

Université de Montréal

**Caractérisation des mécanismes impliqués dans la  
vasoréactivité pulmonaire à l'endothéline-1**

Par  
Stéphanie Sauvageau

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 (M. Sc) en physiologie

Septembre 2005





## 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.

---

Ce mémoire intitulé:  
**Caractérisation des mécanismes impliqués dans la  
vasoréactivité pulmonaire à l'endothéline-1**

présenté par Stéphanie Sauvageau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jocelyn Dupuis, directeur de recherche  
-Dr Éric Thorin, co-directeur de recherche  
-Dr Rémy Sauvé, président-rapporteur  
-Dr Pierre Moreau, membre de jury

---

## Résumé (français)

Le rôle de l'endothélium et des récepteurs à l'endothéline-1 dans la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 est un sujet de débat important. En effet, le récepteur ET<sub>B</sub> exerce une double fonction : il peut induire soit une vasodilatation (en stimulant la libération de monoxyde d'azote et de la prostacycline) soit une vasoconstriction (en stimulant la libération de thromboxane A<sub>2</sub>). En situation d'insuffisance cardiaque chronique (ICC), les niveaux circulants de ce peptide sont augmentés et ils corrént avec la sévérité de l'hypertension pulmonaire (HTP). Cependant, aucune étude n'a évalué les conséquences d'un infarctus du myocarde sur la réponse induite par l'ET-1. Nous avons effectué des expériences sur le poumon isolé de rat ainsi que sur des artères pulmonaire *in vitro*, en situation contrôle (Sham) et en condition d'ICC induite par ligature de l'artère coronaire descendante antérieure. Dans le poumon isolé, l'ET-1 et la sarafotoxine 6c (S6c) ont augmenté la pression de perfusion de façon similaire. L'utilisation d'un inhibiteur de la cyclooxygénase (méclofénamate) ou d'un antagoniste ET<sub>A</sub> (A-147627.1) a partiellement réduit la vasoconstriction induite par l'ET-1 alors que l'utilisation d'un inhibiteur de la lipooxygénase (A-85761.0) ou d'un antagoniste ET<sub>B</sub> (A-192621.1) n'a eu aucun effet. L'antagoniste mixte ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> bosentan a quant à lui presque totalement antagonisé la réponse à l'ET-1. Dans les artères pulmonaires isolées contrôles, la S6c et l'ET-1 ont induit des réponses similaires qui n'ont toutefois pas été modifiées par la dénudation de l'endothélium des artères. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une coopérativité des récepteurs. À des concentrations à la limite de l'efficacité pharmacologique, les antagonistes ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> n'ont eu aucun effet. En revanche, l'utilisation combinée des deux antagonistes a complètement inhibé la réponse induite par l'ET-1. Ces résultats nous ont conduit à

---

envisager la possibilité d'une hétérodimérisation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> au niveau des artères de résistance isolées qui a été confirmée par co-immucoprécipitation. Les conséquences d'un infarctus du myocarde sur la réactivité vasculaire pulmonaire ont aussi été étudiées. Les vasoconstrictions induites par l'ET-1 étaient similaires dans les groupes Sham et ICC. En revanche, la vasoconstriction induite par la S6c était réduite dans les deux groupes comparativement à celle induite par l'ET-1. L'utilisation d'un antagoniste ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> seul n'a eu aucun effet sur la vasoconstriction pulmonaire alors que l'utilisation combinée des deux antagonistes a fortement réduit cette réponse. En conclusion, la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 semble être modulée par les prostanoïdes au niveau du poumon isolé. Le récepteur ET<sub>A</sub> semble être majoritairement responsable de la vasoconstriction induite par l'ET-1. Toutefois, l'utilisation d'un antagoniste double procure une inhibition supérieure de cette réponse. Au niveau des artères de résistance, les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sont responsables de la vasoconstriction induite par l'ET-1. De plus, cette réponse ne semble pas être modulée par l'endothélium. La dimérisation des récepteurs suggère d'utiliser un antagoniste double pour une inhibition optimale de la réponse induite par ET-1, en condition contrôle ou dans le cadre de l'ICC. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 permettrait de choisir le traitement optimal pour les patients souffrant d'HTP.

Mots clés : Endothéline-1, endothélium, récepteurs vasculaires, poumon, pharmacologie, insuffisance cardiaque, hypertension pulmonaire

---

## Résumé (anglais)

The roles of the endothelium and of endothelin (ET) receptors (R) on ET-1-induced pulmonary vasoreactivity are subjects of debate. This stems from endothelial ET<sub>B</sub>-R that can induce the release of vasodilators (nitric oxide and prostacyclin) as well as a vasoconstrictor (tromboxane A<sub>2</sub>). Moreover, ET levels are elevated in congestive heart failure (CHF) and correlate with the severity of pulmonary hypertension (PH), suggesting that this peptide could contribute to the pathophysiology of venous PH. Alterations of pulmonary vasoreactivity to ET in CHF and the respective roles of the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors have never been evaluated. Pharmacological experiments were performed in isolated rat lungs and in resistance pulmonary arteries of control and CHF rats. In isolated lungs, ET-1 and sarafotoxin S6c induced similar vasoconstrictions. ET-1 constriction was partially antagonized by the use of cyclooxygenase inhibitor (meclofenamic acid) or an ET<sub>A</sub> R antagonist (A-147627.1) whereas lipoxygenase inhibition (A-85761.0) or ET<sub>B</sub> R blockade (A-192621.1) had no effect. A dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> antagonist almost completely suppressed the response. In control isolated arteries, responses to ET-1 and S6c were not different and remained unaffected by removal of endothelium. Both ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R antagonists mildly reduced ET-1 vasoconstriction, but the combination of both greatly reduced it. The dimerization of the endothelin receptors could partially explain these results. Dimerization of the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor was confirmed by co-immunoprecipitation studies. The consequence of a myocardial infarction on the pulmonary vasoreactivity to ET-1 was also evaluated. The maximal vasoconstriction and sensitivity induced by ET-1 were similar in sham and CHF groups. However, the response to S6c was reduced in both sham and CHF groups. The ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> antagonists alone had no

