'HTP se développe de façon lente et progressive, le ventricule droit peut démontrer une hypertrophie compensatrice. Toutefois, ce mécanisme compensatoire est limité et si l'HTP se prolonge et progresse, une insuffisance ventriculaire droite résultera.


D'autre part, plusieurs anomalies vasculaires résultent de l'HTP.<sup>222</sup> Il y a une prolifération des cellules endothéliales et celles-ci expriment des niveaux élevés de récepteurs au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et à l'ET-1. Dans les artères musculaires et élastiques, les cellules musculaires lisses sont hypertrophiées, le tissu conjonctif est augmenté et la matrice extracellulaire est altérée. Le remodelage pulmonaire est également caractérisé par un épaississement de la couche intimale des petites artères dû à la migration et à la prolifération des cellules du muscle lisse. De plus, l'HTP soutenue favorise l'augmentation des couches élastiques des petites artérioles (15  $\mu\text{m}$ ) qui normalement n'en ont qu'une seule. Morphologiquement, on assiste à la formation de lésions plexiformes c'est-à-dire aux proliférations concentriques de cellules endothéliales et musculaires. Par conséquent, l'endothélium pulmonaire est altéré, histologiquement modifié, et la balance homéostasique physiologique entre les substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices est perturbée.

En effet, l'endothélium pulmonaire possède une activité métabolique fondamentale pour plusieurs substances vasoactives et cytokines présentes dans le sang. L'altération de cette activité dans l'HTP contribue à la vasoconstriction et à la prolifération cellulaire qui caractérise cette pathologie. L'HTP est, entre autres, associée à une augmentation des niveaux plasmatiques d'ET-1 et ceux-ci corréleront étroitement avec la sévérité de cette maladie.<sup>223;224</sup> En 1993, une importante étude clinique a démontré




l'augmentation des niveaux d'ARNm et de l'expression immunoréactive de l'ET-1 dans les poumons de patients souffrant d'HTP.<sup>225</sup> De plus, la diminution de l'expression de la NO et de la PGI<sub>2</sub> synthétases, l'augmentation des cytokines, des niveaux plasmatiques de sérotonine et de la synthèse des protéines matricielles de même que l'altération des propriétés antithrombotiques de l'endothélium sont aussi des marqueurs de cette pathologie qui contribuent à sa progression.<sup>226</sup>

### 1.5.3.1 Classification



Plusieurs formes d'HTP existent et par conséquent sa classification a été révisée et modifiée en 1998 par la *World Health Organization* (WHO). Celle-ci est axée sur l'étiologie de la pathologie ; c'est à dire l'HTP artérielle, l'HTP veineuse, l'HTP associée à des désordres du système respiratoire, à des maladies veino-occlusives ou à des pathologies affectant directement l'endothélium vasculaire pulmonaire.(Tableau I)



L'HTP de type artériel se divise en deux catégories. Premièrement, l'hypertension pulmonaire primaire (HPP) ou idiopathique est une pathologie rare, de cause inconnue, diagnostiquée tardivement et elle est malheureusement souvent fatale. La HPP est une maladie retrouvée chez les adultes d'âge moyen (20-40 ans) et elle affecte plus souvent et plus sévèrement les femmes.<sup>227</sup> Il n'existe pas de lésions vasculaires pathologiques spécifiques à l'HPP, celles-ci varient beaucoup d'un patient à l'autre. Elles comprennent, entre autres, une hypertrophie des muscles lisses, une hyperplasie intimale qui peut obstruer partiellement ou complètement la lumière des vaisseaux et la thrombose *in situ*. De plus, des lésions plus complexes peuvent se former comme l'artérite et les lésions plexogéniques causant un remodelage irréversible à la paroi des vaisseaux pulmonaires. La

## Tableau I : Classification diagnostique de l'HTP

### 1. Hypertension pulmonaire artérielle

---

- 1.1 Hypertension pulmonaire primaire
  - (a) sporadique
  - (b) familiale
- 1.2 Associée à :
  - (a) Maladie vasculaire du collagène
  - (b) Fistules artério-veineuses congénitales
  - (c) Hypertension portale
  - (d) Infection au VIH
  - (e) Drogues/toxines (anorexigènes)
  - (f) Hypertension pulmonaire persistante chez le nouveau-né
  - (g) Autres

### 2. Hypertension pulmonaire veineuse

---

- 2.1 Maladie de l'oreillette ou du ventricule gauche
- 2.2 Maladie des valvules cardiaques gauches
- 2.3 Compression extrinsèque des veines pulmonaires
- 2.4 Maladie pulmonaire veino-occlusive
- 2.5 Autres

### 3. Hypertension pulmonaire associée à des désordres du système respiratoire et/ou à l'hypoxémie

---

- 3.1 Maladie pulmonaire obstructive chronique
- 3.2 Maladie interstitielle des poumons
- 3.3 Apnée du sommeil
- 3.4 Désordres d'hypoventilation alvéolaire
- 3.5 Exposition chronique à la haute altitude
- 3.6 Maladie du poumon néo-natal
- 3.7 Dysplasie alvéolo-capillaire
- 3.8 Autres

### 4. Hypertension pulmonaire associée à des maladies thrombotiques chroniques et/ou emboliques

---

- 4.1 Obstruction thrombo-embolique des artères proximales pulmonaires
- 4.2 Obstruction des artères pulmonaires distales
  - (a) Embolie pulmonaire
  - (b) Thrombose *in situ*
  - (c) Hématies falciformes

### 5. Hypertension pulmonaire suite à des désordres affectant directement l'endothélium vasculaire pulmonaire

---

- 5.1 Inflammation
- 5.2 Hémangiomatose pulmonaire

---

Tiré et traduit à partir du sommaire exécutif de la WHO en 1998.<sup>222</sup>

production d'ET-1 dans les poumons de patients avec HPP est accentuée de même que ses concentrations plasmatiques.<sup>225;228</sup> Il existe une forme familiale d'HPP qui représente environ 6 % des cas. Cette condition est transmise verticalement, possiblement par un gène autosomal dominant avec une pénétrance incomplète et peut affecter jusqu'à cinq générations consécutives.<sup>229</sup> Ce gène a été localisé sur le chromosome 2 et il code pour le récepteur 2 de la protéine morphogénétique osseuse (BMP2).<sup>230;231</sup> Toutefois, l'HPP primaire a un aspect multifactoriel important et les patients ayant des antécédents familiaux ne développeront pas nécessairement la pathologie et si oui, les lésions et la sévérité de celle-ci seront hétérogènes. En plus du mode de transmission familial, une forme sporadique est aussi connue et celle-ci est cliniquement indistincte de la forme familiale.

Deuxièmement, l'HPP peut être associée à plusieurs maladies vasculaires du collagène (la sclérodermie, l'arthrite rhumatoïde), à des fistules artério-veineuses congénitales, à l'hypertension portale, à l'infection au VIH, à la consommation de drogues et à l'HPP persistante chez le nouveau-né. En outre, l'utilisation de substances anorexigènes contenant de la fenfluramine ou de la dexfenfluramine, par exemple Redox<sup>MC</sup> et Aminorex<sup>MC</sup>, augmente de façon significative les risques de développer une HPP.<sup>232</sup> Notons que de nombreuses études expérimentales et cliniques supportent le rôle de l'ET-1 dans ces pathologies dont le développement de l'HPP est une complication majeure et l'étape critique quant au pronostic de survie.

L'HPP de type veineux est surtout combinée à des pathologies qui affectent les veines pulmonaires ou alors le côté gauche du muscle cardiaque. Par exemple, les troubles de l'oreillette ou du ventricule gauche, les valvulopathies mitrales ou aortiques, les maladies pulmonaires veino-occlusives ou bien la compression des veines pulmonaires causent un engorgement sanguin au niveau de la circulation pulmonaire postcapillaire

qui se traduit par une augmentation de la PAP et de la RVP. Rapidement à la suite d'un infarctus du myocarde, les concentrations plasmatiques d'ET-1 augmentent, stimulées par la congestion pulmonaire résultant de la dysfonction ventriculaire gauche.<sup>223;233</sup> De plus, une étude récente révèle une hausse de l'activité enzymatique de l'ECE-1a dans l'insuffisance cardiaque congestive corroborant l'hypothèse que cette isoforme est induite en conditions pathologiques.<sup>234;235</sup>

Le troisième type d'HTP, selon la WHO, est celui associé à des désordres du système respiratoire et/ou à l'hypoxémie. On y retrouve la maladie pulmonaire obstructive chronique, la maladie interstitielle des poumons, l'apnée du sommeil, les désordres d'hypoventilation alvéolaire, l'exposition chronique à la haute altitude, la maladie du poumon néonatal et la dysplasie alvéolo-capillaire. Ces pathologies engendrent l'HTP par la vasoconstriction hypoxique en plus du remodelage vasculaire pulmonaire conformément à ce qui a été présenté dans une section antérieure. De plus, comme pour les deux précédents types d'HTP, les niveaux plasmatiques de l'ET-1 sont élevés, et celle-ci joue un rôle dans les effets aigus de l'hypoxie sur la circulation pulmonaire.<sup>236;237</sup>

L'HTP peut aussi être associée à des maladies thrombotiques chroniques et/ou emboliques. En effet, les pathologies thrombo-emboliques causent l'HTP par l'obstruction d'un vaisseau sanguin pulmonaire proximal ou distal. Dans le premier cas, une embolie pulmonaire au niveau des artères proximales compromet sévèrement le lit vasculaire pulmonaire. Il existe peu de données quant au rôle de l'ET-1 dans ce désordre chez l'humain. Par contre dans un modèle animal, les réponses contractiles des artères intrapulmonaires à l'ET-1 et à l'ET-3 soient significativement augmentées.<sup>238</sup> L'obstruction distale de la circulation pulmonaire est un syndrome rare et qui est cliniquement non expliqué.



Et finalement, l'HTP peut être causée par des pathologies qui affectent directement l'endothélium vasculaire pulmonaire telles que de l'inflammation ou une hémangiomatose capillaire pulmonaire. Il est à noter que l'ET-1 est un médiateur clé de l'inflammation par son habilité à stimuler les molécules inflammatoires, la prolifération du muscle lisse et des fibroblastes, à activer différentes cytokines et la libération de facteurs de croissance et à modifier l'expression de certains gènes.<sup>239</sup>

### 1.5.3.2 Modèles animaux

**Monocrotaline** Plusieurs modèles animaux ont, au cours des années, été développés afin de reproduire l'HTP le plus fidèlement possible pour mieux l'étudier et la comprendre. Chez les rats où l'hypertension pulmonaire a été causée par un traitement à la monocrotaline, les niveaux plasmatiques d'ET-1 augmentent progressivement durant le développement de la pathologie.<sup>240</sup> En effet, l'équipe du Dr McIntyre a démontré une dysfonction importante du tonus vasculaire pulmonaire lors d'une atteinte pulmonaire progressive induite par cette drogue.<sup>241</sup> La monocrotaline est un alcaloïde pyrrolizidine qui est converti dans le foie par l'action de plusieurs oxydases, en déhydro-monocrotaline. Ce composé cause une destruction de l'endothélium vasculaire pulmonaire suivi du développement graduel et rapide de l'HTP en deux semaines.<sup>242</sup> Le modèle diffère cependant de l'HTP primaire par l'absence de proliférations intimes. Cependant, il rappelle l'HTP artérielle qui apparaît chez certains patients adultes atteints du syndrome de détresse respiratoire. Ce modèle est largement utilisé puisqu'il permet l'obtention d'une HTP très reproductible.

**HTP secondaire à l'infarctus** Le modèle du rat avec infarctus du myocarde, créé par la ligature de l'artère interventriculaire antérieure après thoracotomie, est très utilisé. On peut ainsi reproduire une insuffisance

ventriculaire gauche, une pathologie qui est la cause la plus fréquente d'HTP veineuse. Une étude récente révèle que le lit vasculaire pulmonaire est la cible primaire des altérations circulatoires, augmentation de la PAP et de la RVP, à la suite d'un infarctus du myocarde.<sup>243</sup> En effet, l'étude a comparé les changements observés dans les artères pulmonaires et l'aorte thoracique du rat avec insuffisance cardiaque compensée. La circulation pulmonaire démontre d'importantes modifications de son hémodynamie, de sa structure et de sa fonction endothéliale alors que celles-ci sont préservées dans l'aorte thoracique.

L'utilisation du modèle infarctus a aussi permis de démontrer que les effets bénéfiques de l'ET-1 suite à l'infarctus du myocarde, sont de courtes durées. Il a été établi que la stimulation du système ET dans le myocarde infarcté de rat contribue à l'établissement et à la progression d'une insuffisance cardiaque.<sup>166</sup> Toutefois, une seconde étude a démontré que l'utilisation précoce, 24 heures après la chirurgie, d'antagonistes ET<sub>A</sub> gêne la cicatrisation et favorise la dilatation du ventricule gauche ainsi que sa dysfonction.<sup>244</sup> Par conséquent, l'instauration d'une thérapie contre l'ET-1, suite à l'établissement de la cicatrice, 7 à 10 jours, présente une stratégie prometteuse dans le traitement de l'HTP et de l'insuffisance ventriculaire gauche.<sup>166</sup>

**Hypoxémie** Plusieurs expériences voulant reproduire l'HTP hypoxique chronique utilisent des rats qui sont exposés à une atmosphère ayant 10 % d'oxygène (au lieu de 21 %) de deux à quatre semaines.<sup>245</sup> Ce modèle comporte plusieurs avantages; il est direct, efficace et très reproductible. Le type d'HTP créé est réversible en condition atmosphérique normale avec normalisation des modifications de l'hémodynamie pulmonaire. L'ET-1 est augmentée dans le plasma et les tissus pulmonaires des rats exposés.<sup>246</sup> Elle est aussi associée au remodelage vasculaire dans les poumons par ses effets mitogéniques sur les cellules musculaires lisses.<sup>247</sup> De même, l'hypoxie

chronique accentue la réactivité vasculaire des petites artères pulmonaires à l'ET-1 par ses récepteurs ET<sub>A</sub>.<sup>237;248</sup>

#### 1.5.4 Traitements de l'hypertension pulmonaire

Depuis environ 15 ans, la progression de la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-adjacents à l'HTP a permis le développement de nouvelles thérapies. Auparavant, le traitement principal de l'HTP consistait en l'administration de diurétiques et de glycosides cardiotoniques ainsi que d'un supplément d'oxygène. Quoique ce traitement demeure valable pour l'HTP subséquente à la maladie pulmonaire obstructive chronique, plusieurs stratégies thérapeutiques sont maintenant disponibles. La diminution de RVP suite à la vasodilatation artérielle pulmonaire et à la restauration de l'homéostasie vasculaire, est la réponse anticipée à l'utilisation de ces différentes approches qui comprennent : les anticoagulants, les bloqueurs des canaux Ca<sup>2+</sup>, l'inhalation de NO, les analogues de la PGI<sub>2</sub>, les inhibiteurs d'ECE, les antagonistes des récepteurs à l'ET-1 et finalement la transplantation pulmonaire.

##### 1.5.4.1 Les anticoagulants

Une thérapie impliquant des anticoagulants tels que la Warfarine s'avère favorable pour les patients qui souffrent d'HTP sévère. En effet, ceux-ci font peu d'activités physiques et par conséquent, ils sont à risque de développer des thromboses veineuses qui peuvent éventuellement dégénérer en embolie pulmonaire.<sup>249</sup> De plus, la diminution du flot sanguin pulmonaire augmente également le risque de développer des microthromboses dans ce lit vasculaire. L'héparine peut aussi être un choix

judicieux puisqu'en plus d'avoir des propriétés anticoagulantes, elle inhibe la prolifération du muscle lisse, mais ce dernier point reste à être confirmé.<sup>227</sup>

#### 1.5.4.2 Les bloqueurs des canaux calciques

En 1987, une équipe de recherche a démontré que les bloqueurs des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ , particulièrement les composés dihydropyridinés, ont des effets bénéfiques sur l'hémodynamie et la fonction ventriculaire droite des patients avec HPP.<sup>250</sup> Ces bloqueurs empêchent l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux voltage-dépendants de type L dans les cellules du muscle lisse et facilitent ainsi la vasodilatation. De plus, une action inhibitrice sur l'expression de l'ET-1 a aussi été notée.<sup>251</sup> Toutefois, quelques facteurs limitent leur utilisation. Premièrement, les effets hémodynamiques significatifs ne sont présents que chez 30 % des patients étudiés.<sup>252</sup> Deuxièmement, de grandes doses sont nécessaires pour diminuer la RVP et malheureusement celles-ci sont souvent associées à des effets systémiques tels qu'une diminution de la contractilité du myocarde, une hypotension et des arythmies.<sup>253</sup>

#### 1.5.4.3 Inhalation de monoxyde d'azote

L'administration de NO par inhalation s'avère une approche thérapeutique efficace pour diminuer la RVP. Tel que mentionné précédemment, le NO augmente les concentrations de GMPc, provoque une vasodilatation, inhibe l'agrégation plaquettaire et empêche la prolifération du muscle lisse vasculaire. Il est rapidement métabolisé dans la circulation pulmonaire par sa liaison à l'hémoglobine circulante et par conséquent ne provoque pas d'hypotension systémique.<sup>254</sup> Une équipe de recherche a démontré que 37 % des patients souffrants d'HPP ont eu une réponse hémodynamique significative à une thérapie au NO; c'est-à-dire une

diminution de plus de 25 % de la RVP.<sup>255</sup> Il est à noter que la demi-vie du NO est de courte durée et qu'une inhalation continue est nécessaire pour un effet de longue durée. De plus, la mobilité des patients est réduite durant les soins puisque cette thérapie demande un système relativement spécialisé et encombrant.

Mentionnons en outre que le Sildenafil (Viagra<sup>MC</sup>), un inhibiteur bien toléré de la phosphodiesterase de type V, abolit la vasoconstriction pulmonaire hypoxique chez les humains lorsqu'administré oralement.<sup>256</sup> De grandes concentrations de cette enzyme de type V sont présentes dans le système vasculaire pulmonaire. Elle métabolise le GMP<sub>C</sub> et par conséquent empêche les effets vasodilatateurs générés par celui-ci.<sup>229</sup> Quoique toujours à l'étude, le Sildenafil a démontré son efficacité en combinaison avec le NO et les analogues de la PGI<sub>2</sub> afin de prévenir les discontinuités attribuables au phénomène de « rebound » dans le traitement. De plus, il est relativement sélectif pour le système vasculaire pulmonaire et ses effets sont stables à long terme.<sup>257</sup>

#### 1.5.4.4 Les analogues de la prostacycline

Étant donné les effets hypotenseurs systémiques prépondérants des approches thérapeutiques discutées jusqu'ici, le développement d'un agent vasodilatateur spécifique à la circulation pulmonaire est souhaitable. L'époprosténol (Flolan<sup>MC</sup>), une forme synthétique de la PGI<sub>2</sub>, a des effets vasodilatateurs plus spécifiques au lit vasculaire pulmonaire tel que démontré dans les années 80, par Rubin et Higenbottam.<sup>258;259</sup> Plusieurs études attestent des effets bénéfiques de l'infusion intraveineuse continue d'époprosténol quant à l'amélioration des symptômes, de l'hémodynamie et de la survie des patients.<sup>260</sup> Chez les patients avec HPP, l'administration de PGI<sub>2</sub> peut arrêter la progression de la maladie et parfois même induire la

régression des dommages structuraux vasculaires.<sup>261</sup> De plus, ce puissant vasodilatateur diminue l'agrégation et la migration plaquettaire.<sup>262</sup> Par contre, bien que l'époprosténol soit très efficace, il est mal toléré. Plusieurs effets secondaires sont connus : des nausées, la diarrhée, des migraines, des éruptions cutanées et à plus long terme : des ascites, l'impuissance, de la photosensibilité et des douleurs musculo-squelettiques.<sup>227</sup> De plus, une infusion continue peut occasionner des infections au lieu d'implantation du cathéter intraveineux, son coût est extrêmement élevé et pour une raison inconnue, les patients développent une tolérance à leur médication. Néanmoins, malgré tous ces inconvénients, la PGI<sub>2</sub> demeure actuellement le traitement le plus efficace pour diminuer la mortalité et améliorer la qualité de vie des patients souffrant d'HPP.