---

significant effect. However, the combination of both antagonists significantly reduced ET-1 induced vasoconstriction. In conclusion, the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction of the isolated lungs is modulated by prostanoids metabolites. Most of the ET-1 response in isolated lungs is induced by the ET<sub>A</sub> receptor however, the use of a dual antagonist is necessary for superior inhibition of the ET-1 response. In isolated arteries, the ET-1 induced vasoconstriction is mediated by the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor with no modulator role of the endothelium. The dimerization of the receptors in both the control and ICC groups could partially explain the necessity to use both antagonists to completely suppress the ET-1 response. A better comprehension of the ET-1 system could determine the optimal treatment for patients suffering from PH.

**Key words.** Endothelin, Endothelium, Receptors, Lung, Pharmacology, chronic heart failure, pulmonary hypertension



---

## Table des matières

Résumé (français).....	iii
Résumé (anglais) .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des Figures.....	ix
Liste des Tables .....	xi
Liste des Abréviations.....	xii
1.0 Introduction .....	1
1.1 Endothélium vasculaire .....	1
1.1.1 Biologie de l'endothélium.....	1
1.1.2 Structure et fonctions des vaisseaux sanguins.....	2
1.1.3 Agents Vasodilatateurs.....	4
1.1.3.1 Monoxyde d'azote (NO) .....	4
1.1.3.2 Prostacycline (PGI <sub>2</sub> ).....	6
1.1.3.3 Facteur Hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF).....	7
1.1.4 Agents Vasoconstricteurs .....	8
1.1.4.1 Thromboxane A <sub>2</sub> (TxA <sub>2</sub> ) .....	8
1.1.4.2 Endothéline-1 (ET-1) .....	10
1.2 Endothéline.....	11
1.2.1 Rôles physiologiques de l'endothéline-1 .....	12
1.2.2 Biosynthèse et dégradation.....	14
1.2.3 Clairance de l'endothéline-1 .....	16
1.2.4 Sécrétion de l'endothéline-1.....	17
1.2.5 Récepteurs vasculaires à l'ET-1 .....	19
1.2.5.1 Dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	21
1.2.6 Voies de signalisation intracellulaire .....	25
1.3 La circulation pulmonaire .....	27
1.4 Endothélines et pathologies.....	30
1.4.1 Défaillance cardiaque et insuffisance cardiaque chronique (ICC).....	31
1.4.2 Hypertension pulmonaire associée à une pathologie cardiaque gauche (HTP) ..	34
1.5 Traitements actuels de l'HTP .....	35
1.6 Justification de l'étude .....	36
2.0 Matériels et méthode .....	38

---

2.1 Modèles animaux .....	38
2.2 Préparation des poumons isolés .....	38
2.3 Préparation des artères de résistance .....	40
2.4 Co-immunoprécipitation et western blot.....	41
2.5 Infarctus du myocarde .....	43
2.6 Immunofluorescence confocale.....	44
2.6.1 Microscopie confocale, déconvolution et quantification de la fluorescence .....	45
2.7 Composés utilisés .....	46
2.8 Évaluations statistiques .....	46
2.9 Ethique .....	47
3.0 Articles .....	48
3.1 Accord des co-auteurs .....	48
3.2 Article #1: ET-1 Induced Pulmonary Vasoreactivity: Importance of ET <sub>A</sub> and ET <sub>B</sub> Receptors Oligomerization?.....	49
3.3 Accord des co-auteurs .....	84
3.4 Article #2: Evaluation of ET-1 induced pulmonary vasoconstriction following a myocardial infarction .....	85
4.0 Discussion .....	108
4.1 Rôle de l'endothélium et des récepteurs ET <sub>A</sub> et ET <sub>B</sub> dans la vasoconstriction pulmonaire dépendante de l'ET-1 .....	108
4.2 Modification de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 suite à un infarctus du myocarde .....	116
5.0 Conclusion.....	118
6.0 Remerciement.....	119
7.0 Bibliographie.....	121

---

## Liste des Figures

**Figure 1** : Sécrétion et mécanismes des substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium

**Figure 2** : La séquence d'acides aminés des trois isoformes de l'endothéline

**Figure 3** : Les agents qui régulent la production et l'action de l'endothéline-1

**Figure 4** : Biologie du système endothéline et ses récepteurs au niveau de l'endothélium et la cellule musculaire lisse.

**Figure 5** : Les divers scénarios quant à l'assemblage et la maturation des dimères des récepteurs couplés aux protéines G.

**Figure 6** : Mécanisme de la contraction induite par l'ET-1.

**Figure 7** : Circulation pulmonaire et systémique.

**Figure 8** : Les rôles pathologiques de l'endothéline-1.

**Figure 9** : Principaux évènements dans la progression de la défaillance cardiaque.

**Figure 10** : La dysfonction endothéliale.

### Figures de l'article #1

Figure 1. Vasoconstriction pulmonaire induite par l'endothéline-1 (ET-1) et la sarafotoxine 6c (S6c) au niveau de poumon isolé. MEC (méclofénamate); LOX, (inhibiteur de la lipoxigénase); ant (antagoniste); Bos (Bosentan, antagoniste double des récepteurs à l'ET-1); SQ 29 548 (antagoniste des récepteurs TxA<sub>2</sub>/ prostaglandine H<sub>2</sub>): n=6-8/groupe. \* $P < 0.001$ , † $P < 0.01$ , ‡ $P < 0.05$  versus la courbe à l'ET-1 pour le graphique A, et versus la courbe contrôle pour les graphiques B, C et D. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

Figure 2. A) Effet des antagonistes sélectifs ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> et non-sélectifs sur la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1. B) Effet induit par l'ET-1 et la S6c ainsi que divers antagonistes sur le développement de l'oedème pulmonaire mesuré par le ratio poids sec/poids humide.

Figure 3. Effet de la stimulation du récepteur ET<sub>B</sub> par l'ET-1 en condition de tonus vasculaire augmenté et en présence d'un antagoniste ET<sub>A</sub> (10 nM).

Figure 4. Vasoconstriction des artères de résistance pulmonaire induite par l'ET-1 (graphique A) et la S6c (graphique B) en présence (endo+) et en absence (endo-) de l'endothélium vasculaire. Graphique C: Vasoconstriction pulmonaire induite par la

---

S6c en présence d'un inhibiteur de la lipoxigénase (Lox) et de la cyclooxygénase (Mec).

Figure 5. Vasoconstriction des artères de résistance pulmonaire induite par l'ET-1 en présence de concentrations croissantes des antagonistes sélectifs ET<sub>A</sub> (graphique A) et ET<sub>B</sub> (graphique B).

Figure 6. Vasoconstriction des artères de résistance pulmonaire induite par l'ET-1 en présence d'une combinaison des antagonistes ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>.

Figure 7. Co-immunoprécipitation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> en condition dénaturante. L'immunobuvardage de type western a été fait suite à l'immunoprécipitation des récepteurs ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>. La préparation de cellules endothéliales a été utilisée comme contrôle négatif.

Figure 8. Co-immunoprécipitation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> en condition non-dénaturante. L'immunobuvardage de type western pour l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> a été fait suite à l'immunoprécipitation du récepteur ET<sub>B</sub> au niveau des artères de résistance pulmonaire (ligne de droite) et des cellules endothéliales (ligne de gauche). Les deux lignes de droite: afin de vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation du récepteur ET<sub>B</sub> nous avons lavé la membrane avec du NaOH (1M) pour ensuite l'incuber avec un anticorps ET<sub>B</sub>. La présence du récepteur ET<sub>B</sub> dans les cellules endothéliales (ligne de gauche, contrôle positif) et dans les artères de résistance pulmonaire (ligne de droite) a été confirmée.

## Figures de l'article #2

Figure 1. Vasoconstriction des artères de résistance pulmonaire induite par l'ET-1 et la S6c. A. Courbe dose-réponse à l'ET-1 du groupe sham (triangles solides, n=6) et MI (carrés solides, n=25). B. Courbe dose-réponse à la S6c dans le groupe Sham (carrés solides, n=6) et MI (triangles solides, n=19).

Figure 2. Vasoconstriction des artères de résistance pulmonaire induite par l'ET-1. A. Préparation Sham. Vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 en présence de 10 nM de l'antagoniste ET<sub>A</sub> (triangles solides, n=6), 1 µM de l'antagoniste ET<sub>B</sub> (triangles inversés, n=6) et en présence des deux antagonistes (losanges solides, n=6). B. Préparation MI. Vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 en présence de 10 nM de l'antagoniste ET<sub>A</sub> (triangles solides, n=21), 1 µM de l'antagoniste ET<sub>B</sub> (triangles inversés, n=22) et en présence des deux antagonistes (losanges solides, n=11).

Figure 3. Quantification par microscopie confocale de la distribution des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans des coupes transverses de 14 µm des artères de résistance pulmonaire.

Figure 4. Hétérodimérisation des récepteurs à l'endothéline-1 dans les artères de résistance pulmonaire.

---

## Liste des Tables

### Introduction

Table.1 Rôles physiologiques des endothélines

---

## Liste des Abréviations

AA	Acide arachidonique
A-147627.1	Antagoniste ET <sub>A</sub>
A-192621.1	Antagoniste ET <sub>B</sub>
A-85761.0	Inhibiteur Lipoxygénase
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPC	3'5' adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
ANP	Peptide natiurétique auriculaire
ARN	Acide ribonucléique
BD	Bradykinine
BH <sub>4</sub>	5,6,7,8-tetra-hydrobioptérine réduite
Big ET	Big endothéline
BK <sub>Ca</sub>	Canaux potassique activé par le calcium à grande conductance
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
Cl <sup>-</sup>	Chlore
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
COX	Cyclooxygénase
DAG	Diacylglycérol
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDCF	Facteur contractant dérivé de l'endothélium
EET	Acide époxyéicosatriénoïque
eNOS	Monoxyde d'azote synthétase endothéliale
ET	Endothéline
ET <sub>A</sub>	Récepteur A de l'endothéline
ET <sub>B</sub>	Récepteur B de l'endothéline