Afin de contrer les problèmes rattachés à l'infusion intraveineuse d'époprosténol, un autre analogue stable de la PGI<sub>2</sub>, l'iloprost, est utilisé en inhalation. Une étude récente a témoigné de l'amélioration de l'hémodynamie chez des patients avec une HTP sévère ainsi que des symptômes aigus et chroniques.<sup>263</sup> Toutefois, son effet sur la mortalité n'est pas encore bien établi. Le beraprost, un analogue oral de la PGI<sub>2</sub>, a une demie-vie plus longue que l'éloprosténol. Quoique plusieurs études soient encore nécessaires, il a démontré une efficacité à court terme et à long terme en ce qui a trait à l'amélioration des paramètres hémodynamiques chez les patients.<sup>264;265</sup> L'uniprost (UT-15 ou Remodulin<sup>MC</sup>) commercialisé aux Etats-Unis, est aussi un analogue de la PGI<sub>2</sub>. Sa demie-vie est plus longue, il est stable à la température de la pièce et il est administré par voie sous-cutanée à l'aide d'une minipompe. Les études cliniques ont confirmé des propriétés bénéfiques identiques à l'éloprosténol quant aux paramètres hémodynamiques.<sup>266</sup>

#### 1.5.4.5 Les antagonistes de l'endothéline-1

Étant donné les nombreuses évidences scientifiques qui impliquent la présence et les effets délétères de l'ET-1 dans le développement et la progression de l'HTP, ce système est une cible de choix pour le traitement de cette pathologie. Un inhibiteur des ECE, le phosphoramidon, a été utilisé avec succès pour traiter l'HTP, toutefois cette approche thérapeutique ne fait pas l'unanimité.<sup>267</sup> En effet, le phosphoramidon n'est pas très sélectif et des enzymes autres que les ECE, par exemple des chymases et des métalloprotéases non-ECE, sont impliquées dans la conversion de la big-ET-1 en sa forme biologiquement active.<sup>268;269</sup> Par contre, une équipe de recherche a constaté que l'administration chronique de FR901533, un inhibiteur d'ECE, chez les rats ayant préalablement reçu une injection de monocrotaline, a réduit efficacement le développement de l'HTP, l'hypertrophie ventriculaire droite, l'épaississement de la zone médiale des artères pulmonaires ainsi que les niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1.<sup>270</sup>

Présentement, la controverse entourant l'utilisation des antagonistes sélectifs pour les récepteurs ET<sub>A</sub> ou non-sélectifs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, comme approche pharmacologique optimale dans le traitement de l'HTP, demeure entière et d'actualité. En effet, le blocage non-sélectif des récepteurs de l'ET-1 peut réduire les effets bénéfiques des récepteurs ET<sub>B</sub> tels que la libération de NO et de PGI<sub>2</sub> ainsi que la clairance de l'ET-1. Plusieurs antagonistes de nature peptidique ou des agents non-peptidiques ont été développés tel qu'en fait foi le tableau II où en sont énumérés quelques-uns.

**Tableau II : Antagonistes sélectifs et non-sélectifs des récepteurs à l'ET-1**

	ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>
Antagonistes sélectifs	BQ-123 FR 139317 <b>BMS-182874</b> LU 135252 <b>SB 247083</b>	BQ-788 IRL 2500 <b>Ro 46-8443</b>
Antagonistes non-sélectifs	PD 145065 BQ-238 BQ-928 <b>SB 209670</b> <b>Ro 46-2005</b> <b>Ro 47-0203 (Bosentan)</b> <b>Ro 61-0612 (Tezosentan)</b>	

Les antagonistes en **gras** sont de nature non-peptidique.

Jusqu'à présent, un antagoniste non-sélectif des récepteurs à l'ET-1, le bosentan (Tracleer<sup>MC</sup>), est un traitement prometteur de l'HTP. L'administration intraveineuse de ce composé diminue la PAP et la RVP chez les patients avec HTP, mais peut entraîner une chute de la pression artérielle systémique.<sup>271</sup> Par ailleurs, une étude clinique impliquant une administration orale de bosentan, a démontré une amélioration de la capacité à l'exercice et de l'hémodynamie des patients étudiés.<sup>272</sup> La drogue est bien tolérée, sans effet secondaire excepté une augmentation dose-dépendante d'enzymes hépatiques qui est réversible suite de l'arrêt du traitement. Ces résultats ont récemment été confirmés par une large étude clinique, BREATHE-1, et le bosentan a ainsi reçu l'approbation des autorités américaines et canadiennes quant à son utilisation thérapeutique.<sup>273</sup> Le tezosentan est un autre antagoniste non-spécifique des récepteurs à l'ET-1. Une petite étude clinique a révélé que ce composé administré par voie intraveineuse est sûr, bien toléré, et améliore le profil hémodynamique des sujets étudiés.<sup>274</sup> Ces premiers résultats sont encourageants et fournissent une rationnelle pour de plus grandes études cliniques qui préciseront ses effets bénéfiques potentiels.



Plusieurs antagonistes sélectifs pour le récepteur ET<sub>A</sub> sont en développement ou font l'objet d'études animales. Le sitaxsentan, l'un d'eux, est très spécifique, il a une longue durée d'action et il est biodisponible par voie orale. Il a diminué significativement la PAP et la RVP et amélioré la capacité à l'exercice de 14 patients avec HTP artérielle après 12 semaines de traitement.<sup>275</sup> Par contre, une attention particulière doit être portée à la fonction hépatique puisque le sitaxsentan est un inhibiteur d'enzymes hépatiques CYP2C9 P450.<sup>276</sup> Plusieurs études ont aussi confirmé la nécessité de l'inactivation des deux types de récepteurs pour l'inhibition optimale de la constriction pulmonaire induite par l'ET-1.<sup>248</sup> En effet, certaines évidences laissent croire que la stimulation des récepteurs ET<sub>B</sub> permet la libération d'eicosanoïdes dont la TxA<sub>2</sub> qui sont de puissants constricteurs du lit vasculaire pulmonaire. Il est à noter qu'une comparaison directe entre un antagoniste sélectif et un antagoniste mixte dans le traitement de l'HTP a démontré que les deux approches sont efficaces chez le rat monocrotaline, sans différence significative quant à la survie.<sup>277</sup> Cependant, il n'existe jusqu'à présent, aucune étude de ce type chez l'humain. Par conséquent, plusieurs recherches sont encore nécessaires avant de pouvoir, hors de tout doute, privilégier l'une de ces approches thérapeutiques.

#### 1.5.4.6 La transplantation d'organes

Chez les patients qui ne répondent efficacement à aucune thérapie, particulièrement à l'éloprosténol, la transplantation pulmonaire simple ou double s'avère être l'option finale. Chacune de ces chirurgies a approximativement la même efficacité quant au taux de survie des sujets opérés.<sup>253</sup> Cependant, l'évaluation du délai pour la transplantation est critique.<sup>278</sup> Le patient doit être suffisamment malade pour être candidat, mais doit tout de même survivre à la chirurgie. La transplantation pulmonaire simple d'un poumon est une procédure de choix étant donné la disponibilité

relative des organes. Les patients doivent se soumettre à un traitement immunosuppresseur et certaines complications tardives, par exemple des bronchiolites oblitérantes, peuvent aussi survenir et limiter le succès de l'opération.

De plus en plus, la combinaison de plusieurs approches pharmacologiques apparaît comme étant l'avenir du traitement de l'HTP et possiblement la plus efficace. Toutefois, la poursuite de la recherche fondamentale et clinique afin de mieux comprendre le système ET, est essentielle au progrès scientifique mais surtout au traitement optimal de l'HTP.

## 1.6 Évaluation de la circulation pulmonaire

**Relation débit-pression** La circulation pulmonaire a une hémodynamie unique puisqu'elle accomode la totalité du débit cardiaque dans un système conséquamment à faible résistance. En effet, les pressions y sont six fois inférieures à celles de la circulation systémique même lorsque le débit atteint 20 ou 30 L/min à l'exercice chez l'homme. De façon usuelle et en clinique, la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) est calculée à partir du débit cardiaque ( $Q_C$ ) et de la différence de pression de part et d'autre du poumon.

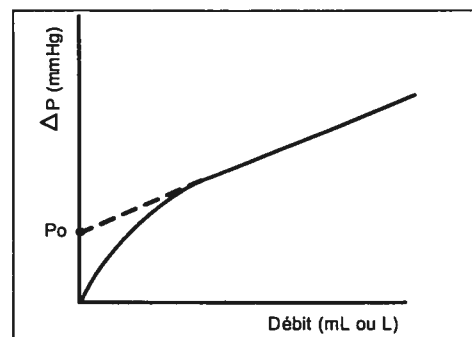
$$RVP = \frac{P_{ap_{MOY}} - P_{og}}{Q_C}$$

$P_{ap_{MOY}}$  : Pression de l'artère pulmonaire moyenne  
 où  $P_{og}$  : Pression de l'oreillette gauche estimé à partir de la pression capillaire pulmonaire bloquée (pression wedge)

Bien que très utile, cette méthode présente des limites à l'interprétation précise des propriétés résistives globales du poumon. Par exemple, une augmentation du  $Q_C$  seul par un vasodilatateur périphérique, assure une chute des RVP calculées sans que le tonus vasculaire pulmonaire ne soit modifié. Afin d'évaluer globalement et de façon précise les propriétés résistives de la circulation pulmonaire, il faut obtenir à partir de plusieurs mesures dans le poumon isolé, une relation débit-pression.

La relation débit-pression est divisée en deux parties.(Figure 6) La première partie observée aux basses valeurs de débits et de pressions, est curvilinéaire et correspond au recrutement progressif des vaisseaux résistifs alors que la seconde partie est linéaire et correspond au recrutement complet de ceux-ci.

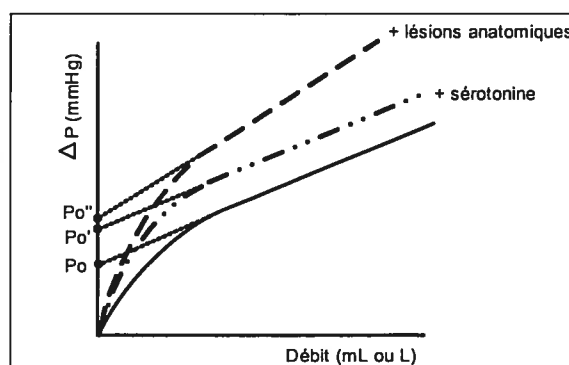
Figure 6 : Relation débit-pression typique



L'extrapolation de la partie linéaire à l'axe des ordonnées détermine un point

d'intersection dont la valeur est nommée pression d'ouverture ( $P_o$ ). La pente de la partie linéaire représente la résistance de la circulation pulmonaire complètement recrutée et distendue, elle dépend de la viscosité du sang et des propriétés anatomiques des vaisseaux résistifs. Par exemple, la sérotonine élève la  $P_o$  sans affecter la pente de la relation car, par ses effets vasoconstricteurs, elle augmente la pression nécessaire pour recruter l'ensemble du lit vasculaire. Par contre, une pathologie impliquant des lésions anatomiques telles que la fibrose augmente la pente et la  $P_o$  de la relation. (Figure 7)

Figure 7 : Relations débits-pressions diverses



Deux explications sont possibles pour élucider la génération d'une pression positive à un débit pulmonaire nul. Premièrement, les capillaires pulmonaires ne peuvent pas soutenir une pression transmurale négative, par conséquent la pression alvéolaire génère cette pression positive.<sup>279</sup> Deuxièmement, le tonus vasculaire peut être actif à certains endroits du lit vasculaire pulmonaire et participer à la génération de cette pression ; cette hypothèse plus controversée est expliquée par le modèle « Starling resistor ».<sup>280</sup>

La relation débit-pression démontre bien les limites imposées par une mesure unique et ponctuelle de la résistance vasculaire. En effet, la résistance ( $R$ ) pulmonaire ne peut être obtenue d'une mesure unique de la pression ( $\Delta P$ ) à un débit ( $Q$ ) donné. L'ensemble de la relation débit-pression permet une évaluation plus complète et précise, c'est-à-dire que la pente et le point d'intersection de celle-ci sont des données plus caractéristiques qu'une

résistance calculée à partir d'un débit donné. L'utilisation de l'équation  $R=\Delta P/Q$  est justifiée seulement si la relation débit-pression est linéaire. Dans ce cas, les résistances sont constantes pour chaque débit étudié et caractéristiques de la partie résistive de la circulation pulmonaire. Il est aussi important de noter que même avec des conditions expérimentales identiques, deux relations débit-pression effectuées successivement ne sont pas parfaitement superposables, la seconde donne des valeurs pressives légèrement inférieures. Ce phénomène bien décrit et documenté est l'hystérèse pulmonaire.

**Myographe** Tel que mentionné précédemment, les petites artères de 100-300  $\mu\text{m}$  sont considérées comme étant des artères de résistance. Étant donné leur petite taille, plusieurs difficultés techniques se sont opposées à leur étude. En 1976, Mulvany et Halpern ont développé une méthode, premièrement présentée par Bevan et Oster, afin d'effectuer des mesures directes sur des segments d'artères.<sup>281;282</sup> Le myographe pour microvaisseaux permet d'évaluer la réactivité de petites artères isolées suite à leur stimulation par des agonistes pharmacologiques. Les vaisseaux pulmonaires sont étirés afin de leur donner une tension de base qui correspond à une pression transmurale d'environ 17 mmHg.<sup>208</sup> Cette pression est calculée à partir de la loi de Laplace puisque la paroi des vaisseaux est suffisamment mince pour qu'elle puisse être appliquée. Le degré d'étirement est important, car plusieurs caractéristiques pharmacologiques en dépendent.<sup>283</sup> Les réponses mesurées sont isométriques et ce système est largement utilisé pour étudier les propriétés physiologiques et pharmacologiques de segments d'artères provenant de différents lits vasculaires.

## 1.7 Objectif

De nombreuses évidences attestent de l'activation du système ET dans des pathologies telles que : l'insuffisance cardiaque et rénale, l'angine instable, l'infarctus du myocarde, le diabète, la cirrhose et certaines formes de cancer. De plus, plusieurs données confirment la contribution de cette activation dans le développement et le maintien de l'HTP présente dans les modèles animaux et chez l'humain. La circulation pulmonaire joue un rôle clé dans la production et la clairance de l'ET-1, mais elle est aussi une cible de choix pour ce peptide dans l'HTP. En effet, les concentrations plasmatiques d'ET-1 sont augmentées chez les patients avec HTP ainsi que les niveaux d'ARNm et l'expression tissulaire pulmonaire d'ET-1.<sup>225;228</sup> De plus, l'augmentation des niveaux circulants de ce peptide corrént étroitement avec la sévérité de la pathologie.<sup>223;224</sup>

L'impact pathophysiologique de l'hyperendothélinémie isolée sur la circulation pulmonaire et plus particulièrement sur les petites artères pulmonaires qui contribuent majoritairement à augmenter la RVP dans l'HTP, est toujours inconnu. Une infusion d'ET-1 pendant sept jours a démontré d'importantes modifications de la réactivité vasculaire des artères cérébrales et mésentériques de rats.<sup>284</sup> Toutefois, une infusion chronique de 28 jours de même que les effets de la perfusion aiguë sur la circulation pulmonaire n'ont pas été étudiés.

Ce projet de maîtrise a pour but d'étudier et de caractériser la réactivité vasculaire des artères pulmonaires de résistance après perfusion aiguë et chronique d'ET-1 en absence de pathologie associée.

- Dans un premier temps, nous évaluerons la résistance vasculaire pulmonaire dans son ensemble suite aux perfusions d'ET-1 puis, nous analyserons les paramètres hémodynamiques et morphologiques cardiopulmonaires.
- Par la suite, nous préciserons notre évaluation en étudiant les réponses de petites artères pulmonaires à différents agents pharmacologiques vasoconstricteurs et vasodilatateurs.

Nos résultats permettront de mieux comprendre l'impact d'une hyperendothélinémie isolée sur la réactivité vasculaire pulmonaire. Ceci pourrait être important pour la compréhension, non seulement des pathologies associées à l'HTP, mais aussi des pathologies causant une hyperendothélinémie, par exemple la cirrhose, sans association classique à l'HTP.

## Matériels et méthodes

---

La présente section a pour objet la description de la méthodologie et des différentes techniques et protocoles expérimentaux qui ont permis d'obtenir les résultats présentés dans ce mémoire.

### 2.1 Animaux utilisés

Pour effectuer cette étude, des rats mâles (250-300 g) de race Wistar ont été utilisés. Ils provenaient tous d'un élevage local (Charles River, Saint-Constant, Québec). Les animaux étaient manipulés cinq jours après leur arrivée à l'animalerie afin de leur permettre de bien se familiariser avec leur nouvel environnement.

### 2.2 Méthologie générale

Les rats sont anesthésiés avec un mélange d'halothane et d'oxygène dans un rapport de 2.5 : 1. Une partie de leurs thorax est rasée et désinfectée avec un gel antiseptique (Steri-Stat Teinture 0.5 %; Ingram & Bell, Don Mills, Ontario) puis la veine jugulaire gauche est isolée et ligaturée à son extrémité craniale. Un cathéter de polyéthylène (PE60; 1.22 mm de diamètre externe et 0.76 mm de diamètre interne) relié à une minipompe osmotique (Alzet, modèles 2001 et 2004; Alza Corporation, Cupertino, Californie) est inséré dans la jugulaire des rats traités et fermement fixé. La minipompe est ensuite placée dans une poche sous-cutanée créée sur le dos de l'animal en veillant à ce qu'elle ne nuise pas à ses mouvements. L'incision est refermée et le rat reçoit une injection sous-cutanée d'analgésique (buprénorphine, 0.01 mg/kg; pharmacie interne). La minipompe contient une solution aqueuse d'ET-1 dont



la concentration est établie préalablement selon les caractéristiques spécifiques à chacune d'elles. En effet, le rat traité reçoit 10 ng/kg/min d'ET-1 pendant 7 ou 28 jours. Les rats qui sont utilisés à titre de témoin sont soumis à la même chirurgie, mais sans l'implantation de la minipompe osmotique. Quatre groupes expérimentaux sont créés : ET-7jrs et témoin-7jrs ainsi que ET-28jrs et témoin-28jrs.