---

FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GMPc	3'5'-guanoside monophosphate cyclique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HOCL	Acide hypochloridrique
HT	Hypertension
HTP	Hypertension pulmonaire
ICC	Insuffisance cardiaque chronique
iNOS	Monoxyde d'azote synthétase inductible
IP	Récepteur I <sub>2</sub> des prostaglandines
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
K <sup>+</sup>	Ion potassique
KCl	Chlorure de potassium
kDa	KiloDalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphate de potassium
LOX	Lipoxygénase
MEC	Méclofénamate (inhibiteur de la COX)
Mg <sup>2+</sup>	Ion magnésium
mM	Milimolaire
MP	Membrane plasmique
N <sub>2</sub>	Azote
Na <sup>+</sup>	Ion sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonate de sodium
NEP	24.11 endopeptidase neutre
NF-kB	Facteur nucléaire kB
nNOS	Monoxyde d'azote synthétase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthétase
NSCC	canaux non-sélectifs pour cations
O <sub>2</sub>	Oxygène

---

O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
·OH	Radical hydroxyle
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PHE	Phényléphrine
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositol biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
ppET	Pré-pro endothéline
PSS	Solution saline physiologique
ROS	Espèce oxygénées radicalaire
RS	Réticulum sarcoplasmique
RVP	Résistance vasculaire pulmonaire
SOCC	canaux sélectifs pour cations
SQ 29548	Antagoniste des récepteurs TP
TGF-β	Facteur de croissance β
TP	Récepteurs du thromboxane de la famille des récepteurs TX
TxA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
TxA <sub>2</sub> S	Thromboxane synthétase
U-46619	9,11-dideoxy-11α,9α-epoxyméthanoprostaglandine F <sub>2</sub> α
μM	Micromètre



## **1.0 Introduction**

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

Il existe présentement un important débat à savoir si les patients souffrant d'hypertension pulmonaire devraient recevoir comme traitement thérapeutique un antagoniste simple sélectif des récepteurs à l'endothéline-1 (ET-1) de type A (ET<sub>A</sub>), ou plutôt un antagoniste non-sélectif. Nous évaluerons dans ce mémoire le rôle de l'endothélium et des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1. Nous discuterons de la biologie de l'endothélium ainsi que des différents facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs qui lui sont associés. Nous verrons également le rôle de l'ET-1 de façon plus détaillée. Finalement, il sera question de l'ET-1 et de la circulation pulmonaire ainsi que de l'implication de ce peptide dans différentes pathologies telles que l'insuffisance cardiaque et l'hypertension pulmonaire associée à une pathologie cardiaque gauche.

### ***1.1 Endothélium vasculaire***

#### ***1.1.1 Biologie de l'endothélium***

Durant les 25 dernières années plusieurs découvertes ont permis de démontrer l'importance physiologique de l'endothélium vasculaire. L'endothélium est considéré comme un tissu multifonctionnel jouant un rôle extrêmement important dans la régulation et le contrôle de l'homéostasie du système cardiovasculaire. L'endothélium est composé d'une monocouche cellulaire qui tapisse l'intérieur de tous les vaisseaux

sanguins. Il est situé de façon stratégique entre le sang et les tissus lui permettant ainsi de réguler de nombreuses fonctions des vaisseaux sanguins telles que le tonus vasculaire, la perméabilité, l'adhésion ainsi que l'inflammation. L'endothélium permet la synthèse et la relâche de nombreuses substances vasoconstrictrices et vasodilatatrices qui régulent le tonus vasculaire. Les cellules endothéliales synthétisent plusieurs molécules impliquées dans la coagulation sanguine. Elles peuvent également exprimer plusieurs molécules d'adhésions en situation inflammatoire et pathologique.