### **2.3 Mesures hémodynamiques *in vivo***

Lors de leur sacrifice, les rats sont anesthésiés avec un mélange de kétamine (Ketalean, 50 mg/kg; Bimeda-MTC, Cambridge, Ontario) et de zylaxine (Rompun, 10 mg/kg; Bayer, Toronto, Ontario). Suite à la vérification d'une bonne anesthésie par le réflexe lingual, 2000 U d'héparine (Hepalean; Organon Teknika, Toronto, Ontario) sont administrés par injection intrapéritonéale. La veine jugulaire droite est isolée, incisée et canulée avec un cathéter de polyéthylène (PE50; 0.97 mm de diamètre externe et 0.58 mm de diamètre interne) afin de mesurer la tension veineuse centrale (TVC) et la pression ventriculaire droite. Un deuxième cathéter, similaire au premier, est inséré dans l'artère carotidienne droite afin de mesurer la pression artérielle systémique et la pression ventriculaire gauche. Les mesures sont enregistrées par un polygraphe Gould TA 4000 (Gould Electronics, Valley View, Ohio). Deux prélèvements sanguins, artériel et veineux, de 3 cc chacun sont effectués simultanément avant le retrait des cathéters. Le sang est centrifugé et le plasma est ensuite prélevé puis congelé à -80 °C pour le dosage ultérieur des concentrations plasmatiques d'ET-1.

## 2.4 Préparation des poumons isolés

Suite au retrait des cathéters, le diaphragme est coupé et la trachée est canulée avec un tube relié à un respirateur pour rongeur (Harvard Apparatus, Montréal, Québec). Le rat est ventilé avec un volume de 1 mL d'air ambiant à 60 cycles/min et avec une pression expiratoire finale positive de 2 cm H<sub>2</sub>O. Le coeur et les poumons sont exposés après une thoracotomie médiane. L'artère pulmonaire est canulée par une incision dans la portion supérieure du VD. La perfusion du poumon débute par l'infusion d'une solution de Krebs additionnée d'héparine (100 U/mL) à 2 mL/min. La solution physiologique utilisée est composée de (en mmol/L) : NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.17, CaCl<sub>2</sub> 2.5 et glucose 5.5. Celle-ci est oxygénée (95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>), filtrée (filtre de 0.22 µm; Sarstedt, Newton, North Carolina) et son pH est ajusté à 7.4. Les poumons sont par la suite rapidement isolés et suspendus dans une chambre chauffée par de l'eau à 37 °C tout en étant toujours ventilés. Ils sont alors perfusés avec une solution de Krebs additionnée de 3 % d'albumine par une pompe MasterFlex (Cole-Palmer Instruments Co., Vernon Hills, Illinois) à un débit constant de 5 mL/min. Le flot pulmonaire est constamment évalué par une bague de débit (Transonic, Ithaca, New York) reliée à son appareil de mesure Transonic (modèle 208). La pression de perfusion pulmonaire est mesurée par un transducteur de pression et enregistrée par le polygraphe Gould TA 4000.

### 2.4.1 Relations débits-pressions et mesures morphométriques

Après une période d'équilibration de 10 minutes, le débit est graduellement augmenté par échelon de 5 mL/min jusqu'à 25 mL/min. À chaque étape, deux minutes sont allouées afin de permettre la stabilisation de la pression de perfusion pulmonaire. Le système est par la suite placé en recirculation et 100 µmol/L de L-NNA sont ajoutés. La solution aqueuse de ce

composé chimique est préparée avant chaque expérience, soniquée 10 minutes puis gardée sur la glace. Après 20 minutes, une deuxième relation débit-pression est effectuée. Les expériences *in vivo* complétées, le VD et le VG+septum sont disséqués et pesés afin d'établir le ratio des poids du VD/(VG+septum) pour déterminer la présence d'hypertrophie ventriculaire droite. De même, le lobe pulmonaire inférieur droit humide est pesé puis conservé une semaine pour obtenir son poids sec et établir le ratio poids sec/humide. Ceci permet d'évaluer s'il y a eu oedème pulmonaire. Il est à noter, que le cœur, le VD et le VG+septum, ainsi que les lobes médians et supérieurs droits sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80 °C pour analyse tissulaire ultérieure.

## 2.5 Préparation des petites artères isolées

À la suite des mesures hémodynamiques et du retrait des cathéters, les poumons et le cœur sont délicatement enlevés et le lobe pulmonaire gauche est préservé dans une solution physiologique oxygénée avec 12 % d'oxygène. Sous un microscope binoculaire (Nikon, modèle SMZ-10A), de petits segments d'artères pulmonaire ayant une longueur de 2 mm et un diamètre de  $269 \pm 7 \mu\text{m}$ , sont délicatement disséqués en prenant soin de ne pas endommager l'endothélium vasculaire. Deux fils de tungstène de 20  $\mu\text{m}$  sont doucement insérés dans les segments d'artères puis fermement fixés sur un myographe pour microvaisseaux (IMF, University of Vermont). La procédure dure environ 90 minutes. Les artères sont par la suite étirées en fonction de leur diamètre afin de leur donner une tension optimale tel que décrit par les études de Mulvany.<sup>285</sup>

### 2.5.1 Réactivité des petites artères isolées

Après une équilibration d'une durée de 45 minutes, les artères sont soumises à deux contractions subséquentes de 40 mmol/L KCL. Celles-ci conditionnent les segments d'artères et nous permettent de vérifier leur viabilité. De plus, la présence de l'endothélium est confirmée par l'ajout de 10  $\mu$ mol/L d'Ach. Les artères sont soumises à un protocole de constriction ou à un protocole de relaxation. Dans le premier cas, une courbe dose-réponse au U-46619 (0.1 nmol/L à 1  $\mu$ mol/L) est réalisée suivi d'une courbe dose-réponse à l'ET-1 (1 pmol/L à 3  $\mu$ mol/L). Un lavage avec une solution de Krebs succède à chaque courbe ce qui permet à l'artère de retrouver son tonus basal. En terminant l'expérience, l'artère est stimulée avec 127 mmol/L KCL afin d'établir sa contraction maximale. Pour ce qui est du protocole de dilatation, les courbes doses-réponses sont réalisées avec de l'Ach (1 nmol/L à 100  $\mu$ mol/L) et du SNP (1 nmol/L à 10  $\mu$ mol/L) suite à une préconstriction au U-46619 (100 nmol/L) qui reproduit environ 55 % de la contraction maximale.

### 2.6 Homogénéisation, extraction et dosage de l'endothéline-1

**Homogénéisation** L'ET-1 a été dosée dans le plasma et les tissus pulmonaires des rats ET et témoins. Tout d'abord, 200 mg de chacun des échantillons tissulaires sont conservés en vue de l'homogénéisation. Celle-ci débute par l'ajout de 2 mL d'un tampon d'homogénéisation (solution constituée de 4 M de guanidine thiocyanate et de 1 % d'acide trifluoroacétique (TFA)) pour acidifier les échantillons. Le tissu baignant dans le tampon est homogénéisé à l'aide d'un pilon rotatif pendant 10 s à 4500 rpm puis refroidi sur la glace. Ces étapes sont répétées à deux autres reprises. Afin de permettre une première clarification des échantillons, une centrifugation de 15 min, à 2500 rpm et à 4 °C est effectuée.

**Extraction** Le surnageant résultant de l'homogénéisation tissulaire pulmonaire ainsi que les échantillons plasmatiques sont ensuite passés dans une colonne jetable Sep-Pak C18 de 3 mL (Waters, Milford, Massachusetts). Cette dernière a été préalablement activée avec 5 mL de méthanol 100 % sous une pression constante puis lavée avec 7.5 mL d'eau nanopure. À la suite du passage de l'échantillon, la colonne est lavée à nouveau avec 7.5 mL d'eau nanopure ce qui permet l'élimination de la fraction non liée. La colonne est ensuite éluée par un lavage avec 2,5 mL d'éthanol 90 %. Les éluats sont évaporés à l'aide d'un évaporateur Speed Vac SC 110 (Savant Instruments Inc, Farmingdale, New-York) puis les échantillons secs sont conservés à 4 °C et ultérieurement reconstitués dans le tampon de l'essai.

**Dosage** Les niveaux d'ET-1 tissulaires et plasmatiques ont été mesurés à l'aide d'essais immuno-enzymatiques (ELISA) à double anticorps (essai BI-20052, Endothelin–The Next Generation de Biomedica et distribué par Medicorp, Montréal, Québec). Afin d'assurer une sensibilité maximale, l'essai inclut un anticorps de capture polyclonal purifié qui recouvre le fond des 96 puits de la plaque, ainsi qu'un anticorps monoclonal de détection; tous deux démontrant une importante affinité spécifique à l'ET-1. La réactivité croisée de l'essai pour l'ET-1 est de 100 % alors que moins de 1 % de la big-ET-1 (1-38 ou 22-38) réagira à l'essai. La limite de détection de celui-ci fut déterminée à une concentration de 0.05 fmol/mL d'ET-1.

En premier lieu, la préparation des constituants de l'essai est effectuée. L'ET-1 stock fournie est dissoute dans 2 mL de tampon PB puis des dilutions sériées sont ensuite élaborées en vue d'obtenir des standards de concentrations connus et équivalents à 10; 5; 2,5; 1,25 et 0,625 fmol/mL. Le tampon PB non-utilisé tient lieu du standard 0 fmol/mL. L'anticorps de détection est également dissous dans le tampon de l'essai. Enfin, le concentré du tampon de lavage est dilué dans une proportion de 1/10.

La première étape de l'essai consiste en l'addition simultanée de 200  $\mu\text{L}$  de chacun des échantillons et de 50  $\mu\text{L}$  de l'anticorps monoclonal de détection (anti-ET-1 murin) dans leur puits respectif préalablement identifié. De plus, 200  $\mu\text{L}$  des six standards sont distribués et seuls les puits identifiés comme blanc demeurent vides à cette étape. Lorsque présente dans les échantillons, l'ET-1 se lie à l'anticorps de capture et est recouverte par l'anticorps de détection, pour se retrouver dès lors séquestrée entre ceux-ci. Une incubation de 16 à 24 heures est ensuite requise à température de la pièce.

Après cinq lavages consécutifs avec 300  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage, 200  $\mu\text{L}$  de conjugué sont ajoutés à tous les puits. Les lavages ayant éliminé les liaisons non-spécifiques, l'ajout du conjugué (peroxydase couplée à un anticorps IgG anti-murin) permet la détection de l'anticorps à la surface de l'ET-1. La plaque est ensuite incubée pour une durée d'une heure à 37 °C dans un incubateur-vortex Vortemp 56EVC (Apco Diagnostics, New Hampshire). De là, cinq seconds lavages, identiques aux premiers permettront l'élimination du surplus de conjugué et l'ajout du substrat (tétraméthylbenzidine) à chacun des puits. Une incubation finale de 30 minutes à la température de la pièce et à l'obscurité est requise. Durant cette période, l'enzyme peroxydase catalyse la conversion du substrat et provoque un changement de coloration détectable. Cette réaction chimique est arrêtée par l'addition de 50  $\mu\text{L}$  de solution « stop » (acide chlorhydrique). L'évaluation de l'absorbance de chacun des puits est dès lors obtenue par un lecteur de plaque ELISA Universal Microplate Reader EL 800 (Bio-Tek Instruments inc., Wyncoski, Vermont) à une longueur d'onde de 450 nm contre une référence de 690 nm.

Les premiers résultats sont d'abord obtenus par la soustraction de l'absorbance moyenne des blancs à celle de chacun des puits. Une courbe de calibration est ensuite construite à partir des résultats d'absorbance des

standards connus. La quantité d'ET-1 contenue dans les échantillons est déterminée à partir de cette courbe. Celle-ci est de nature logistique à quatre paramètres. Les échantillons ayant été traités en duplicata, la moyenne des concentrations obtenues est utilisée pour fin d'analyse.

## 2.7 Composés utilisés

Les composés suivants : le L-NNA, le U-46619, l'Ach et le SNP proviennent tous de Sigma Chemicals (St.-Louis, Montana) et l'ET-1 de American Peptide Company (Sunnyvale, Californie). Toutes ces drogues ont été dissoutes dans de l'eau nanopure à l'exception du mimétique de la TxA<sub>2</sub> dissous dans de l'éthanol 95 %. Les aliquots de U-46610, d'ET-1, d'Ach et de SNP de différentes concentrations ont été régulièrement refaits et conservés à -20 °C. Les drogues entières par contre furent entreposées selon les recommandations du fabricant.

## 2.8 Évaluation statistique des données

Les paramètres hémodynamiques et morphométriques ainsi que les concentrations plasmatiques et tissulaires d'ET-1 sont évalués par une analyse de variance (ANOVA) et lorsqu'une interaction significative est retrouvée, par un test de comparaison multiple (Bonferroni). Les relations débits-pressions sont, quant à elles, évaluées par ANOVA à mesures répétées suivie aussi par un test de Bonferroni. Chaque relation débit-pression est soumise à une régression linéaire pour déterminer la pente et l'ordonnée à l'origine. Ces deux dernières données ont été comparées entre les groupes témoin et ET respectifs par un test T de Student non pairé. Pour ce qui est des études de réactivité des artères isolées, la vasoconstriction est exprimée en pourcentage de la réponse maximale (E<sub>max</sub>) obtenue avec 127

mmol/L KCL. D'autre part, la relaxation est exprimée en pourcentage d'inhibition de la précontraction. La précontraction réfère au niveau de tonus provoqué par un agent contracteur soit le U-46619 (100 nM) avant l'addition d'un agent relaxant (Ach ou SNP). Les concentrations effectives à 25, 50 et 75 % ( $EC_{25}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{75}$ ) pour chaque agoniste de même que la réponse maximale sont obtenues par la correspondance, pour chaque courbe dose-réponse, d'une équation logistique à cinq paramètres (Sigma Plot). La valeur  $pD_2$  correspond au logarithme négatif de l' $EC_{50}$  de l'agoniste. Pour ces paramètres, une comparaison entre les groupes témoins et ET respectifs a été effectuée par un test T de Student non pairé. Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme étant significative. Les valeurs sont rapportées comme moyenne  $\pm$  l'écart à la moyenne (S.E.M.).

## 2.9 Éthique

Le soin et l'utilisation des animaux et tous les protocoles de recherche sont conformes aux règles énoncées par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et approuvés par le Comité de Déontologie Animale (CDA) du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

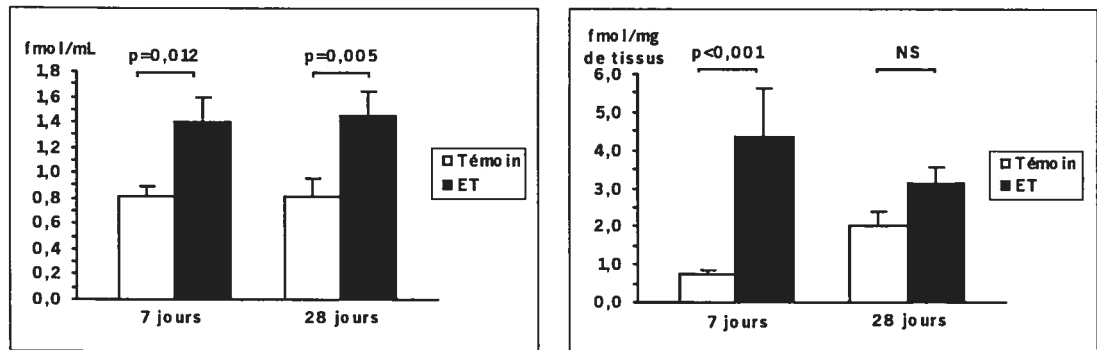


## Résultats

### 3.1 Dosage de l'endothéline-1

Afin d'évaluer l'efficacité de l'infusion d'ET-1 par minipompes osmotiques, les concentrations plasmatiques et tissulaires de ce peptide vasoactif ont été dosées. Les niveaux plasmatiques veineux d'ET-1 ont doublé après perfusion. Le groupe ET-7jrs ( $1.40 \pm 0.19$  fmol/mL) démontrent une augmentation significative par rapport à son groupe témoin ( $0.82 \pm 0.07$  fmol/mL,  $p < 0.05$ ). Les mêmes résultats sont applicables si l'on compare le groupe ET-28jrs ( $1.45 \pm 0.19$  fmol/mL) et témoin-28jrs ( $0.82 \pm 0.13$  fmol/mL,  $p < 0.01$ ). La figure 8A représente ces différentes données.

**Figure 8 :** Concentrations d'endothéline-1 plasmatiques et tissulaires



**A-** Niveaux plasmatiques veineux d'ET-1.

Témoin-7jrs n=12, ET-7jrs n=11,  
témoin-28jrs n=11 et ET-28jrs n=13.

**B-** Niveaux tissulaires pulmonaires d'ET-1.

Témoin-7jrs n=11, ET-7jrs n=12,  
témoin-28jrs n=12, et ET-28jrs n=11.

Les concentrations tissulaires pulmonaires d'ET-1 sont représentées dans la figure 8B. Le groupe ET-7jrs ( $4.40 \pm 1.27$  fmol/mg de tissu) a une élévation marquée des niveaux d'ET-1 présents dans les tissus pulmonaires comparativement au groupe témoin-7jrs ( $0.73 \pm 0.13$  fmol/mg de tissu,

$p < 0.001$ ). Toutefois, cette augmentation n'est pas significative entre les groupes ET-28 jrs et témoin-28jrs. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les groupes témoins-(7jrs vs 28jrs;  $p = 0.225$ ) et les groupes ET-(7jrs vs 28jrs;  $p = 0.233$ ).

### 3.2 Paramètres hémodynamiques et morphométriques

Chez les rats anesthésiés, témoins et ET, la fréquence cardiaque (FC) moyenne ne varie pas entre les quatre groupes étudiés tel que démontré dans le tableau III. Toutefois, on note une légère augmentation non significative de la tension artérielle moyenne dans le groupe ET-28jrs. L'indice de contractilité du ventricule gauche (VG  $dP/dT+$ ) n'est pas affecté par l'infusion d'ET-1 alors que l'indice de relaxation de celui-ci (VG  $dP/dT-$ ) est augmenté significativement dans le groupe ET-7jrs par rapport à son groupe témoin ( $6000 \pm 270$  mmHg/s vs  $5049 \pm 320$  mmHg/s;  $p < 0.05$ ) ainsi que dans le groupe ET-28jrs ( $6073 \pm 266$  mmHg/s vs  $5122 \pm 285$  mmHg/s;  $p < 0.05$ ). La pression systolique du ventricule droit ainsi que les dérivés positives et négatives de cette pression (VD  $dP/dT+$  et VD  $dP/dT-$ ) ne sont pas modifiées par l'infusion d'ET-1 pendant 7 ou 28 jours.

Pour ce qui est des paramètres morphométriques, une légère diminution du poids corporel est présente dans le groupe ET-7jrs ( $317 \pm 5$  g vs  $336 \pm 7$  g;  $p < 0.05$ ) et ET-28jrs ( $422 \pm 6$  g vs  $442 \pm 6$  g;  $p < 0.05$ ). Les poids des VD et VG+septum indexés au poids corporel des rats ne varient pas selon les groupes étudiés. Les différents groupes expérimentaux n'ont pas développé d'hypertrophie ventriculaire droite ou d'œdème pulmonaire tel que démontré par l'absence de différence significative entre les rapports VD/VG+septum et poids pulmonaires secs/humides.

Tableau III : Paramètres hémodynamiques et morphométriques

Groupes	7 jours		28 jours	
	Témoin (n=21)	ET (n=22)	Témoin (n=22)	ET (n=23)
FC (batt/min)	277 ± 4	267 ± 4	273 ± 5	270 ± 4
TAM (mmHg)	89.9 ± 3.0	91.6 ± 5.4	98.3 ± 2.8	105.5 ± 3.1
VG dP/dT+ (mmHg/s)	6414 ± 243	6348 ± 245	6997 ± 277	7581 ± 266
VG dP/dT- (mmHg/s)	5049 ± 320	6000 ± 270 *	5122 ± 285	6073 ± 266 *
VD <sub>systolique</sub> (mmHg)	27.3 ± 0.4	26.8 ± 0.5	26.6 ± 0.3	27.2 ± 0.4
VD dP/dT+ (mmHg/s)	1522 ± 76	1488 ± 42	1611 ± 49	1592 ± 53
VD dP/dT- (mmHg/s)	1015 ± 43	974 ± 32	997 ± 31	1002 ± 26
Poids corporel (g)	336 ± 7	317 ± 5 *	442 ± 6	422 ± 6 *
Poids VD (mg/g de poids corporel)	0.517 ± 0.008	0.498 ± 0.012	0.455 ± 0.008	0.464 ± 0.010
Poids VG+septum (mg/g de poids corporel)	1.882 ± 0.031	1.871 ± 0.016	1.781 ± 0.023	1.831 ± 0.026
VD/VG+septum	0.276 ± 0.005	0.265 ± 0.006	0.256 ± 0.005	0.254 ± 0.005
Poids poumon sec/humide	0.216 ± 0.003 (n=8)	0.213 ± 0.003 (n=9)	0.217 ± 0.003 (n=10)	0.225 ± 0.003 (n=12)

ET :rat traité à l'ET-1, FC :fréquence cardiaque, TAM :tension artérielle moyenne, VG : ventricule gauche, VD : ventricule droit, dP/dT : dérivé de la pression positive (+) et négative (-). \*p<0.05 vs témoin.

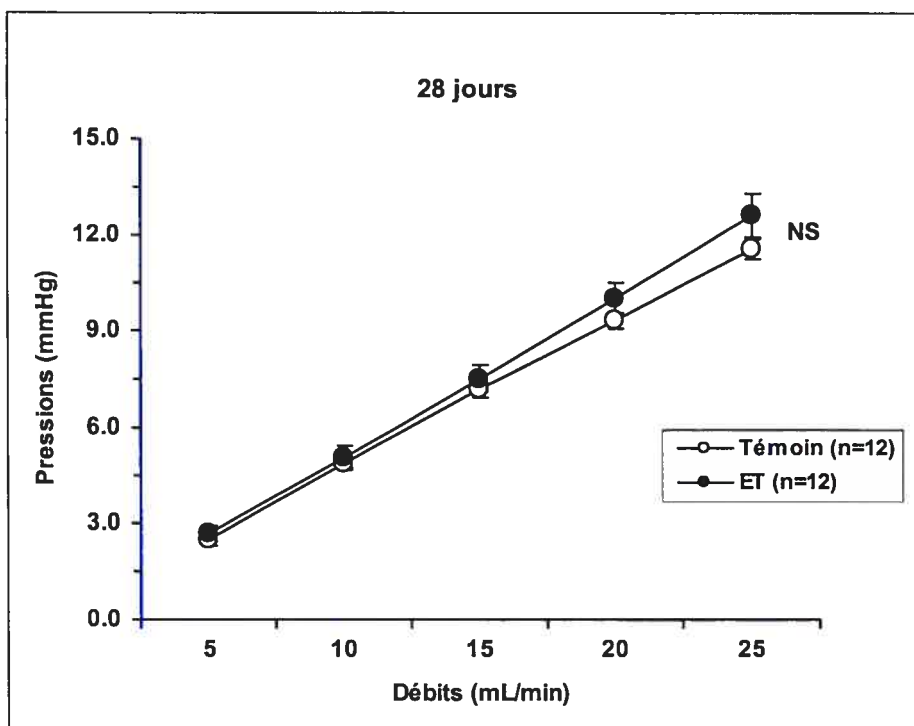
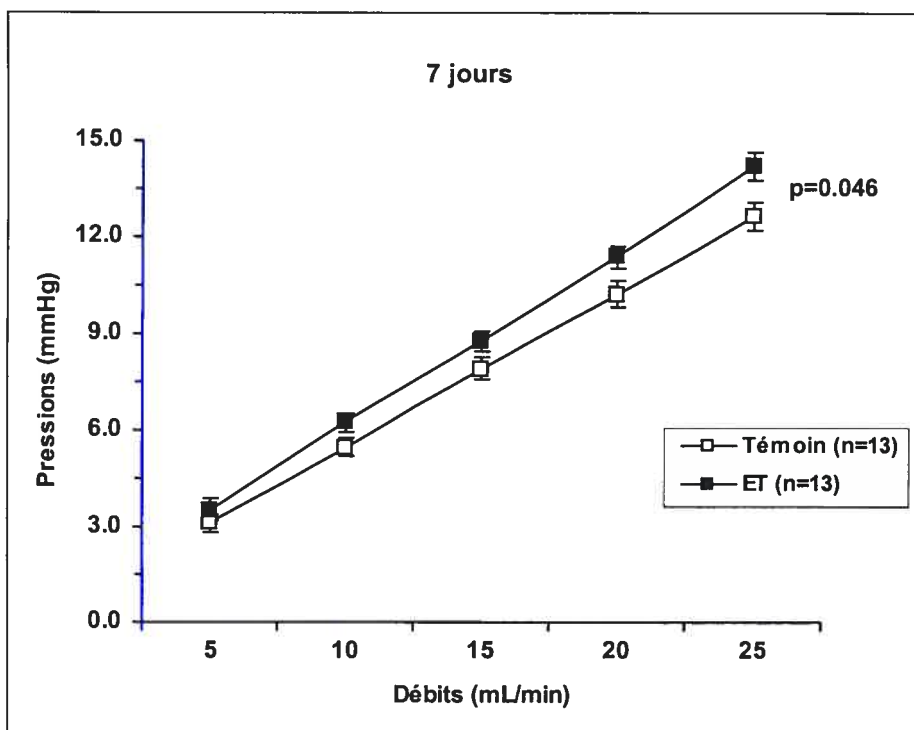
### 3.3 Relations débits-pressions

La technique du poumon isolé a permis d'obtenir des relations débits-pressions pour les quatre groupes expérimentaux et elles sont reproduites dans la figure 9. À 7 jours, les relations débits-pressions entre les groupes témoin et ET démontrent une légère différence significative ( $p=0.046$ ). De plus, la pente de la relation du groupe ET-7jrs ( $0.53 \pm 0.02$  mmHg/mL·s) est augmentée par rapport au groupe témoin-7jrs ( $0.47 \pm 0.01$  mmHg/mL·s,  $p<0.05$ ), mais sans différence de l'ordonnée à l'origine. Pour ce qui est des groupes 28 jours, il n'y a pas de différence significative entre les relations débits-pressions, les pentes et les ordonnées à l'origine.

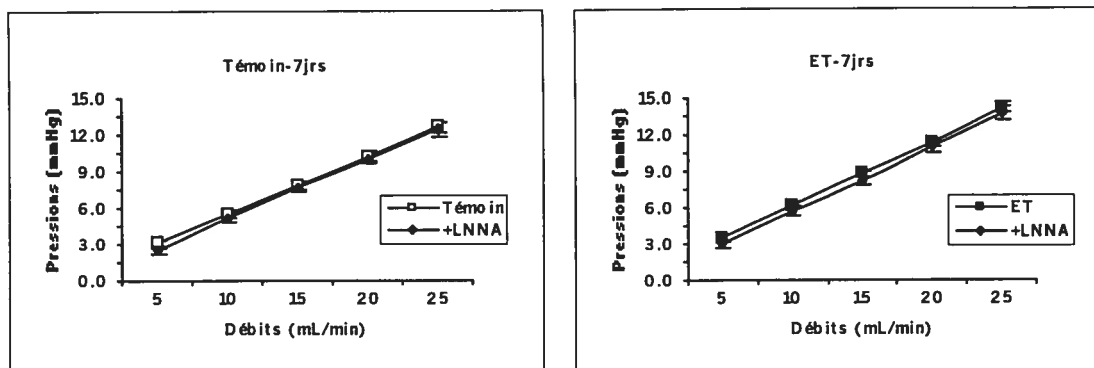
#### 3.3.1 Relations débits-pressions avec L-NNA

Chaque relation, dans les quatre groupes expérimentaux, a été effectuée en absence et en présence de  $100 \mu\text{mol/L}$  de L-NNA. Le traitement avec un inhibiteur de la NOS n'a pas modifié les relations débits-pressions des groupes témoin et ET-7jrs et des groupes témoin et ET-28jrs tel que représenté à la figure 10.

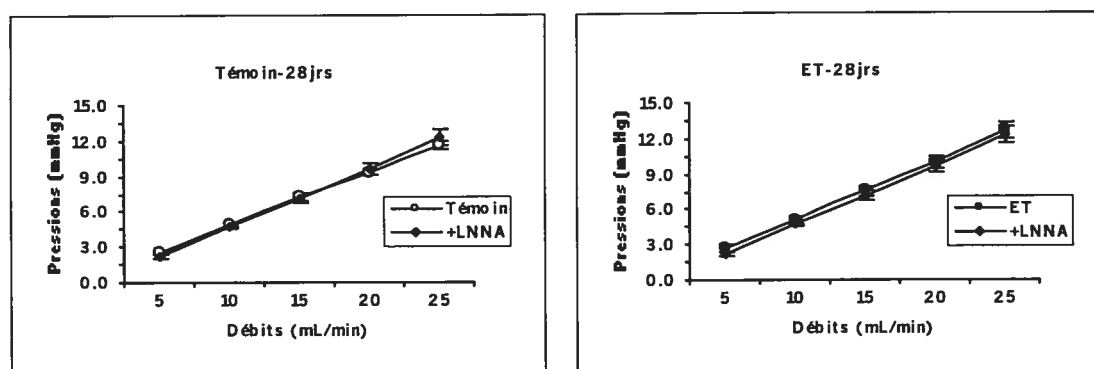
Figure 9 : Relations débits-pressions à 7 et 28 jours



**Figure 10 : Relations débits-pressions sans et avec L-NNA**



Relations débits-pressions sans et avec 100  $\mu$ mol/L de L-NNA. Tous les groupes : n=13.



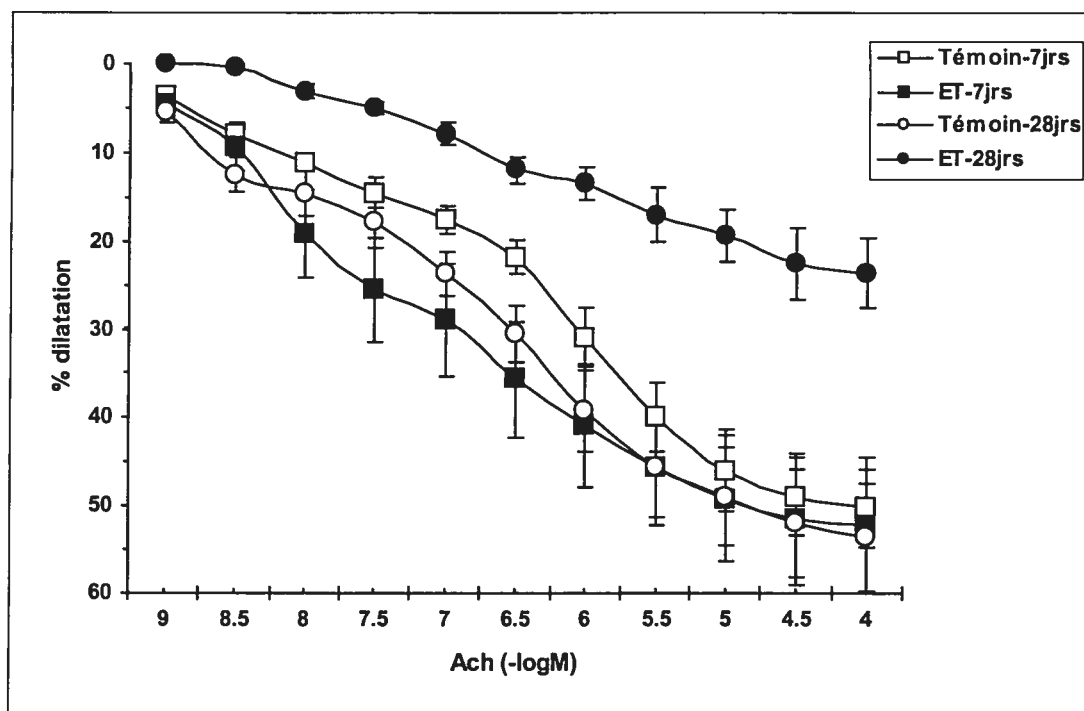
Relations débits-pressions sans et avec 100  $\mu$ mol/L de L-NNA. Tous les groupes : n=12.

### 3.4 Réactivité des petites artères pulmonaires isolées

#### 3.4.1 Vasodilatation

L'hyperendothélinémie n'a pas modifié la réactivité vasculaire à l'Ach des petites artères pulmonaires du groupe ET-7jrs tel que démontré dans la figure 11. Le niveau de préconstriction au U-46619 et la relaxation maximale à l'Ach ne présentent pas de différence significative. (Tableau IV) Par contre, les concentrations effectives à 50 % et 75 % pour le groupe ET-7jrs ( $7.24 \pm 0.27$  et  $6.52 \pm 0.28$ ) sont significativement plus faibles que pour le groupe témoin-7jrs ( $6.52 \pm 0.13$ ;  $p < 0.05$  et  $5.69 \pm 0.08$ ;  $p < 0.05$ ).

Figure 11 : Courbes doses-réponses à l'Ach



Courbes doses-réponses à l'Ach sur des petites artères pulmonaires de rats (n=7 à 9).  
 $p < 0.01$  par ANOVA

Toutefois, le groupe ET-28jrs démontre une différence significative. En effet, pour un niveau de précontraction semblable entre témoin-28jrs et ET-28jrs, la relaxation maximale à Ach ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) observée expérimentalement ou ajustée par une équation logistique à cinq paramètres est statistiquement différente. La sensibilité des artères du groupe ET-28 jours est moindre ( $7.38 \pm 0.22$  vs  $7.97 \pm 0.15$ ;  $p < 0.05$ ) pour la concentration d'Ach effective à 25 %.

**Tableau IV :** Niveau de précontraction et effet de l'Ach sur la réactivité vasculaire pulmonaire.

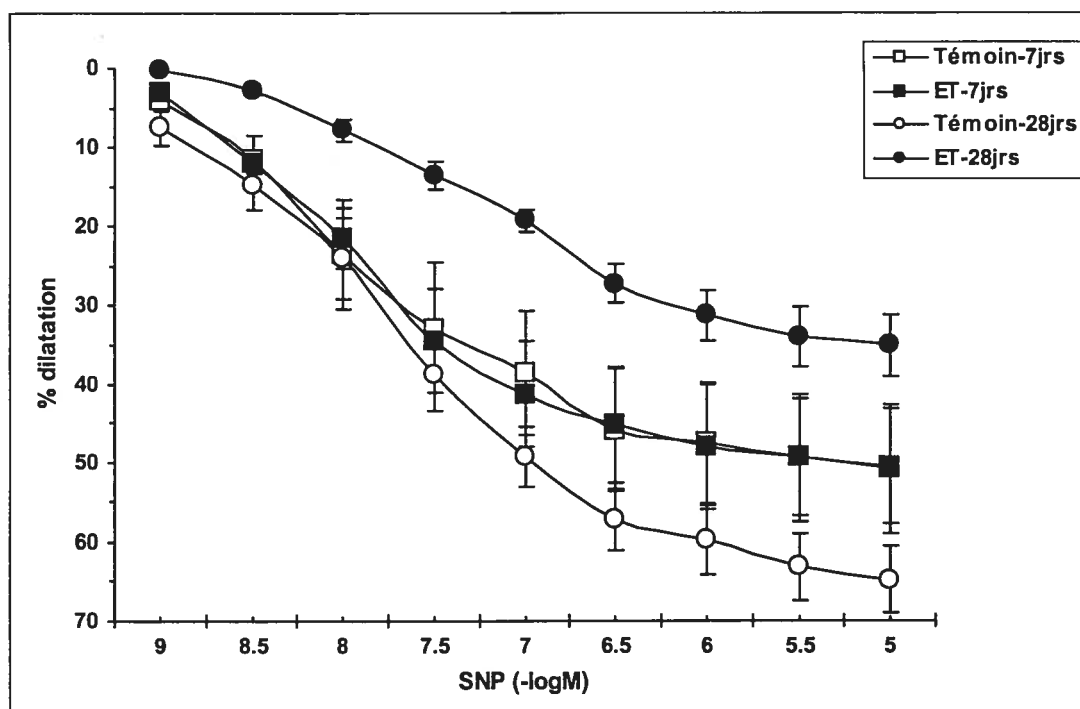
Groupes	7 jours		28 jours	
	Témoin (n=9)	ET (n=9)	Témoin (n=8)	ET (n=7)
Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	317 $\pm$ 23	271 $\pm$ 18	303 $\pm$ 27	256 $\pm$ 13
Niveau précontraction (%)	65.5 $\pm$ 5.3	57.5 $\pm$ 6.0	53.5 $\pm$ 7.4	46.0 $\pm$ 2.4
Relaxation maximale expérimentale (%)	50.2 $\pm$ 4.4	52.1 $\pm$ 7.6	53.6 $\pm$ 6.1	23.7 $\pm$ 4.0 **
Relaxation maximale ajustée (%)	50.7 $\pm$ 4.1	52.0 $\pm$ 7.4	54.2 $\pm$ 6.3	24.8 $\pm$ 4.4 **
EC <sub>25</sub>	7.73 $\pm$ 0.24	8.04 $\pm$ 0.24	7.97 $\pm$ 0.15	7.38 $\pm$ 0.22 *
EC <sub>50</sub>	6.52 $\pm$ 0.13	7.24 $\pm$ 0.27 *	6.89 $\pm$ 0.12	6.51 $\pm$ 0.24
EC <sub>75</sub>	5.69 $\pm$ 0.08	6.52 $\pm$ 0.28 *	5.98 $\pm$ 0.11	5.64 $\pm$ 0.21

Les différentes concentrations effectives sont exprimées en  $-\log\text{M}$  de la concentration de l'agent vasodilatateur. \*  $p < 0.05$  vs témoin; \*\*  $p < 0.01$  vs témoin.

Les courbes doses-réponses au SNP des groupes témoins-7jrs et ET-7jrs sont similaires.(Figure 12) Toutefois, la réactivité vasculaire des petites artères pulmonaires du groupe ET-28jrs est diminuée. Les niveaux de précontraction du groupe témoin-28jrs (35.3  $\pm$  3.2) présentent une différence significative par rapport au groupe ET-28jrs (47.4  $\pm$  4.0;  $p < 0.05$ ). (Tableau V) La relaxation maximale endothélium-indépendante du groupe ET-28jrs est atténuée significativement (64.7  $\pm$  4.2 vs 35.7  $\pm$  4.2;  $p < 0.001$ ). De plus, la concentration de SNP effective à 25 % est manifestement augmentée pour ce même groupe (7.80  $\pm$  0.18 vs 8.38  $\pm$  0.15;  $p < 0.05$ )



Figure 12 : Courbes doses-réponses au SNP



Courbes doses-réponses au SNP sur des petites artères pulmonaires de rats (n=6 à 9).

p<0.05 par ANOVA

Tableau V : Niveau de précontriction et effet du SNP sur la réactivité vasculaire pulmonaire.