### *1.1.2 Structure et fonctions des vaisseaux sanguins*

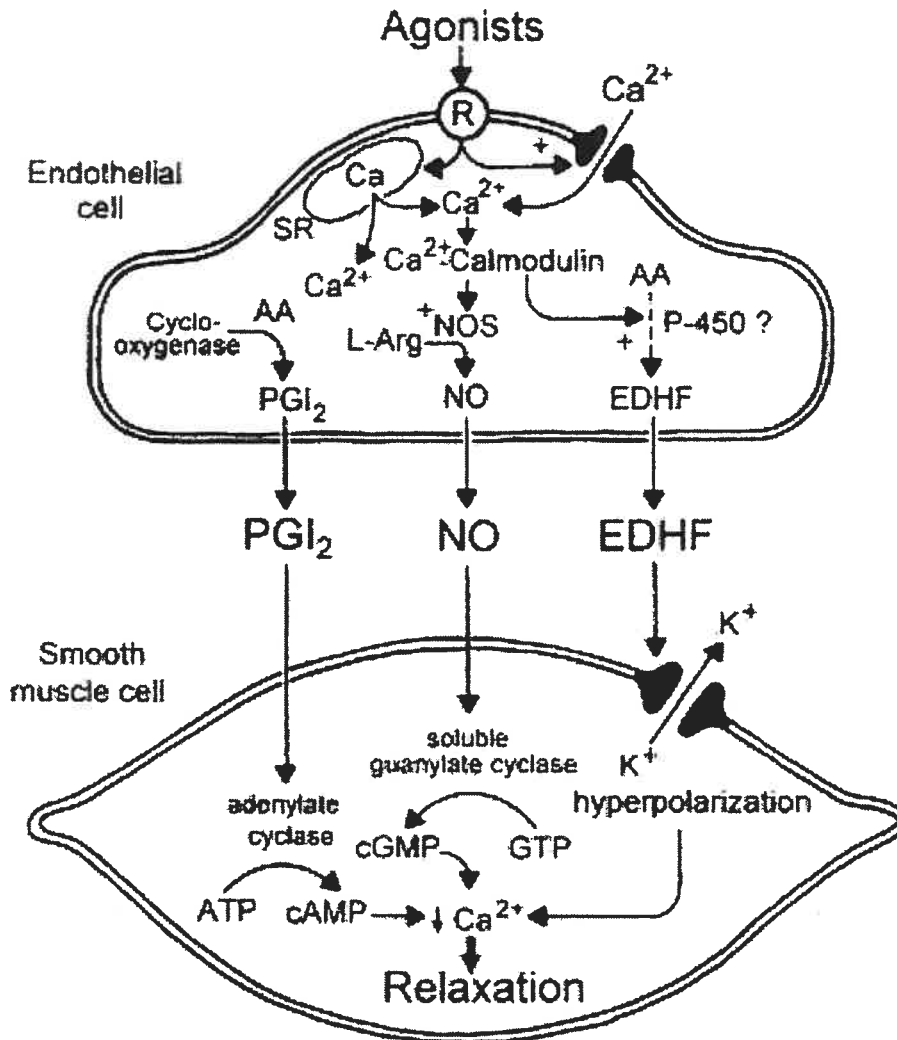
Tous les vaisseaux sanguins, à l'exception des capillaires, partagent une structure à trois couches soit (de l'intérieur vers l'extérieur) la tunique interne (intima), la tunique moyenne (média) et la tunique externe (adventice). L'intima est composée d'une simple couche de cellules endothéliales qui reposent sur une couche sous-endothéliale composée de tissu conjonctif lâche. La média est composée majoritairement de cellules musculaires lisses disposées en anneaux, de fibres élastiques ainsi que de feuillets d'élastine. Cette couche confère aux vaisseaux leur force mécanique et contractile. L'adventice est composée principalement de fibres de collagène lâchement entrelacées qui protègent les vaisseaux et les ancrent aux structures environnantes. La tunique externe est parcourue de fibres nerveuses et de vaisseaux lymphatiques ainsi que, dans les gros vaisseaux, de minuscules vaisseaux sanguins qui constituent le *vasa vasorum*. Ces vaisseaux nourrissent les tissus externes de la paroi des gros vaisseaux.

La contraction vasculaire résulte d'une augmentation des concentrations intracellulaire de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans les cellules musculaires lisses. Les substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices induisent leurs effets en provoquant une diminution ou une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires. De plus, ces agents peuvent modifier la sensibilité de l'appareil contractile aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires. La régulation intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  dépend de l'entrée et de la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane plasmique, par des canaux spécifiques ainsi que de la relâche et de la séquestration du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique.

L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire entraîne l'activation de la MLCK (kinase de la chaîne légère de myosine) qui phosphoryle la chaîne légère de myosine permettant ainsi la contraction du muscle lisse par l'interaction de celle-ci avec les filaments d'actine. À l'inverse, la relaxation du muscle lisse est induite par une diminution des concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui entraîne une déphosphorylation de la chaîne légère de myosine dépendante d'une phosphatase.

### 1.1.3 Agents Vasodilatateurs

**Figure 1.** Sécrétion et mécanismes des substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium (1)



#### 1.1.3.1 Monoxyde d'azote (NO)

La substance non prostanôïde qui est à l'origine de la relaxation dépendante de l'endothélium induite par l'acétylcholine (Ach) a été décrite pour la première fois par Furchgott et Zawadski en 1980 (2) et a été identifié comme étant le monoxyde d'azote

(NO) en 1988 (3). Le NO est un gaz hautement diffusible possédant une demi-vie de 3 à 5 secondes (4). Il est synthétisé dans la cellule endothéliale à partir de l'extrémité guanidine de l'acide aminé L-arginine lors d'une réaction catalysée par la NO synthétase III (NOS III) (3). Il existe trois isoformes de cette enzyme soit, la NOS endothéliale (eNOS ou NOS III), la NOS neuronale (nNOS ou NOS I) et la NOS induite par les cytokines (iNOS ou NOS II). Ces isoformes de la NOS peuvent être divisées en 2 classes fonctionnelles : la NOS constitutive ou induite. La classe constitutive est composée des NOS endothéliale et neuronale. L'activité de ces deux isoformes dépend de la liaison  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline produisant du NO en faibles concentrations (nM). La eNOS est une enzyme membranaire constitutivement exprimée au niveau des cellules endothéliales, des plaquettes et du myocarde (5). La nNOS, pour sa part, est une enzyme cytosolique retrouvée au niveau des neurones et des muscles squelettiques (6;7). La iNOS appartient à la classe induite qui peut produire de fortes concentrations de NO indépendamment du  $\text{Ca}^{2+}$  pendant de très longues périodes pouvant aller jusqu'à 5 jours comparativement à quelques minutes pour la eNOS et la nNOS (8). La iNOS est exprimée par l'endothélium, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les plaquettes suite à l'activation des cellules inflammatoires par les cytokines et les médiateurs de l'inflammation (9) (10). Les trois isoformes de la NOS requièrent cependant la présence du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et du 5,6,7,8-tétra-hydrobiopterine (BH4) pour avoir une activité optimale (11).