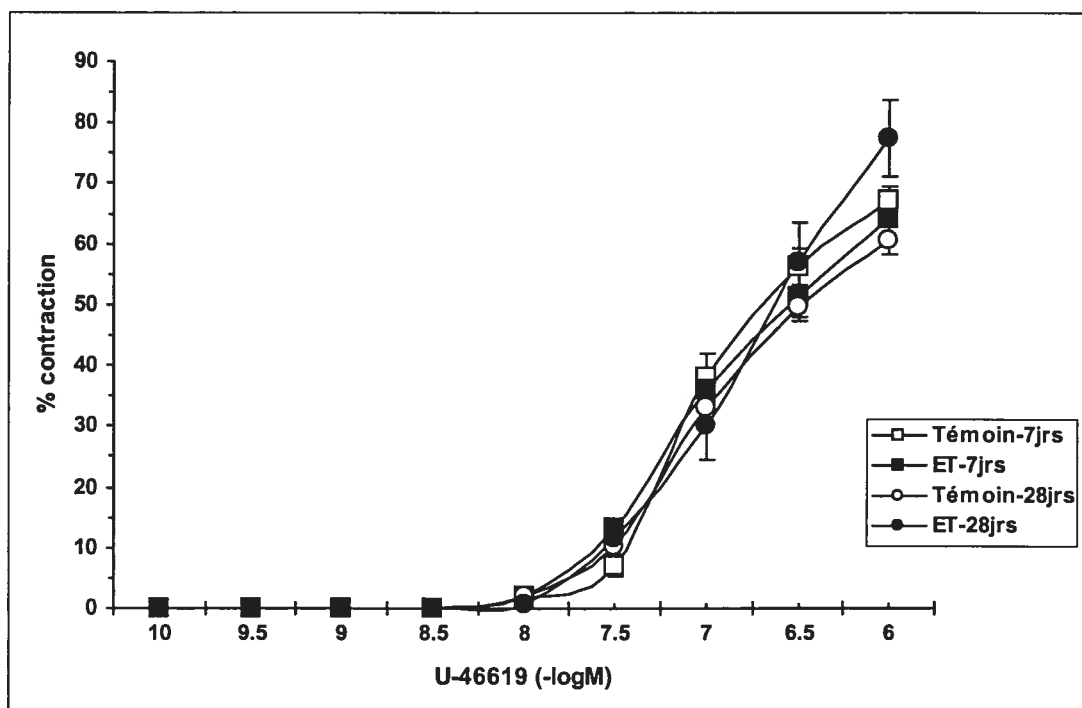
Groupes	7 jours		28 jours	
	Témoin (n=9)	ET (n=6)	Témoin (n=6)	ET (n=7)
Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	328 $\pm$ 65	285 $\pm$ 56	329 $\pm$ 28	243 $\pm$ 31 *
Niveau précontriction (%)	51.6 $\pm$ 4.1	68.1 $\pm$ 8.7	35.3 $\pm$ 3.2	47.4 $\pm$ 4.0 *
Relaxation maximale expérimentale (%)	50.5 $\pm$ 7.3	50.8 $\pm$ 8.1	64.8 $\pm$ 4.2	35.1 $\pm$ 4.0 §
Relaxation maximale ajustée (%)	50.1 $\pm$ 7.0	50.2 $\pm$ 8.0	64.7 $\pm$ 4.2	35.7 $\pm$ 4.2 §
EC <sub>25</sub>	8.25 $\pm$ 0.17	8.45 $\pm$ 0.11	8.38 $\pm$ 0.15	7.80 $\pm$ 0.18 *
EC <sub>50</sub>	7.66 $\pm$ 0.17	7.87 $\pm$ 0.11	7.73 $\pm$ 0.12	7.27 $\pm$ 0.20
EC <sub>75</sub>	7.09 $\pm$ 0.18	7.23 $\pm$ 0.13	7.05 $\pm$ 0.09	6.74 $\pm$ 0.21

Les différentes concentrations effectives sont exprimées en  $-\log\text{M}$  de la concentration de l'agent vasodilatateur. \* p<0.05 vs témoin; § p<0.001 vs témoin.

### 3.4.2 Vasoconstriction

Les quatre groupes expérimentaux ont réagi de façon semblable aux différentes concentrations de U-46619, un analogue mimétique de la  $TxA_2$ , tel que démontré dans la figure 13.

**Figure 13 :** Courbes doses-réponses au U-46619



Courbes doses-réponses au U-46619 sur des petites artères pulmonaires de rats (n=7 à 10).  $p < 0.05$  par ANOVA

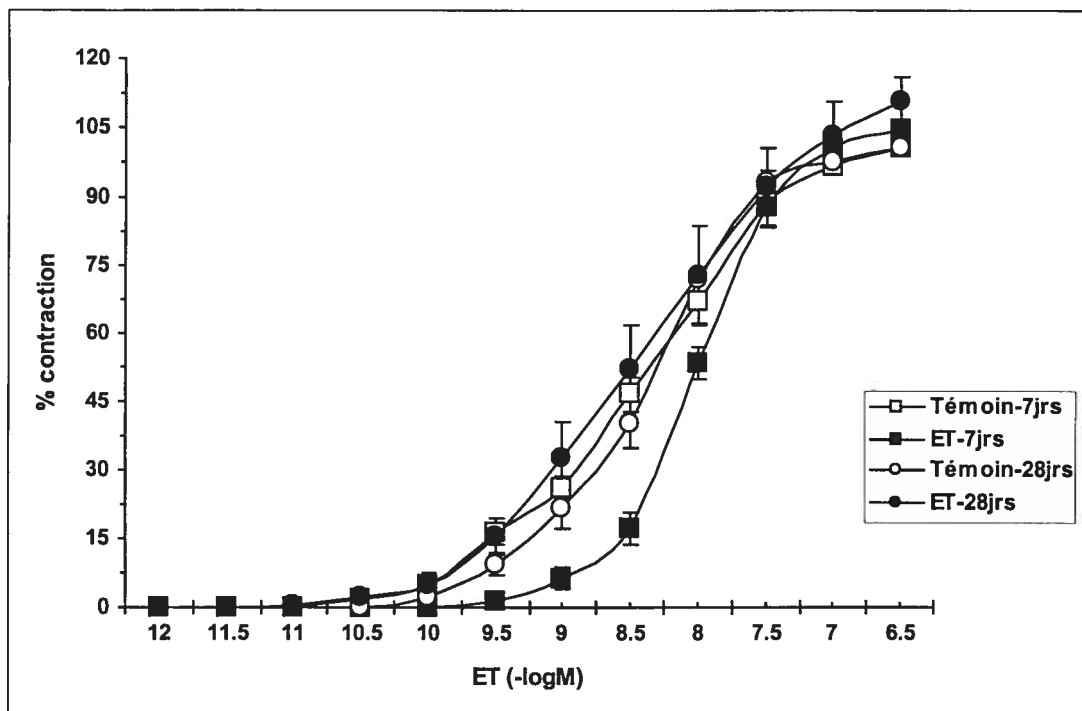
Seules les contractions maximales expérimentales et ajustées par une équation logistique à cinq paramètres sont significativement distinctes entre le groupe témoin-28jrs ( $60.4 \pm 2.0$  et  $63.9 \pm 2.2$ ) et son homologue ET-28jrs ( $77.5 \pm 6.3$  et  $81.2 \pm 6.4$ ;  $p < 0.05$ ). (Tableau VI) Nous devons toutefois admettre une limite quant à l'interprétation de nos résultats des groupes 28 jours; celle-ci sera abordée dans la discussion.

**Tableau VI :** Contraction maximale et effet du U-46619 sur la réactivité vasculaire pulmonaire.

Groupes	7 jours		28 jours	
	Témoin (n=8)	ET (n=7)	Témoin (n=9)	ET (n=10)
Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	234 $\pm$ 16	246 $\pm$ 15	258 $\pm$ 18	262 $\pm$ 15
Contraction maximale expérimentale (%)	67.2 $\pm$ 2.3	64.0 $\pm$ 3.4	60.4 $\pm$ 2.0	77.5 $\pm$ 6.3 *
Contraction maximale ajustée (%)	68.9 $\pm$ 2.3	66.1 $\pm$ 3.3	63.9 $\pm$ 2.2	81.2 $\pm$ 6.4 *
EC <sub>25</sub>	7.38 $\pm$ 0.06	7.46 $\pm$ 0.03	7.43 $\pm$ 0.06	7.24 $\pm$ 0.11
EC <sub>50</sub>	7.05 $\pm$ 0.06	7.07 $\pm$ 0.05	7.06 $\pm$ 0.04	6.87 $\pm$ 0.08
EC <sub>75</sub>	6.73 $\pm$ 0.06	6.68 $\pm$ 0.05	6.68 $\pm$ 0.02	6.57 $\pm$ 0.06

Les différentes concentrations effectives sont exprimées en  $-\log M$  de la concentration de l'agent vasoconstricteur.\*  $p < 0.05$  vs témoin.

Les différents groupes expérimentaux ont réagi différemment au puissant peptide vasoactif qu'est l'ET-1.(Figure 14) Le groupe ET-7jrs démontre une sensibilité plus faible à l'ET-1 avec des concentrations effectives à 25%, à 50% et à 75% significativement augmentées.(Tableau VII) La réponse vasoconstrictrice maximale n'est cependant pas différente du groupe témoin-7jrs. Après 28 jours, la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 et la sensibilité des petites artères est similaire entre le groupe témoin et ET.

**Figure 14** : Courbes doses-réponses à l'ET-1

Courbes doses-réponses à l'ET-1 sur les artères pulmonaires de rats (n=7 à 10).

$p=0.07$  par ANOVA

**Tableau VII** : Contraction maximale et effet de l'ET-1 sur la réactivité vasculaire pulmonaire.

Groupes	7 jours		28 jours	
	Témoin (n=7)	ET (n=7)	Témoin (n=8)	ET (n=10)
Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	232 $\pm$ 18	239 $\pm$ 12	259 $\pm$ 20	262 $\pm$ 15
Contraction maximale expérimentale (%)	100.7 $\pm$ 1.8	104.4 $\pm$ 2.3	100.4 $\pm$ 1.8	110.5 $\pm$ 5.5
Contraction maximale ajustée (%)	101.8 $\pm$ 2.2	106.1 $\pm$ 2.2	101.6 $\pm$ 1.9	113.7 $\pm$ 5.2
EC <sub>25</sub>	9.02 $\pm$ 0.08	8.38 $\pm$ 0.05 §	8.89 $\pm$ 0.08	8.94 $\pm$ 0.16
EC <sub>50</sub>	8.38 $\pm$ 0.08	8.00 $\pm$ 0.03 §	8.39 $\pm$ 0.07	8.36 $\pm$ 0.16
EC <sub>75</sub>	7.81 $\pm$ 0.10	7.50 $\pm$ 0.07 *	7.96 $\pm$ 0.07	7.81 $\pm$ 0.16

Les différentes concentrations effectives sont exprimées en  $-\log\text{M}$  de la concentration de l'agent vasoconstricteur. \*  $p<0.05$  vs témoin; §  $p<0.001$  vs témoin



## Discussion


---

Afin de mesurer l'impact d'une hyperendothélinémie isolée sur les paramètres hémodynamiques et la circulation pulmonaire, nous avons perfusé de façon aiguë et chronique de l'ET-1 à des rats. Nous avons premièrement étudié l'effet d'une perfusion pendant 7 et 28 jours sur les différents paramètres hémodynamiques et morphométriques ainsi que sur la réactivité pulmonaire globale. De plus, les niveaux plasmatiques et tissulaires de l'ET-1 ont été dosés afin de valider notre modèle expérimental. Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons évalué et caractérisé la réactivité vasculaire de petites artères pulmonaires à l'aide d'agents pharmacologiques vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Les résultats présentés élucident les effets d'une hyperendothélinémie sur la réactivité pulmonaire dans son ensemble et plus précisément sur les petites artères qui contribuent de façon majoritaire à la résistance vasculaire pulmonaire.



### 4.1 Dosage de l'endothéline-1

L'augmentation des concentrations plasmatiques d'ET-1 est présente dans plusieurs conditions pathologiques chez l'humain.<sup>165;286-288</sup> Toutefois, les conséquences de celle-ci sur la réactivité vasculaire pulmonaire sont inconnues. La concentration d'ET-1 choisie (10ng/kg/min) a permis de reproduire les niveaux anormalement élevés retrouvés dans la plupart des pathologies, c'est-à-dire de deux à trois fois la moyenne physiologique.<sup>288-290</sup> En effet, les concentrations d'ET-1 plasmatiques que nous avons obtenues chez les rats ET-7jrs et ET-28jrs ont doublé par rapport à leur groupe témoin respectif démontrant par le fait même la validité de notre modèle expérimental.



Les niveaux tissulaires pulmonaires d'ET-1 ont aussi été déterminés suite à l'infusion du peptide vasoconstricteur. En effet, ces données sont importantes puisque 80 % de la synthèse de l'ET-1 est libérée du côté basolatéral de la cellule endothéliale et par conséquent se retrouve dans le tissu vasculaire.<sup>136</sup> Les niveaux plasmatiques ne reflètent seulement qu'une faible proportion des niveaux auxquels est réellement exposé le muscle lisse. Nos groupes ET démontrent une augmentation des concentrations tissulaires, mais elle n'est significative que chez le groupe ET-7jrs. L'évaluation de la concentration d'ET-1 présente dans le tissu pulmonaire nous permet de comparer les concentrations plasmatiques d'ET-1 obtenues suite à l'administration par mini-pompes osmotiques à celles d'une production endogène d'ET-1. En effet, puisque l'administration exogène d'ET-1 a provoqué une augmentation des niveaux tissulaires pulmonaires d'ET-1, il est raisonnable de supposer que l'infusion du peptide a stimulé la production et la sécrétion d'ET-1 endogène.

À 7 jours, les récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux pourraient agir comme des transporteurs trans-endothéliaux et libérer l'ET-1 à la surface abluminale de l'endothélium causant ainsi l'augmentation des niveaux tissulaires de ce peptide. De plus, l'internalisation du complexe récepteur ET<sub>B</sub>/ET-1 et sa dissociation subséquente dans les lysosomes favoriseraient la récupération de l'ET-1 et celle-ci stimulerait sa propre production.<sup>119;156;291</sup> En effet, une étude intéressante datant de 1995, démontre que la liaison récepteur ET<sub>B</sub>/ET-1 stimule la synthèse du peptide en augmentant la stabilité et la transcription de son ARNm par un mécanisme dépendant de la PKC.<sup>292;293</sup> Par contre, il est à noter que l'internalisation du complexe récepteur ET<sub>B</sub>/ET-1 a aussi été démontrée comme étant un mécanisme de régulation négative de l'expression du gène de l'ET-1.<sup>294</sup> Quoique le transport trans-endothélial et la récupération de l'ET-1 par les récepteurs ET<sub>B</sub> demeurent des hypothèses, celles-ci pourraient expliquer les niveaux plasmatiques et tissulaires élevés d'ET-1 à 7 jours.

Par contre, à 28 jours, il est possible qu'il y ait eu une réduction de la production et/ou de la clairance d'ET-1 comme mécanisme compensateur. En effet, les niveaux élevés d'ET-1 plasmatiques pourraient favoriser une désensibilisation des récepteurs ET<sub>B</sub> ou alors une diminution de leur expression à la surface des cellules endothéliales. Une étude a démontré que l'ET-1 a une régulation négative sur l'ARNm des récepteurs ET<sub>B</sub> partiellement attribuable à l'augmentation des niveaux d'AMPc secondaire à l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> et à la cascade calcique subséquente.<sup>295</sup> Puisque les récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux seraient désensibilisés et/ou moins exprimés, la formation et l'internalisation du complexe récepteur/peptide, le transport trans-endothélial, ainsi que la stimulation autocrine de l'ET-1 seraient moindres. Ces hypothèses expliqueraient les niveaux tissulaires plus faibles du groupe ET-28jrs.

#### 4.2 Paramètres hémodynamiques et morphométriques

Les différents paramètres hémodynamiques et morphométriques permettent de déterminer s'il y a eu développement d'HTP suite à la perfusion d'ET-1. Les résultats obtenus ont révélé l'absence d'HTP quoique certaines altérations hémodynamiques subtiles soient présentes. Bien qu'une étude préliminaire ait démontré une augmentation de la tension artérielle systolique à 7 jours, nous n'obtenons pas le même résultat.<sup>284</sup> Dans une étude provenant d'un autre laboratoire et utilisant le même modèle expérimental, une infusion d'ET-1 n'a pas modifié la tension artérielle systolique chez le rat traité.<sup>296</sup> Par conséquent, une certaine variabilité semble être présente quant à cette donnée hémodynamique ce qui complique son interprétation. De plus, l'indice de relaxation du VG des rats ET est augmenté témoignant d'un effet lusitrope positif de l'ET-1 sur le muscle cardiaque; phénomène documenté sur le myocarde de lapin.<sup>297</sup> Toutefois, l'effet inotrope n'est curieusement pas présent lors de la

contraction ventriculaire gauche et ceci est difficilement explicable. La perfusion d'ET-1 pendant 7 et 28 jours n'a pas causé d'hypertrophie ventriculaire droite, une modification morphométrique caractéristique d'une augmentation des pressions pulmonaires. De plus, il n'y a pas d'évidence d'œdème pulmonaire confirmé par le ratio des poids pulmonaires secs/humides ce qui corrobore l'absence d'HTP et d'une élévation des pressions microvasculaires pulmonaires.

Le traitement à l'ET-1 pour les deux périodes de temps étudiées a eu pour effet de diminuer significativement le poids corporel des rats. Quoique l'étude préalable à ces travaux ait démontré une augmentation du poids des rats ET-7jrs; les mécanismes qui contribuent à l'accentuation de la masse corporelle n'ont pas été clairement identifiés.<sup>284</sup> L'implantation dorsale sous-cutanée d'une minipompe osmotique peut avoir perturbé temporairement les habitudes alimentaires ainsi que la liberté de mouvement des rats. Par le fait même, la perte de poids peut être associée aux périodes de récupération et de jeûne qui ont suivi la chirurgie et qui semblent être plus importantes chez les rats implantés. Pour conclure, une perfusion d'ET-1 qui reproduit les niveaux pathologiques et augmente les niveaux tissulaires ne cause pas d'HTP ou d'hypertrophie VD. Il est possible que des mécanismes de compensations puissent empêcher le développement de l'HTP. Toutefois, ceci n'exclut pas la possibilité qu'une perfusion plus longue soit nécessaire afin de désensibiliser ceux-ci.