L'acétylcholine, la substance P ainsi que les forces de cisaillements sont quelques-uns des stimuli qui induisent l'augmentation intracellulaire endothéliale des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette augmentation de calcium entraîne la formation du complexe

calmoduline/ $\text{Ca}^{2+}$  qui déplace la cavéoline, liée à la eNOS dans la membrane plasmique, et permet ainsi l'activation de cette dernière et la production de NO. Bien qu'ayant une demi-vie très courte, le NO diffuse rapidement vers le muscle lisse. Il y stimule l'activité de la guanylate cyclase soluble, ce qui augmente les concentrations de 3'5' guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le GMPc active une protéine kinase G (PKG) qui, entre autre, conduit à la relaxation du muscle lisse en réduisant les niveaux intracellulaires de calcium. Cette dernière facilite l'ouverture des canaux potassiques à grande conductance (BK) ce qui conduit à une hyperpolarisation de la cellule et entraîne ainsi une inactivation des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L.

#### *1.1.3.2 Prostacycline ( $\text{PGI}_2$ )*

La prostaglandine  $\text{I}_2$  ( $\text{PGI}_2$ ) communément appelée prostacycline a été la première substance endothéliale vasoactive découverte au milieu des années 70 par le groupe de recherche de Sir John Vane. Ce lipide est produit majoritairement à partir de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase (COX) des cellules endothéliales de la tunique interne. Il existe 2 isoformes de la COX soit, la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est l'isoforme responsable de la production de la prostacycline. La COX-2 produit également de fortes concentrations de  $\text{PGI}_2$  (12;13). Toutefois, cette dernière est une isoforme inductible et donc seulement exprimée par les vaisseaux en situation inflammatoire. La prostacycline induit la relaxation du muscle lisse par la stimulation de récepteurs spécifiques IP (récepteur à la prostaglandine  $\text{I}_2$ ) sur le muscle lisse. Les récepteurs IP activent l'adénylate cyclase qui entraîne la production du 3'5' adénosine monophosphate cyclique (AMPc). En plus de sa fonction vasodilatatrice, la  $\text{PGI}_2$  joue un rôle important dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. La prostacycline et ses

analogues induisent aussi une hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire par l'intermédiaire de l'ouverture de canaux potassiques ATP-sensibles. Selon les tissus étudiés plusieurs autres canaux tels que les BK peuvent être impliqués dans l'hyperpolarisation du muscle lisse (14).

La contribution de la prostacycline à la relaxation du muscle lisse varie selon les tissus. Sa contribution est très importante dans certains tissus tels que l'artère coronaire du lapin (15) et négligeable dans d'autres telle que l'artère coronaire du cochon d'Inde (16).

#### *1.1.3.3 Facteur Hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)*

En 1988, le groupe de recherche de Taylor et Weston a découvert une substance distincte du NO et de la PGI<sub>2</sub> responsable de l'hyperpolarisation du muscle lisse soit l'EDHF (17). Les forces de cisaillements ou encore certains agonistes entraînent la libération par les cellules endothéliales de facteurs vasodilatateurs tels que le NO et la PGI<sub>2</sub>. D'autres groupes de recherche ont démontré que l'Ach et la bradykinine (BD) pouvait induire une hyperpolarisation du muscle lisse d'artères de chien, de cochon d'Inde et de porc, qui était toutefois indépendante du NO et de la PGI<sub>2</sub> (18). Ces résultats ont permis de suggérer l'existence d'un facteur distinct du NO ou de la PGI<sub>2</sub> pouvant traverser l'espace extracellulaire pour aller moduler le potentiel membranaire des cellules musculaires lisses et ainsi induire une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (19) (20). Malgré près de deux décennies de recherche, aucun EDHF universel n'a encore été identifié. Plusieurs EDHFs ont cependant été proposés tels que les ions potassiques, les acides époxyéicosatriénoïques (EETs), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le peptide natriurétique C, l'anandamide, le 2-

arachidonoylglycérol ainsi que le transfert direct de l'hyperpolarisation endothéliale vers les cellules musculaires par les jonctions gap.

#### *1.1.4 Agents Vasoconstricteurs*

Il a été démontré que l'endothélium pouvait libérer, en plus des facteurs vasodilatateurs, plusieurs facteurs vasoconstricteurs communément appelés Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium. Il existe plusieurs substances vasoconstrictrices telles que le thromboxane  $A_2$  ( $TxA_2$ ), l'endothéline-1, l'angiotensine II, la prostaglandine  $H_2$ , le superoxyde ainsi que l'acide 20-hydroxyéicosatétraénoïque. Nous nous concentrerons d'avantage sur l'ET-1 et le  $TxA_2$  dans le présent mémoire puisqu'ils sont au coeur du sujet de la présente étude.

##### *1.1.4.1 Thromboxane $A_2$ ( $TxA_2$ )*

Les éicosanoïdes constituent un groupe de métabolites endogènes formés à partir de l'acide arachidonique (AA) *via* trois voies enzymatiques importantes soit la cyclooxygénase, la lipoxygénase (LOX) et le cytochrome P450. Ils incluent les prostaglandines (PG) dont la  $PGI_2$  et le  $TxA_2$ , les leucotriènes dont le HETE/HPETE, ainsi que les lipoxines. Le  $TxA_2$  a été décrit la première fois en 1975 par le groupe de Hamberg(21). Il possède une demi-vie de quelques secondes (22) et est formé par une enzyme microsomale soit la thromboxane synthétase ( $TxA_2S$ ). Puisque le  $TxA_2$  est un composé très labile, le composé U-46619 (9,11-dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethanoprostaglandine  $F_{2\alpha}$ ), un analogue de synthèse du  $TxA_2$ , est utilisé expérimentalement à la place de ce dernier en raison de sa stabilité. Ce prostanoïde est libéré principalement par les plaquettes activées (21) et joue un rôle important dans le



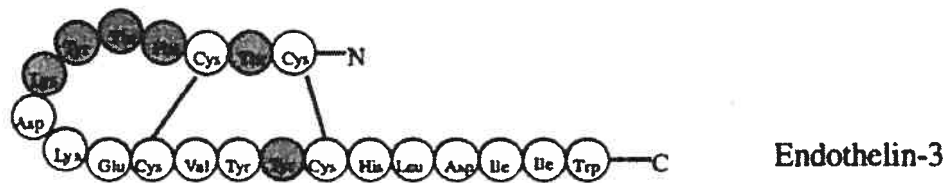
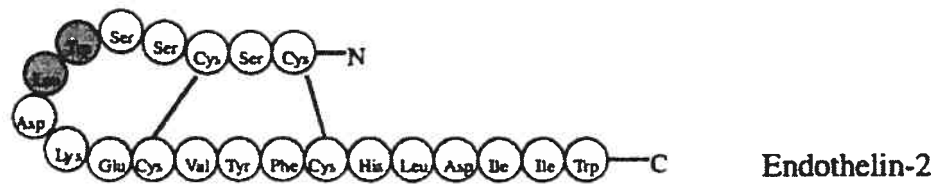
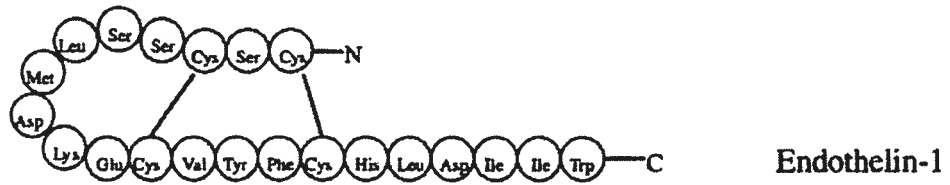
contrôle local de l'homéostasie vasculaire (23). C'est un important vasoconstricteur du muscle lisse et constitue un puissant stimulant de l'agrégation plaquettaire. Le  $\text{TxA}_2$  entraîne la relâche de  $\text{PGI}_2$  des cellules endothéliales. Dans certaines conditions pathologiques il peut avoir un effet mitogène ou hypertrophique sur les cellules musculaires lisses vasculaires (24). Ce prostanoloïde induit ses actions *via* deux types de récepteurs soit le récepteur T Prostanoloïde 1 (TP1) et le récepteur TP2 qui font tous deux partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs peuvent coupler plusieurs protéines G telles que  $G_q$ ,  $G_{12}$ ,  $G_{13}$ ,  $G_{16}$  et  $G_{i2}$ . Ils se retrouvent sur les plaquettes et également sur les cellules endothéliales et musculaires lisses (25). La liaison de ce prostanoloïde à son récepteur entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) et favorise ainsi l'augmentation des concentrations intracellulaires de calcium. En situation physiologique, la  $\text{PGI}_2$  contrebalance les effets de la  $\text{TxA}_2$ ; toutefois, lors d'un dérèglement de l'homéostasie vasculaire, une augmentation de la  $\text{TxA}_2$  peut contribuer au développement de certaines pathologies. Les patients possédant une déficience de production de ce prostanoloïde (26) ou encore une mutation du gène responsable de la synthèse des récepteurs TP souffrent de graves désordres sanguins (27). Ce prostanoloïde pourrait être impliqué dans plusieurs pathologies telles que l'hypertension (HT) (28), la pré-éclampsie (29), l'accident vasculaire cérébral (30) ainsi que les ulcères de l'estomac (31). Les effets du  $\text{TxA}_2$  peuvent être prévenus soit en inhibant sa synthèse par la  $\text{TxA}_2\text{S}$  (ozagrel), soit en antagonisant les récepteurs TP (SQ 29 548).