#### **4.3 Relations débits-pressions**

Les relations débits-pressions nous permettent d'évaluer les propriétés résistives globales de la circulation pulmonaire. L'altération de celles-ci à 7 jours suggère une modification de la réactivité vasculaire pulmonaire qui est compensée à 28 jours. En effet, les pentes des relations des groupes témoin



et ET-7jrs présentent une différence significative. La pente de la partie linéaire de la relation représente la résistance de la circulation pulmonaire complètement recrutée et distendue et elle dépend de la viscosité du sang et des propriétés anatomiques des vaisseaux résistifs. Puisque dans nos expériences le sang est remplacé par une solution physiologique additionnée d'albumine, cet élément n'est pas considéré. Par conséquent, seules les propriétés anatomiques des vaisseaux résistifs jouent un rôle dans l'augmentation de la pente des relations du groupe ET-7jrs. L'infusion d'ET-1 a modifié le tonus vasculaire ainsi que les propriétés anatomiques pulmonaires entraînant par le fait même l'augmentation de la RVP. À 28 jours, ces phénomènes semblent avoir été compensés puisque l'élévation de RVP n'est plus apparente. Une augmentation de la libération de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium tels que le NO, la PGI<sub>2</sub> et l'EDHF, une diminution de la sensibilité et/ou de l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> du muscle lisse et une augmentation de la clairance de l'ET-1 par les récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux sont tous des mécanismes compensatoires possibles. Les études de réactivité vasculaire sur les petites artères pulmonaires qui seront présentées nous ont permis de confirmer ou d'infirmer le rôle de certains d'entre eux

L'ajout d'un inhibiteur de la NOS, le L-NNA, n'a pas modifié les relations débits-pressions des quatre groupes expérimentaux. Par conséquent, la production basale de NO ne joue pas un rôle important dans la régulation de la résistance vasculaire pulmonaire totale des poumons perfusés de rats témoins et traités. De plus, en étudiant attentivement les différentes relations débits-pressions présentées à la figure 10, nous remarquons que l'ajout de L-NNA pour un débit donné n'a pas augmenté, mais a même légèrement diminué quoique de façon non-significative, la pression pulmonaire. Ce phénomène documenté s'explique par l'hystérèse pulmonaire.<sup>298</sup> En théorie, un inhibiteur de la synthèse de NO cause une vasoconstriction et par conséquent pour un même débit favorise une

augmentation de la pression obtenue. Cependant, la relation débit-pression avec L-NNA a été effectuée successivement à la première relation sans L-NNA et donne, en raison du recrutement capillaire, des valeurs pressives légèrement inférieures. En effet, lors de la première relation, à 25 mL/min tous les capillaires pulmonaires sont recrutés et la présence des forces de cisaillements est importante. Par conséquent, si le débit est abaissé à 5 mL/min, pour effectuer la seconde relation, la pression pulmonaire obtenue pour ce débit sera plus faible étant donné que la RVP est abaissée suite au recrutement ainsi que par la libération possible de facteurs relaxants tels que le NO, l'EDHF et la PGI<sub>2</sub>.

#### **4.4 Réactivité des artères isolées**

##### **4.4.1 Relaxation endothélium-dépendante**

Dans un premier temps, afin d'évaluer l'impact de l'hyperendothéliémie sur la relaxation endothélium-dépendante, les segments d'artères ont été soumis à des doses croissantes d'Ach suite à une préconstriction au U-46619. Les artères pulmonaires du groupe ET-7jrs sont plus sensibles à un agoniste vasodilatateur endothélium-dépendant que leur groupe témoin. Les résultats que nous obtenons quant aux concentrations effectives à 50 % sur les artères du groupe témoin se comparent aisément à ceux obtenus par l'équipe du Dr MacLean avec des artères pulmonaires humaines ayant sensiblement le même diamètre.<sup>299</sup> L'augmentation de la sensibilité à l'Ach des segments d'artères du groupe ET-7jrs pourrait s'expliquer par le développement de mécanismes compensatoires. En effet, lorsqu'il y a augmentation du tonus vasculaire, la modulation de celui-ci par le NO est importante. Plusieurs études ont démontré une augmentation de l'expression et de l'activité de la NOS endothéliale et par conséquent de la production de NO dans l'HTP.<sup>300-302</sup> Quoique notre modèle ne présente pas

d'évidence d'HTP, il semblerait que la réactivité des petites artères pulmonaires soit modifiée. Cependant, ces mécanismes compensatoires ne semblent pas être assez importants pour influencer la résistance vasculaire du poumon entier tel que nos relations débits-pressions nous le démontrent.

Dans un deuxième temps, nous pourrions penser que les rats ET-28jrs seraient aussi plus sensibles à une relaxation endothélium-dépendante au NO puisque la RVP semble avoir été compensée. Toutefois, les études de réactivité vasculaire nous démontrent le contraire. En effet, la sensibilité est la même, mais la réponse maximale à l'Ach est nettement diminuée par rapport à leur groupe témoin. Une diminution de la sensibilité et/ou de l'expression de la NOS et/ou de la GC<sub>s</sub> pourrait expliquer le faible effet de l'Ach. Il a été démontré qu'une diminution de l'activité du NO survenait dans les cellules endothéliales suite à une exposition hypoxique. Toutefois, plusieurs études ont établi que la diminution de la réponse vasculaire n'était pas restreinte aux vasodilatateurs endothélium-dépendants, mais incluait également les agents donneurs de NO.<sup>303</sup> De plus, d'autres études ont démontré une augmentation de l'ARNm de la NOS ainsi que de son expression dans les poumons et les artères pulmonaires de rats exposés à une hypoxie.<sup>304;305</sup> Ceci suggère par conséquent un problème dans la cascade d'événements cellulaires qui survient suite à la production de NO probablement au niveau de la GC<sub>s</sub>. Cette hypothèse peut évidemment être validée par l'utilisation d'un donneur de NO et nous présenterons ces résultats dans la prochaine section. De surcroît, le Dr Leach, le premier chercheur à avoir mis en évidence les propriétés pharmacologiques différentes entre les grosses et les petites artères pulmonaires, a rapporté un effet vasodilatateur à l'Ach aboli suite à une précontraction à de fortes concentrations d'ET-1.<sup>208</sup> Toutefois, nous pouvons nous interroger sur la validité d'une telle découverte dans notre modèle expérimental puisque les concentrations tissulaires de nos poumons n'atteignent pas les concentrations utilisées dans les protocoles expérimentaux du Dr Leach.

#### 4.4.2 Relaxation endothélium-indépendante

Le SNP stimule directement la GC<sub>S</sub> et permet ainsi l'accumulation de GMP<sub>C</sub> et la vasorelaxation subséquente. Les effets du SNP sont indépendants de l'endothélium. Précédemment, nous avons démontré une augmentation de la sensibilité au NO dans les segments d'artères provenant des rats ET-7jrs alors que ceux provenant des rats ET-28jrs exprimaient une diminution significative de leur réponse maximale. Le SNP a été utilisé afin de vérifier l'hypothèse émise précédemment voulant qu'une anomalie au niveau du muscle lisse lui-même se soit développée avec une hyperendothélinémie. Dans un premier temps, les doses effectives à 50 % pour les deux groupes expérimentaux témoins se comparent aisément à celles retrouvées dans la littérature.<sup>299</sup> De plus, à 7 jours les réponses vasculaires au SNP ne présentent pas d'anomalies alors qu'à 28 jours la réponse maximale à ce donneur de NO est manifestement atténuée.

Discutons d'abord de la possibilité d'une diminution de l'activité enzymatique de la GC<sub>S</sub>. Plusieurs études ont démontré une diminution du potentiel des donneurs de NO dans les artères pulmonaires de rats hypertendus possiblement par une désensibilisation de la GC<sub>S</sub>.<sup>306;307</sup> De surcroît, il a été établi que le NO a des effets régulateurs importants sur la synthèse du GMP<sub>C</sub> dans des cellules musculaires lisses provenant d'artères pulmonaires de rat.<sup>308</sup> L'activité enzymatique de la GC<sub>S</sub> et l'abondance de son ARNm sont affectées par le NO en fonction du temps.<sup>308</sup> Cependant, nous n'avons aucune évidence nous permettant d'affirmer qu'il y a eu une augmentation de la production de NO. En effet, les études réalisées en présence de L-NNA sur le poumon isolé ont démontré que la production basale de NO ne joue pas un rôle important dans la régulation de la résistance vasculaire pulmonaire totale des poumons perfusés de rats traités.

Au demeurant, une seconde hypothèse peut expliquer la diminution de la réponse maximale au SNP chez les rats ET-28jrs. Une étude a révélé que l'ET-1 peut modifier la sensibilité du muscle lisse au NO et ceci par un mécanisme indépendant de la PKC.<sup>309</sup> Puisque les concentrations plasmatiques et tissulaires d'ET-1 sont augmentées chez les rats ET, ce fait doit être pris en considération. Une étude récente a également démontré que l'ET-1 augmente le stress oxydatif dans les cellules endothéliales humaines en stimulant l'expression de la NAD(P)H oxydase.<sup>310</sup> Cette enzyme est majoritairement responsable de la génération endothéliale de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ).<sup>311</sup> Étant donné que la demie-vie du NO est grandement influencée par la quantité de radicaux libres dérivés de l'oxygène (anion superoxyde ( $O_2^-$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'ion hydroxyle ( $HO^-$ )) ceux-ci font une cible de choix pour expliquer la perte de la sensibilité du muscle lisse au NO.<sup>312;313</sup> En effet, l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) provoque un stress oxydatif et diminue la biodisponibilité du NO en formant avec celui-ci le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ).<sup>312;314</sup> Donc, la présence des radicaux libres stimulée par l'ET-1 interfère avec le NO dérivé de l'endothélium ou provenant d'un donneur (SNP) et diminue la réponse maximale du muscle lisse à ce vasodilatateur.

Cependant, nous devons concéder une limitation dans l'interprétation de nos résultats quant à la réactivité vasculaire au SNP. En effet, les artères provenant des deux groupes 28 jours (témoins et ET) n'ont pas le même pourcentage de précontraction au U-46619 et ont des diamètres légèrement, mais significativement différents. Les artères les plus petites, celles du groupe ET, ont un niveau de précontraction plus important que le groupe témoin. Nous pourrions invalider nos résultats concernant la réactivité vasculaire au SNP puisqu'étant plus contractées, les artères ont moins réagi aux mêmes concentrations de SNP et par conséquent démontrent une réponse maximale atténuée. Toutefois, nous pensons que la diminution observée chez le groupe ET-28jrs est réelle. Il a été démontré que les petites

artères réagissent beaucoup plus facilement et plus efficacement au U-46619 et qu'une faible modification de leur diamètre provoque des différences marquées quant à leur réactivité.<sup>209</sup> À 7 jours, le groupe ET a aussi une moyenne de diamètre légèrement inférieure au groupe témoin et nous remarquons aussi un pourcentage de préconstriction plus important sans toutefois être significatif. Par conséquent, nous croyons que la réponse maximale diminuée au SNP (environ 30 %), du groupe ET-28jrs, est réelle et que la préconstriction plus importante (environ 10 %) de ce groupe n'influence pas suffisamment la relaxation pour biaiser nos résultats.

#### 4.4.3 Vasoconstriction

La réactivité des petites artères pulmonaires à un analogue de la  $TxA_2$ , le U-46619, a aussi été étudiée. En effet, plusieurs études ont démontré l'interaction entre la  $TxA_2$  et l'ET-1 dans les effets vasoconstricteurs pulmonaires et bronchiques de l'ET-1.<sup>315-317</sup> De plus, la stimulation de la synthèse de la  $TxA_2$  par l'ET-1 a clairement été révélée dans les cellules musculaires lisses vasculaires en culture.<sup>318</sup> À 7 jours, l'hyperendothéliémie n'a eu aucun effet sur la réactivité vasculaire pulmonaire à l'analogue mimétique de la  $TxA_2$ . Par contre, nous obtenons une réponse maximale significativement augmentée sur les segments d'artères du groupe ET-28jrs. Ce résultat est troublant puisque le traitement à l'ET-1 n'a eu aucun effet sur la réponse maximale du groupe ET-7jrs.

Il a été démontré que l'hypoxie de même qu'une désensibilisation de la  $GC_S$  n'ont aucun effet sur la réponse des artères pulmonaires de rats au U-46619.<sup>306</sup> Cependant, une étude récente a révélé que l'ET-1 stimule la libération de  $TxA_2$  par l'activation de son récepteur  $ET_B$  endothélial.<sup>319</sup> Par conséquent, une désensibilisation ou une diminution de leur expression à la surface des cellules endothéliales telles que mentionnées dans une section

précédente aurait un effet sur la production de  $\text{TxA}_2$  et possiblement sur son récepteur. De plus, la densité des récepteurs à la  $\text{TxA}_2$  est modifiée dans certaines pathologies.<sup>86</sup> Par conséquent, une réduction de la libération de  $\text{TxA}_2$  causée par une diminution du nombre de récepteurs  $\text{ET}_B$  ou alors une désensibilisation de ceux-ci pourrait avoir provoqué une augmentation du nombre de récepteurs TP par un mécanisme de compensation. Ceci expliquerait la réponse maximale plus importante au U-46619 dans le groupe ET-28jrs.

Toutefois, nous devons admettre une limite quant aux résultats que nous avons obtenus avec les différentes concentrations de U-46619. En effet, les courbes doses-réponses présentées à la figure 13 n'atteignent pas de plateau de stabilisation aux concentrations les plus élevées. Une ou deux concentrations supplémentaires, supérieures à  $1 \mu\text{mol/L}$ , auraient résolu l'ambiguïté. Toutefois, cette limite s'explique par une trop grande dilution de la substance originale et une mauvaise estimation des concentrations maximales à utiliser.

#### 4.4.4 Vasoconstriction à l'endothéline-1

L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur des petites artères pulmonaires humaines et murines avec une concentration (-log M) effective à 50 % de 8.1 à 8.3.<sup>299</sup> La diminution de la sensibilité à l'ET-1 des artères pulmonaires provenant du groupe ET-7jrs peut s'expliquer par une diminution de l'expression ou de l'affinité des récepteurs  $\text{ET}_A$ . La désensibilisation de ceux-ci suite à une stimulation prolongée par l'ET-1 est un phénomène réel et documenté.<sup>320-322</sup> Celle-ci s'exprime par une régulation négative du nombre de récepteurs sans affecter leur affinité pour l'ET-1.<sup>323</sup> Par contre, nous ne savons toujours pas si la réduction de la densité des récepteurs est explicable par une diminution du niveau de transcription ou par une

augmentation de l'internalisation de ceux-ci et leur dégradation subséquente. Les travaux du Dr Davenport semblent toutefois indiquer que la modulation de la densité des récepteurs  $ET_A$  est attribuable, du moins en partie, au niveau de transcription de l'ARNm.<sup>322</sup> Par conséquent, bien qu'à 7 jours, la sensibilité à l'ET-1 soit diminuée, les différents mécanismes compensatoires mentionnés précédemment ne semblent pas avoir été activés puisque la RVP est augmentée significativement.

À 28 jours, cette diminution de la sensibilité à l'ET-1 n'est plus apparente. Le temps apparaît donc comme un facteur déterminant et non négligeable dans les réponses adaptatives des artères pulmonaires à une hyperendothélinémie. Étant donné que la RVP est compensée, et que la sensibilité à l'ET-1 des artères pulmonaires n'est pas modifiée, la régulation négative des récepteurs  $ET_A$  n'apparaît pas comme étant un mécanisme compensateur après 28 jours. Par conséquent, en tenant compte des résultats présentés, une diminution de l'expression des récepteurs  $ET_B$  du muscle lisse pourrait être une hypothèse plausible à la RVP compensée à 28 jours.



## Conclusion

---

Les résultats présentés dans ce mémoire illustrent l'impact pathophysiologique de l'hyperendothélinémie isolée sur la circulation pulmonaire et plus précisément sur les petites artères pulmonaires qui contribuent majoritairement à la RVP. Tout d'abord, il est important de mentionner que bien que nos taux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 chez le rat soient plus faibles que ceux retrouvés chez l'homme avec hypertension pulmonaire, ils attestent toutefois d'une augmentation significative par rapport aux groupes témoins. Une dose plus élevée d'ET-1 nous permettrait probablement d'observer le développement de la pathologie par contre, la dose utilisée nous a permis de constater des altérations subtiles de la réactivité vasculaire pulmonaire qui autrement auraient été indécélables.

Nous avons démontré une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire à 7 jours alors que celle-ci est compensée après 28 jours. De plus, nous avons observé une diminution importante de la réponse maximale des artères du groupe ET-28jrs à des agonistes vasodilatateurs endothélium-dépendants et indépendants. Ces résultats démontrent une modification notable de la réactivité vasculaire pulmonaire caractérisée par une diminution de la réponse musculaire lisse au NO.

Ces données sont importantes puisqu'elles nous permettent de mieux comprendre les effets de l'hyperendothélinémie sur la réactivité vasculaire pulmonaire dans des pathologies liées à l'HTP mais aussi à celles qui ne lui sont pas classiquement associées. Ces connaissances nous permettront de développer des approches pharmacologiques optimales dans le traitement des pathologies où l'activation et l'implication du système endothéline joue un rôle déterminant.

## Remerciements

---

Tout d'abord, j'aimerais remercier mes deux directeurs de recherche : le Dr Normand Leblanc et le Dr Jocelyn Dupuis pour leur confiance, mais surtout pour leurs connaissances scientifiques qui ont largement contribué au succès de mes études graduées. Un grand merci également à Jean-François Jasmin pour ses nombreux conseils avisés ainsi que pour son savoir technique. Je tiens aussi à souligner la présence discrète, mais indispensable de Nathalie Ruel, sans qui les petits problèmes de tous les jours auraient semblé être des épreuves insurmontables. De plus, merci à Alexandre Caron pour son aide précieuse et son soutien lorsque la recherche devenait particulièrement exigeante. En terminant, je voudrais exprimer ma gratitude au Dr Éric Thorin qui a bien voulu me permettre d'utiliser ses myographes pour microvaisseaux et sans qui mes expériences auraient été impossibles.

À ma famille ainsi qu'à mes amis, merci!

## Références

---

1. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell. *Bioessays*. 1994;16:901-906.
2. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976;263:663-665.
3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
4. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *New York: Raven Press*. 1988;401-414.
5. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.
6. Greenberg B, Rhoden K, Barnes PJ. Endothelium-dependent relaxation of human pulmonary arteries. *American Journal of Physiology*. 1987;252:H434-H438.
7. De Mey JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *Journal of Physiology*. 1981;316:347-355.
8. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology*. 1981;248:C550-C556.
9. Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF, O'Brien RF. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1986;236:339-343.
10. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazake Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-415.

11. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AMeal. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*. 1999;401:282-286.
12. Maguire JJ, Davenport AP. Is urotensin-II the new endothelin? *British Journal of Pharmacology*. 2002;137:579-588.
13. Altieri RJ, Kiritsy-Roy JA, Catravas JD. Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: role of thromboxane A<sub>2</sub>. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1985;236:535-541.
14. Chand N, Altura BM. Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells: role in lung vascular disease. *Science*. 1981;213:1379.
15. Satoh H, Inui J. Endothelial cell-dependent relaxation and contraction by histamine in the isolated guinea-pig pulmonary artery. *European Journal of Pharmacology*. 1984;97:321-324.
16. Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1985;25:171-191.
17. Kharbanda RK, Deanfield JE. Functions of the healthy endothelium. *Coronary Artery Disease*. 2001;12:485-491.
18. Rubanyi G, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology*. 1986;250:H1145-H1149.
19. Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clinical cardiology*. 1997;20:II-3-10.
20. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*. 1993;329:2002-2012.
21. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-666.
22. Venema RC, Sayegh HS, Arnal JF, Harrison DG. Role of the enzyme calmodulin-binding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:14705-14711.
23. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of

- human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1992;307:287-293.
24. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry.* 1992;267:15274-15276.
  25. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990;347:768-770.
  26. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 1992;256:225-228.
  27. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from murine macrophage cell line. *Journal of Biological Chemistry.* 1992;267:6370-6373.
  28. Palmer RM, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology.* 1992;105:11-12.
  29. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:1251-1256.
  30. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989;2:997-1000.
  31. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation.* 1994;89:2040.
  32. Mulsch A, Busse R. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (N<sup>5</sup>-(imino(nitro-amino)methyl)-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilatations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 1990;341:143-147.
  33. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Pharmacology.* 1990;101:746-752.

34. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Nenderson A. The nature of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1984;308:645-647.
35. Ignarro LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Bloods Vessels*. 1991;28:67-73.
36. Blatter LA, Wier WG. Nitric oxide decrease ( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub> in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium*. 1994;15:122-131.
37. Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1994;91:7583-7587.
38. Lincoln TM, Cornwell TL, Taylor AE. cGMP-dependent protein kinase mediates reduction of  $Ca^{2+}$  by cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology*. 1990;258:C399-C407.
39. Yoshida Y, Toyosato A, Islam MO, Koga T, Fujita S, Imai S. Stimulation of plasma membrane  $Ca^{2+}$ -pump ATPase of vascular smooth muscle by cGMP-dependent protein kinase: Functional reconstitution with purified proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1999;190:157-167.
40. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994;368:850-853.
41. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;321:232-235.
42. Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat New Biol*. 1971;231:237-239.
43. Blair IA, Barrow SE, Wadell KA, et al. Prostacyclin is not a circulating hormone in man. *Prostaglandins*. 1982;23:579-589.
44. Wong PYK, Sun FF, McGiff JC. Metabolism of prostacyclin in blood vessels. *Journal of Biological Chemistry*. 1978;253:5555-5557.
45. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of pharmacology Classification of Prostanoid receptors: Properties, Distribution and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacology Review*. 1994;46:205.

46. Schillinger E, Losert WF. Identification of PGI<sub>2</sub> receptors and cAMP levels in platelets and femoral arteries. *Acta Ther.* 1980;6:37.
47. Higgs EA, Moncada S, Vane JR. Effects of prostacyclin on platelet adhesion to rabbit arterial subendothelium. *Prostaglandins.* 1978;16:17-22.
48. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *British Journal of Pharmacology.* 1987;92:181-187.
49. Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *Journal of Physiology.* 1984;351:549-572.
50. Feletou M, Vanhoutte PM. The alternative: EDHF. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1999;31:15-22.
51. Campbell WB, Harder DR. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circulation Research.* 1999;84:484-488.
52. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen MB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *American Journal of Physiology.* 1990;259:C3-C18.
53. Edwards G, et al. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998;396:269-272.
54. Petersson J, Zygmunt PM, Högestätt ED. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *British Journal of Pharmacology.* 1997;120:1344-1350.
55. Brayden JE. Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilatation. *American Journal of Physiology.* 1990;259:H668-H673.
56. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *Journal of Physiology.* 1994;481:407-414.
57. Randall MD, Alexander SPH, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229:114-120.

58. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Gariand GJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998;396:269-272.
59. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002;23:374-380.
60. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;192:553-560.
61. Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Sakata J, Eto T, Matsuo H. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201:1160-1166.
62. Nakamura M, Yoshida H, Makita S, Arakawa N, Niinuma H, Hiramori K. Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1997;95:1214-1221.
63. Hinson JP, Kapas S, Smith M. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrine Reviews*. 2000;21:138-167.
64. Lainchbury JG, Cooper GJ, Goy DH, Jiang NY, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Adrenomedullin: a hypotensive hormone in man. *Clinical Science*. 1997;92:467-472.
65. Khan AI, Kato J, Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Hypotensive effect of chronically infused adrenomedullin in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1997;24:139-142.
66. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca<sup>2+</sup> mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:4412-4417.
67. Nossaman BD, Feng CJ, Kaye AD, DeWitt B, Coy DH, Murphy WA, Kadowitz PJ. Pulmonary vasodilator responses to adrenomedullin are reduced by NOS inhibitors in rats but not in cats. *American Journal of Physiology*. 1996;270:L782-L789.
68. Hay DL, Smith DM. Adrenomedullin receptors: molecular identity and function. *Peptides*. 2001;22:1753-1763.



69. Kuwasako K, Kitamura K, Ito K, Uemura T, Yanagita Y, Kato J, Sakata T, Eto T. The seven amino acids of human RAMP2 (86) and RAMP3 (59) are critical for agonist binding to human adrenomedullin receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:49459-49465.
70. Pio R, Elsasser TH, Martinez A, Cuttitta F. Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma. *Microsc Res Tech*. 2002;57:23-27.
71. Nishikimi T, Matsuoka H, Shimada K, Matsuo H, Kangawa K. Production and clearance sites of two molecular forms of adrenomedullin in human plasma. *Hypertension*. 2000;13:1032-1034.
72. Nishikimi T, Nagata K, Sasaki T, Yoshihara F, Nagaya N, Horio T, Matsuo H, Matsuoka H, Kangawa K. The active molecular form of plasma adrenomedullin is extracted in the pulmonary circulation in patients with mitral stenosis: possible role of adrenomedullin in pulmonary hypertension. *Clinical Science*. 2001;100:61-66.
73. Sudoh T, Ninamino N, Kawagawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP) a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:863-870.
74. Suga S, Nakao K, Itoh H, et al. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor- $\beta$ . *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90:1145-1149.
75. Chun T-H, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, et al. Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomodullin. *Hypertension*. 1997;29:1296-1302.
76. Chen HH, Burnett JC. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic system. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1998;32 (Suppl. 3):S22-S28.
77. Porter JG, Catalano R, McEnroe G, Lewicki JA, Protter AA. C-type natriuretic peptide inhibits growth factor-dependent DNA synthesis in smooth muscle cells. *American Journal of Physiology*. 1992;263:C1001-C1006.
78. Furuya M, Aisaka K, Miyazaki T, Honbou N, Kawishina K, Ohno T, Tanaka S, Ninamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening after vascular injuru. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193:248-253.
79. Chinkers N, Garbers DL. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signalling. *Science*. 1989;245:1392-1394.

80. White RE, Lee AB, Scherbatko AD, Lincoln TM, Schonburnn A. Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent phosphorylation. *Nature*. 1993;361:263-266.
81. Wilkins MR, Needleman P. Effect of pharmacologic manipulation of endogenous atriopeptin activity on renal function. *American Journal of Physiology*. 1992;262:F161-F167.
82. Nusseinzveig DR, Lewicki J, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type-C receptors of atrial natriuretic factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:20952-20958.
83. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1975;72:2994-2998.
84. Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides. *Nature*. 1976;261:558-560.
85. Nusing RM, Hirata M, Kakizuka A, Eki T, Ozawa K, Narumiya S. Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A2 receptor gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:25253-25259.
86. Halushka PV, Allan CJ, Davis-Bruno KL. Thromboxane A2 receptors. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*. 1995;12:361-378.
87. Kinsella BT. Thromboxane A2 signalling in humans: a "tail" of two receptors. *Biochemical Society Transactions*. 2001;29:641-654.
88. Scornik FS, Toro L. U46619, a thromboxane A2 agonist, inhibits K+Ca channel activity from pig coronary artery. *American Journal of Physiology*. 1992;3:C708-C713.
89. Hanasaki K. Receptor-mediated mitogenic effect of thromboxane A2 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 1990;40:2535-2542.
90. Ali S, et al. Thromboxane A2 stimulates vascular smooth muscle hypertrophie by upregulating the synthesis and release of endogenous basic fibroblast growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:17397-17403.
91. Fitzgerald DJ, et al. Platelet activation in unstable coronary disease. *New England Journal of Medicine*. 1986;315:983-988.

92. Remuzzi G, et al. Thromboxane synthesis and action within the kidney. *Kidney Int.* 1992;41:1483-1493.
93. Abraham NG, Pinto A, Mullane KM, Leverette RD, Spokas EG. Presence of cytochrome P450 monooxygenase in intimal cells of dog aorta. *Hypertension.* 1985;7:899-904.
94. Lefer AM. Leukotrienes as mediators of ischaemia and shock. *Biochem Pharmacol.* 1986;35:123-127.
95. Kawaguchi H, Sawa H, Yasuda H. Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Hypertension.* 1991;9:171-174.
96. Chiu AT, Herblin WF, Ardecky RJ, et al. Identification of angiotensin II receptors subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165:196-203.
97. Bumpus FM. Nomenclature for angiotensin receptors. *Hypertension.* 1991;17:720.
98. Aldigier JC, Ghannad E. Exploration des récepteurs AT1 et AT2 de l'angiotensine II chez l'homme. *Drugs.* 2002;62:11-19.
99. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin receptors. *Pharmacological Review.* 2000;52:415-472.
100. Carey RM, Jin X-H, Siragy HM. Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *American Journal of Hypertension.* 2001;14:98S-102S.
101. Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal guanosine cyclic 3',5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. *Journal of Clinical Investigation.* 1996;97:1978-1982.
102. Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *Journal of Clinical Investigation.* 1997;100:264-269.
103. Bhoola KD, Figuerora AD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Review.* 1992;44:1-9.
104. Honing ML, Smits P, Morrison PJ, Rabelink TJ. Bradykinin-induced vasodilatation of human forearm resistance vessels is primarily

mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension*. 2000;95:1115-1118.

105. Ward PE, Erdos GE, Gedney CD, Dowben RM, Reynolds RC. Isolation of renal membranes that contain kallikrein, angiotensin I-converting enzyme (kininase II) and angiotensinase in the rat. *Clinical Science of Molecular Medicine*. 1976;3:267s-270s.
106. Horning B, Kohler C, Drexler H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*. 1997;95:1115-1118.
107. Rosen GM, Freeman BA. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1984;81:7269-7273.
108. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *Journal of Immunology*. 1986;137:3295-3298.
109. Hishikawa K, Lüscher TF. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 1997;96:3610-3616.
110. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:24173-24176.
111. Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 1990;258:C408-C415.
112. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasura S, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1989;86:2863-2867.
113. Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family: molecular cloning, expression and biological activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264:14613-14616.
114. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annual Review of Physiology*. 1999;61:391-415.

115. Battistini B, Dussault P. Biosynthesis, distribution and metabolism of endothelins in the pulmonary system. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 1998;11:79-88.
116. Kido T, Sawamura t, Hoshikawa H, D'Orleans-Juste P, Denault JB, et al. Processing of proendothelin-1 at the C-terminus of big endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 in vivo. *European Journal of Biochemistry*. 1997;244:520-526.
117. Ikegawa R, Matsumura Y, Tsukahara Y, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, supresses the secretion of endothelin-1 from cultured-cells by inhibiting a big endothelin-1 converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;171:669-675.
118. Kishi F, Minami K, Okishima N, Murakami M, Mori S, Yano M, Niwa Y, Nakaya Y, Kido H. Novel 31-amino-acid-length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248:387-390.
119. Hunley TE, Kon V. Uptade on endothelins-biology and clinical implications. *Pediatric Nephrology*. 2001;16:752-762.
120. Takahashi T, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K. Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:21394-21398.
121. Shimada K, Takahashi T, Tanzawa K. Cloning ans fonctionnal expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:18275-18278.
122. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *European Journal of Biochemistry*. 1999;264:341-349.
123. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaus S, DeWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*. 1994;78:473-485.
124. Davenport AP, Kuc RE, Plumpton C, Mockridge JW, Barker PJ, Huskisson NS. Endothelin-converting enzyme in human tissus. *Histochemical Journal*. 1998;30:359-374.
125. Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards J-B, Stumpf JG, Löffler BM. Human endothelin-converting

- enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochemical Journal*. 1997;328:871-877.
126. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;279:16262-16268.
  127. Russell FD, Davenport AP. Evidence for intracellular endothelin-converting enzyme (ECE-2) expression in human vascular endothelial cells. *Circulation Research*. 1999;84:891-896.
  128. Ikeda S, Emoto N, Alimsardjono H, Yokoyama M, Matsuo M. Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;293:421-426.
  129. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura t, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Letters*. 1998;428:304-308.
  130. Mateo AO, de Artinano AA. Highlights on endothelins: a review. *Pharmacological Research*. 1997;36:339-351.
  131. Battistini B, D'Orleans-Juste P, Sirois P. Biology of disease. Endothelins: circulating plasma levels and presence of other biologic fluids. *Lab Invest*. 1993;68:600-628.
  132. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1998;31:424-430.
  133. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules. A novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circulation Research*. 1998;83:314-321.
  134. Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *British Journal of Pharmacology*. 1999;126:391-398.
  135. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Metsärinne K, Tikkanen I, Rosenlöf K, Tikkanen T. Raised plasma endothelin-1 concentration following cold pressor test. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;169:217-221.

136. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:16066-16068.
137. Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *Hypertension*. 2002;10:1379-1386.
138. Shiba R, Yanagisawa M, Miyauchi T, et al. Elimination of intravenously injected endothelin-1 from the circulation of the rat. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1989;13:S98-S101.
139. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990;348:730-732.
140. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990;348:732-735.
141. Frank HJ, Levin ER, Hu RM, Pedram A. Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 1993;133:1092-1097.
142. Smith PJ, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Stewart DJ. Regulation of endothelin-B receptor mRNA expression in human endothelial cells by cytokines and growth factors. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1998;31:S158-S160.
143. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:19126-19133.
144. Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDHF. *British Journal of Pharmacology*. 1993;110:777-782.
145. Masaki T, Miwa S, Sawamura t, Ninomiya H, Okamoto Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *European Journal of Pharmacology*. 1999;375:133-138.
146. Iwamuro T, Miwa S, Zhang X-F, Komuro T, Minowa T, Masaki T. Activation of three types of voltage-independent Ca<sup>2+</sup>-entry channel in A7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca<sup>2+</sup>-entry

- channel blocker LOE 908. *British Journal of Pharmacology*. 1999;126:1107-1114.
147. Neylon CB. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1999;26:149-153.
  148. Boscoe MJ, Goodwin AT, Amrani M, Yacoub MH. Endothelins and the lung. *The International Journal of biochemistry and Cell Biology*. 2000;32:41-62.
  149. Naomi S, Iwaoka T, Disashi T, Inoue J, Kanesaka Y, Tokunaga H, Tomita K. Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation*. 1998;97:234-236.
  150. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptor in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994;199:1461-1465.
  151. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *Journal of Applied Physiology*. 1996;81:1510-1515.
  152. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*. 1996;94:1578-1584.
  153. Ivy DD, McMurtry IF, Yanagisawa M, Gariepy CE, Le Gras TD, Gebb SA, Morris KG, Wiseman RC, Abman SH. Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J of Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L1040-L1048.
  154. Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Altered expression of ETB-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1993;22:S336-S338.
  155. Hirata Y, Yoshimi H, Takaishi S, Yanagisawa M, Masaki T. Binding and receptor down regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*. 1988;239:13-17.
  156. Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Fukuroda T, Ishikawa K, Yano M. ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;209:483-489.



157. Lerman A, Sandok EK, Hildebrand FLJ, Burnett JCJ. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation*. 1992;85:1894-1898.
158. MacLean MR, McCulloch KM, Baird M. Endothelin ETA and ETB receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1994;23:838-845.
159. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, et al. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95:1747-1755.
160. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: The double-edged sword in health and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001;41:851-876.
161. Hocher B, Thöne-Reineke C, Bauer C, Raschack M, Neumayer HH. The paracrine endothelin system: pathology and implications in clinical medicine. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 1997;35:175-189.
162. Filep JG, Foldes-Filep E, Rousseau A, Sirois P, Fournier A. Vascular responses to endothelin-1 following inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rats. *British Journal of Pharmacology*. 1993;110:1213-1221.
163. Berti F, Rossoni G, Della Bella D, Villa LM, Buschi A, et al. Nitric oxide and prostacyclin influence coronary vasomotor tone in perfused rabbit heart and modulate endothelin-1 activity. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1993;22:321-326.
164. Bird JE, Waldron TL, Dorso CR, Asaad MM. Effects of endothelin receptor antagonist BQ-123 on initial and delayed vascular responses induced by ET-1 in conscious, normotensive rats. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1993;22:69-73.
165. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JCJ. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 1991;325:997-1001.
166. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature*. 1996;384:353-355.

167. Moravec CS, Reynolds EE, Stewart RW, Bond M. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;159:14-18.
168. Kannel WB, Sorlie P, McNamara PM. Prognosis after initial myocardial infarction: Framingham study. *American Journal of Cardiology*. 1979;44:53-59.
169. Zolk O, Quatteck J, Sitzler G, Schrader T, Nickenig G, et al. Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation*. 1999;99:2118-2123.
170. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet*. 1989;2:53-54.
171. Cody RG, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelly R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation*. 1992;85:504-509.
172. Grover GJ, Dzwonczyk S, Parham CS. The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduces the infarct size in canine model of coronary occlusion and reperfusion. *Cardiovascular Research*. 1993;27:1613-1618.
173. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 2000;102:2434-2440.
174. Barton M, Luscher TF. Endothelin antagonists for hypertension and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1999;8:549-556.
175. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: Effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*. 1996;96:1976-1982.
176. Wong-Dusting HK, La M, Rand MJ. Mechanism of the effects of endothelin on responses to noradrenaline and sympathetic nerve stimulation. *Experimental Pharmacology and Physiology*. 1990;17:269-273.
177. Boarder M, Marriott DB. Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1989;13:S223-S224.

178. Pernow J, Boutier JF, Franco-Cereceda A, Lacroix JS, Matran R, Lundberg JM. Potent selective vasoconstrictor effects of endothelin in the pig kidney *in vivo*. *Acta Physiol Scand*. 1988;134:573-574.
179. Terada Y, Tomita K, Nonogushi H, Marumo F. Different localization of two types of endothelin receptor mRNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90:107-112.
180. Rabelink TJ, Kaasjager KAH, Boer P, et al. Effects of endothelin-1 on renal function in humans: Implications for physiology and pathophysiology. *Kidney Int*. 1994;46:276-281.
181. Evans RG, Bergstrom G, Cotterill E, Anderson WP. Renal haemodynamic effects of endothelin-1 and the ETA/ETB antagonist TAK-044 in anaesthetized rabbits. *Journal of Hypertension*. 1992;16:1897-1905.
182. Tomita K, Ujiie K, Nakanashi T, Tomura S, Matsuda O, Ando K, Schichiri M, Hirata Y, Marumo F. Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *New England Journal of Medicine*. 1989;321:1127.
183. Orisio S, Benigni A, Bruzzi I, Corna D, Perico N, et al. Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Kidney Int*. 1993;43:354-358.
184. Nord EP. Renal actions of endothelin. *Kidney Int*. 1993;44:451-463.
185. Pollock DM. Renal endothelin in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000;9:157-164.
186. Gandhi CR, Stephenson K, Olson MS. Endothelin, a potent peptide agonist in the liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:17432-17435.
187. Oliver FJ, de la Rubia G, Feener EP, Lee ME, Loeken MR, Shiba T, Quertermous T, King GL. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266:23251-23256.
188. Hattori Y, Kasai K, Nakamura T, Emoto T, Shimoda S-I. Effect of glucose and insulin on immunoreactive endothelin-1 release from cultured porcine aortic endothelial cells. *Metabolism*. 1991;40:165-169.
189. Piatti PM, Monti LD, Conti M, Baruffaldi L, Galli L, Phan CV, Guazzini B, Pontiroli AE, Pozza G. Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia

- are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes*. 1996;45:316-321.
190. Katakam PV, Pollock JS, Pollock DM, Ujhelyi MR, Miller AW. Enhanced endothelin-1 response and receptor expression in small mesenteric arteries of insulin-resistant rats. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280:H522-H527.
  191. Hopfner RL, Hasnadka RV, Wilson TW, McNeill JR, Gopalakrishnan V. Insulin increases endothelin-1-evoked intracellular free calcium responses by increased ETA receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. *Diabetes*. 1998;47:937-944.
  192. Moller S, Gulberg V, Henriksen JH, Gerbes AL. Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics. *Journal of Hepatology*. 1995;23:135-144.
  193. Heneghan MA, Harrison PM. Pathogenesis of ascites in cirrhosis and portal hypertension. *Med Sci Monit*. 2000;6:807-816.
  194. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;164:74-80.
  195. Kuwaki T, Kurihara H, Cao WH, Kurihara Y, Unekawa M, et al. Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Progress in Neurobiology*. 1997;51:549-579.
  196. Fujimori A, Yanagisawa M, Saito A, Goto K, Masaki T. Endothelin in plasma and cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. *Lancet*. 1990;336:633.
  197. Adamicza A, Petak F, Asztalos T, Hantos Z. Effects of endothelin-1 on airway and parenchymal mechanics in guinea-pigs. *European Journal of Respiratory*. 1999;13:767-774.
  198. Hay DWP, Hubbard WC, Udem BJ. Endothelin-induced contraction and mediator release in human bronchus. *British Journal of Pharmacology*. 1993;110:392-398.
  199. Redington AE, Springall DR, Ghatei MA, Lau LC, Bloom SR, Holgate ST, Polak JM, Howarth PH. Endothelin in bronchoalveolar lavage fluid and its relation to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1034-1039.

200. Brewster CEP, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subendothelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3:507-511.
201. Weitzberg E, Ahlborg G, Lundberg JM. Differences in vascular effects and removal of endothelin-1 in human lung, brain and skeletal muscle. *Clinical Physiology*. 1993;13:653-662.
202. Cooper CJ, Landzberg MJ, Anderson TJ, Charbonneau TF, Creager MA, Ganz P, Selwyn AP. Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance in humans. *Circulation*. 1996;93:266-271.
203. Dupuis J, Jasmin J-F, Prié S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and the ETB receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2000;13:135-140.
204. Oparil S, Chen YF. Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2000;320:223-232.
205. McCulloch AI, Docherty C, Morecroft I, MacLean MR. Endothelin B receptor-mediated contraction in human pulmonary resistance arteries. *British Journal of Pharmacology*. 1996;119:1125-1130.
206. Staub NC. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest*. 1985;88:240-245s.
207. Leach RM, Twort CHC, Cameron IR, Ward JPT. A comparison of contractile function in large and small pulmonary arterial vessels of the rat. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1989;74:947-950.
208. Leach RM, Twort CHC, Cameron IR, Ward JPT. A comparison of the pharmacological and mechanical properties in vitro of large and small pulmonary arteries of the rat. *Clinical Science*. 1992;82:55-62.
209. Kemp BA, Smolich JJ, Cocks TM. Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and veins. *British Journal of Pharmacology*. 1997;121:441-450.
210. Euler US, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand*. 1946;12:301-320.
211. Ward JPT, Robertson TP. The role of the endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Experimental Physiology*. 1995;80:793-801.

212. Yuan X, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *American Journal of Physiology*. 1993;264:L116-L123.
213. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American Journal of Physiology*. 1992;262:C882-C890.
214. Ward JPT, Aaronson PI. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right? *Respiration Physiology*. 1999;115:261-271.
215. Archer SL, Huang JMC, Reeve HL, Hampl V, Tolarova S, Michelakis E, Weir EK. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circulation Research*. 1996;78:431-442.
216. Sato K, Morio Y, Morris KG, Rodman DM, McMurtry IF. Mechanism of pulmonary vasoconstriction involves ETA receptor-mediated inhibition of KATP channel. *Am J of Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278:L434-L442.
217. Voelkel NF, Tuder RM. Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 1997;10:231-241.
218. Dumas JP, Bardou M, Goirand F, Dumas M. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *General Pharmacology*. 1999;33:289-297.
219. Weir EK, Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB Journal*. 1995;9:183-189.
220. Leach RM, Robertson TP, Twort CHC, Ward JPT. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *American Journal of Physiology*. 1994;266:L223-L231.
221. Heath D, Smith P, Gosney J, Mulcahy D, Fox K, et al. The pathology of the early and late stages of primary pulmonary hypertension. *British Heart Journal*. 1987;58:204-213.
222. Rich S. Primary pulmonary hypertension: Executive Summary from the World Symposium on Primary Pulmonary Hypertension 1998. *World Health Organization 1998*. 1998;available via Internet <http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html>.

223. Cernacek P, Stewart DJ. Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;161:562-567.
224. Yoshibayashi M, Nishioka K, Nakao K, Saito Y, Matsumura M, et al. Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects: evidence for increased production of endothelin in pulmonary. *Circulation*. 1991;84:2280-2285.
225. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib M, Kimura S, Masaki T, Duguid W, Stewart DJ. Expression of endothelin in lungs of patients with pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1993;328:1732-1739.
226. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1995;333:214-221.
227. Rashid A, Lehrman S, Romano P, Frishman W, Dobkin J, Reichel J. Primary pulmonary hypertension. *Heart Disease*. 2000;2:422-430.
228. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Annals of Internal Medicine*. 1991;114:464-469.
229. Adatia I. Recent advances in pulmonary vascular disease. *Current Opinion in Pediatrics*. 2002;14:292-297.
230. Nichols WC, Koller DL, Slovis B, et al. Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nat Genet*. 1997;15:277-280.
231. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (Gene PPH1) is caused by mutation in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:737-744.
232. Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *New England Journal of Medicine*. 1996;335:609-616.
233. Margulies KB, Hildebrand Jr FL, Lerman A, et al. Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation*. 1990;82:2226-2230.

234. Ergul A, Grubbs A, Zhang Y, Joffs C, Sample JA, King MK, Spinale FG. Expression and activity of pulmonary endothelin converting enzyme in heart failure: relation to endothelin biosynthesis and receptor distribution. *Journal of Cardiac Failure*. 2001;7:84-91.
235. Turner AJ, Barnes K, Schweizer A, Valdenaire O. Isoforms of endothelin converting enzyme: Why and Where? *Trends in Pharmacological Sciences*. 1998;19:483-486.
236. Ferri C, Bellini C, DeAngelis C, DeSiati L, Perrone A, Properzi G, Santucci A. Circulating endothelin-1 concentrations in patients with chronic hypoxia. *Journal of Clinical Pathology*. 1995;48:519-524.
237. Chen Y, Oparil S. Endothelin and pulmonary hypertension. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 2000;35(Suppl.2):S49-S53.
238. Shi W, Cernacek P, Hu F, Michel RP. Endothelin reactivity and receptor profile of pulmonary vessels in postobstructive pulmonary vasculopathy. *American Journal of Physiology*. 1997;273:H2558-H2564.
239. Michael JR, Markewitz BA. Endothelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:555-581.
240. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation Research*. 1993;73:887-897.
241. Fullerton DA, Hahn AR, McIntyre Jr RC. Mechanistic imbalance of pulmonary vasomotor control in progressive lung injury. *Surgery*. 1996;119:98-103.
242. Meyrick B, Gamble W, Reid L. Developpement of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *American Journal of Physiology*. 1980;239:H692-H702.
243. Driss AB, Devaux C, Henrion D, Duriez M, Thuillez C, Levy BI, Michel J-B. Hemodynamic stresses induce endothelial dysfunction and remodeling of pulmonary artery in experimental compensated heart failure. *Circulation*. 2000;101:2764-2770.
244. Nguyen QT, Cernacek P, Calderoni A, Stewart DJ, Picard P, Sirois P, White M, Rouleau JL. Endothelin A receptor blockade causes adverse left ventricular remodeling but improves pulmonary artery pressure after infarction in the rat. *Circulation*. 1998;98:2323-2330.



245. Emery CJ, Bee D, Barer GR. Mechanical properties and reactivity of vessels in isolated perfused lungs of chronically hypoxic rats. *Clinical Science*. 1981;61:569-580.
246. Li H, Chen SJ, Cheng Q, Durand J, Oparil S, Elton TS. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology*. 1994;77:1452-1459.
247. DiCarlo VS, Chen SJ, Meng QC, Durand J, Yano M, Chen YF, Oparil S. ETA-receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. *American Journal of Physiology*. 1995;269:L690-L697.
248. McCulloch KM, Docherty C, MacLean MR. Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 1998;123:1621-1620.
249. Klings ES, Farber HW. Current management of primary pulmonary hypertension. *Drugs*. 2001;61:1945-1956.
250. Rich S, Brundage BH. High-dose calcium channel-blocking therapy for primary pulmonary hypertension: evidence of long-term reduction in pulmonary arterial pressure and regression of right ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1987;76:135-141.
251. Feron O, Salomone S, Godfraind T. Action of the calcium channel blocker lacipidine on cardiac hypertrophy and endothelin-1 gene expression in stroke-prone hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*. 1996;118:659-664.
252. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1992;327:76-81.
253. Peacock AJ. Primary pulmonary hypertension. *Thorax*. 1999;54:1107-1118.
254. Iwamoto J, Morin FC. Nitric oxide inhibition varies with hemoglobin saturation. *Journal of Applied Physiology*. 1993;75:2332-2336.
255. Sitbon O, Brenot F, Denjean A, et al. Inhaled nitric oxide as a screening vasodilator agent in primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:384-389.
256. Zhao L, Mason NA, Morrel LW, et al. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;104:424-428.

257. Prasad F, Wilkinson J, Gatzoulis MA. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2000;343:1342-1343.
258. Rubin LJ, Groves BM, Reeves JT, et al. Prostacyclin induces acute pulmonary vasodilatation in primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1982;66:334-338.
259. Higgenbottam T, Wheeldon D, Wells F. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol. *Lancet*. 1984;46-47.
260. Fishman AP. Epoprostenolol (prostacyclin) and pulmonary hypertension [editorial]. *Annals of Internal Medicine*. 2000;132:50002.
261. Rabinovitch M. Pathology of pulmonary hypertension. *Clinics in Chest Medicine*. 2001;22:433-449.
262. Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *American Journal of Cardiology*. 1995;75:3A-10A.
263. Hoepfer MM, Schwarze M, Ehlerding S, et al. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *New England Journal of Medicine*. 2000;342:1866-1870.
264. Saji T, Ozawa Y, Ishikita T. Short term effect of a new PGI<sub>2</sub> analogue, beraprost, in primary and secondary pulmonary hypertension. *American Journal of Cardiology*. 1996;78:244-247.
265. Vizza CD, Sciomer S, Morelli S, et al. Long term treatment of pulmonary arterial hypertension with beraprost, an oral prostacyclin analogue. *Heart*. 2001;86:661-665.
266. Archer SL, Rich S. Primary pulmonary hypertension. A vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation*. 2000;102:2781-2791.
267. Kirshbom PM, Tsui SS, Dibernardo LR, Meliones JN, Schwinn DA, Ungerleider RM, Gaynor JW. Blockade of endothelin-converting enzyme reduces pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Surgery*. 1995;118:440-445.
268. Wypij DM, Nichols JS, Novak PJ, Stacy L, Berman J, Wiseman JS. Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem Pharmacol*. 1992;43:845-853.

269. Ikeda K, Emoto N, Raharjo SB, Nurhantari Y, Saiki K, Yokoyama M, Matsuo M. Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which a variety of vasoactive peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:32469-32477.
270. Takahashi T, Kanda T, Inoue M, Sumino H, Kobayashi I, Iwamoto A, Nagai R. Endothelin converting enzyme inhibitor protects development of right ventricular overload and medial thickening of pulmonary arteries in rat with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Life Science*. 1998;63:L137-L143.
271. Williamson DJ, Wallman LL, Jones R, Keogh AM, Scroope F, Penny R, Weber C, Macdonald PS. Hemodynamic effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2000;102:411-418.
272. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 2001;358:1119-1123.
273. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galiè N, Black CM, Keogh AM, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg MJ, Simonneau G, for the Bosentan Randomized Trial of Endothelin Antagonist Therapy Study Group. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2002;346:896-903.
274. Torre-Amione G, Young JB, Durand J-B, Bozkurt B, Mann DL, Kobrin I, Pratt CM. Hemodynamic effects of tezosentan, an intravenous dual endothelin receptor antagonist, in patient with class III to IV congestive heart failure. *Circulation*. 2001;103:973-980.
275. Barst RJ, Rich S, Horn EM, et al. Efficacy and safety of chronic treatment with the oral selective endothelin-A receptor blocker sitaxsentan in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2000;102:II-716.
276. Barst RJ, Rich S, Widlitz A, Horn EM, McLaughlin V, McFarlin J. Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2002;121:1860-1868.
277. Jasmin J-F, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;103:314-318.

278. Rich S, McLaughlin VV. Lung transplantation for pulmonary hypertension: patient selection and maintenance therapy while awaiting transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;10:135-138.
279. Graham R, Skoog C, Oppenheimer L, Rabson J, Golberg HS. Critical closure in the canine pulmonary vasculature. *Circulation Research*. 1982;50:566-572.
280. Mitzner W, Huang I. Interpretation of pressure-flow curves in the pulmonary vascular bed. In: The pulmonary circulation in health and disease. Will JA, Dawson CA, Weir EK, Buckner CK, eds. 1987. Academic Press, Inc., Orlando.
281. Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature*. 1976;260:617-619.
282. Bevan JA, Osher JV. A direct method for recording tension changes in the wall of small blood vessels in vitro. *Agents Actions*. 1972;2:257-260.
283. Nilsson H, Sjöblom N. Distension-dependent changes in noradrenaline sensitivity in small arteries from the rat. *Acta Physiol Scand*. 1985;125:429-435.
284. Thorin E, Cernacek P, Dupuis J. Endothelin-1 regulates tone of isolated small arteries in the rat. Effect of hyperendothelinemia. *Hypertension*. 1998;31:1035-1041.
285. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Cardiovascular Research*. 1977;1:19-26.
286. Takahashi K, Ghatei MA, Lam H-C, O'Halloran DJ, Bloom SR. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1990;33:306-310.
287. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *Journal of American College of Cardiology*. 1991;18:38-43.
288. Lerman A, Kubo SH, Tschumperlin LK, Burnett JC. Plasma endothelin concentration in human with end-stage heart failure and following cardiac transplantation. *Journal of American College of Cardiology*. 1992;20:849-853.

289. Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Riquet M, Noe E, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I. Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research*. 1997;33:196-200.
290. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, et al. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*. 1992;85:1374-1379.
291. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul*. 1990;9:649-659.
292. Saito S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Autocrine regulation of endothelin-1 gene in rat endothelial cells. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1995;26:S84-S87.
293. Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:6997-7003.
294. Sanchez R, MacKenzie A, Farhat N, Nguyen T-D, Stewart DJ, Mercier I, Calderoni A, Thorin E. Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine aorta endothelial cell. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 2002;39:652-659.
295. Asada S, Kasuya Y, Sakurai T, Masaki T, Goto K. Endothelin-1-induced downregulation of ETB receptor mRNA: participation of cAMP. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1995;26:S272-S275.
296. Brehm BR, Heinle H, Risler T, Wolf SC. Chronically elevated endothelin-1 concentrations modulate the *b*-adrenergic receptor system in vitro and in vivo. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 2000;36:S157-S159.
297. Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Norota I. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca<sup>2+</sup> transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Science*. 1998;62:1485-1489.
298. Dupuis J, Prié S. The ETA-receptor antagonist LU135252 prevents the progression of established pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut*. 1999;4:1-8.
299. Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein E, Berry C, Richardson M, MacLean MR. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280:H925-H928.

300. Xue C, Johns RA. Upregulation of nitric oxide synthase correlates temporally with onset of pulmonary vascular remodelling in the hypoxic rat. *Hypertension*. 1996;28:743-753.
301. Resta TC, Gonzales RJ, Dail WG, Sanders TC, Walker BR. Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology*. 1997;272:H806-H813.
302. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, Hirata K-I, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodelling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension*. 2001;37:322-327.
303. Masahiko O. Phosphodiesterase 5 inhibition restores impaired ACh relaxation in hypertensive conduit pulmonary artery. *Am J of Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L432-L435.
304. LeGras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J of Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1996;270:L164-L170.
305. Xue C, Rengasamy A, LeGras TD, Koberna PA, Dailey GC, Johns RA. Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J of Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1994;267:L667-L678.
306. Wanstall JC, Hughes IE, O'Donnell SR. Reduced relaxant potency of nitroprusside on pulmonary artery preparations taken from rats during the development of hypoxic pulmonary hypertension. *British Journal of Pharmacology*. 1992;107:407-413.
307. Crawley DE, Zhao L, Giembycz MA, Liu SF, Barnes PJ, Winter RJD, Evans TW. Chronic hypoxia impairs soluble guanylyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in rat. *Am J of Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1992;263:L325-L332.
308. Scott WS, Nakayama DK. Sustained nitric oxide exposure decreases soluble guanylate cyclase mRNA and enzyme activity in pulmonary artery smooth muscle. *Journal of Surgical Research*. 1998;79:66-70.
309. Gilbert P, Tremblay J, Thorin E. Endothelium-derived endothelin-1 reduces cerebral artery sensitivity to nitric oxide by a protein kinase C-independent pathway. *Stroke*. 2001;32:2351-2355.
310. Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme H-J, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:713-717.

311. Mohazzab HKM, Kaminski PM, Wolin MS. Oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary endothelium. *American Journal of Physiology*. 1994;266:H2568-H2572.
312. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320:454-456.
313. Wanstall JC, Kaye JA, Gambino A. The *in vitro* pulmonary vascular effects of FK409 (nitric oxide donor): a study in normotensive and pulmonary hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*. 1997;121:280-286.
314. Rubanyi G, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology*. 1986;250:H822-H827.
315. Reynolds EE, Mok LL. Role of thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1990;252:915-921.
316. Filep JG, Battistini B, Sirois P. Endothelin induces thromboxane release and contraction of isolated guinea-pig airways. *Life Science*. 1990;47:1845-1850.
317. Del Bassio P, Argiolas L. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in the guinea pig: role of thromboxane A<sub>2</sub>. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1995;26:S120-S122.
318. Takayasu-Okishio M, Terashita Z, Kondo K. Endothelin-1 and platelet activating factor stimulate thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 1990;40:2713-2717.
319. Plante M, Honore JC, Neugebauer W, D'Orleans-Juste P. Endothelin-1 (1-31) induces a thiorphan-sensitive release of eicosanoids via ETB receptors in the guinea pig perfused lung. *Clinical Science*. 2002;103:128S-131S.
320. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF. Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *Journal of Cellular Physiology*. 1994;158:485-494.
321. Kuc RE, Davenport AP. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptive response to increased levels of endothelin-1? *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 2000;36:S377-S379.

322. Télémaque-Potts S, Kuc RE, Maguire JJ, Ohlstein E, Yanagisawa M, Davenport AP. Elevated systemic levels of endothelin-1 and blood pressure correlate with blunted constrictor responses and downregulation of endothelin-A, but not endothelin-B, receptors in animal model of hypertension. *Clinical Science*. 2002;103:357S-362S.
323. Yu JC, Davenport AP. Regulation of endothelin receptor expression in vascular smooth-muscle cells. *Journal of Cardiovascular pharmacology*. 1995;26:S348-S350.