#### *1.1.4.2 Endothéline-1 (ET-1)*

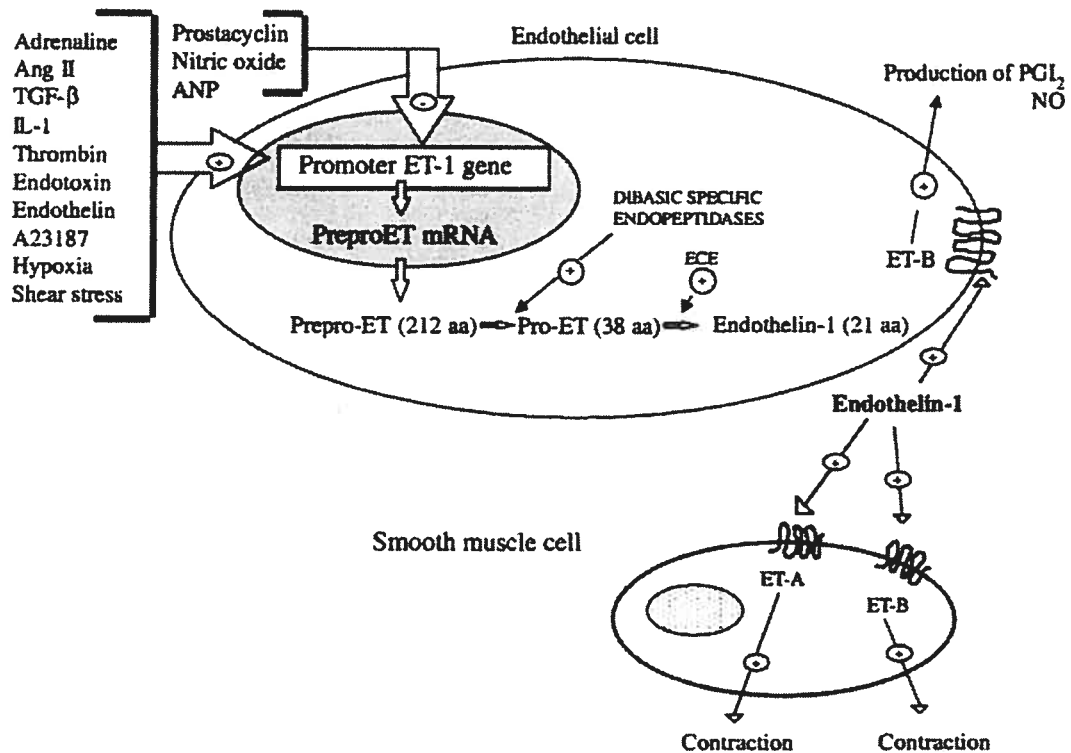
C'est en 1988 que le groupe de Yanagisawa a isolé pour la première fois une substance vasoconstrictrice à partir de cellules endothéliales aortiques de porc (32). Cette substance fût tout d'abord nommée endothéline puis finalement appelée endothéline-1 (ET-1). L'ET-1 est un puissant peptide vasoconstricteur tout en étant un important agent trophique des cellules musculaires lisses. Il en existe trois isoformes et l'ET-1 est la plus puissante, la plus connue et la seule exprimée au niveau des cellules endothéliales vasculaires. Plusieurs agents peuvent entraîner la production de ce peptide tels que le TGF- $\beta$  (transforming growth factor), l'angiotensine II, l'adrénaline, l'insuline, la vasopressine ainsi que l'interleukine-1 (33) (34) (35). Par contre, le monoxyde d'azote et le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) peuvent en réduire la synthèse (36).

## 1.2 Endothéline

**Figure 2.** La séquence d'acides aminés des trois isoformes de l'endothéline



**Figure 3. Les agents qui régulent la production et l'action de l'endothéline-1 (37)**



### 1.2.1 Rôles physiologiques de l'endothéline-1

En plus de son important rôle vasoconstricteur, visible cependant qu'à des doses pharmacologiques, l'ET-1 exerce de nombreuses fonctions physiologiques. Puisque les niveaux circulants d'ET-1 sont très faibles, ce peptide est considéré comme un médiateur autocrine/paracrine plutôt que comme une hormone circulante. L'ET-1 est impliquée dans la régulation de l'homéostasie circulatoire; elle contrôle le volume sanguin, la pression sanguine, le débit sanguin ainsi que la viscosité du sang (38). Elle contribue au contrôle de la fonction rénale en régulant le débit sanguin rénal, l'excrétion d'ions et d'eau ainsi que la régulation de la composition de l'urine excrétée (39-41). L'ET-1 a aussi plusieurs effets au niveau cardiovasculaire tels que la

régulation de l'éjection cardiaque et du débit sanguin coronaire (42). L'ET-1 contribue à la cicatrisation de blessures tissulaires dans l'inflammation ainsi que dans le contrôle des menstruations. Elle peut induire la relâche de plusieurs substances telles que la PGI<sub>2</sub>, les catécholamines, l'ANP, la vasopressine, l'aldostérone (43) tout en empêchant la production de certaines substances telles que la rénine des cellules juxtaglomérulaires (44).

**Table1. Rôles physiologiques des endothélines**

	<b>Rôles physiologiques</b>	<b>Références</b>
<b>ET-1</b>	<p>1. Régulation de l'homéostasie locale :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Volume sanguin</li> <li>-Pression sanguine</li> <li>-Débit sanguin</li> <li>-Viscosité sanguine</li> </ul>	(38)
	<p>2. Régulation de la fonction rénale :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Débit sanguin rénale</li> <li>-Excrétion d'ions et H<sub>2</sub>O</li> <li>-Composition de l'urine excrété</li> <li>-Diminution de la production de rénine des cellules juxtaglomérulaires</li> </ul>	(39) (40;41) (44)
	<p>3. Régulation fonction cardiaque :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Éjection cardiaque</li> <li>-Débit coronaire</li> </ul>	(42)
	<p>4. Entraîne la relâche de certaines substances :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-PGI<sub>2</sub></li> <li>-Catécholamines</li> <li>-ANP</li> <li>-Vasopressine</li> <li>-Aldostérone</li> </ul>	(43)
	5. Guérison de blessures tissulaires	(45)
	6. Inflammation	(46;47)
	7. Contrôle des menstruations	

<b>ET-2</b>	1. Peptide vasoactif impliqué dans la contraction musculaire lisse intestinale	(48)
<b>ET-3</b>	1. Régulation de la différenciation des cellules neuronales	(49)

### *1.2.2 Biosynthèse et dégradation*

Les précurseurs des endothélines, les prépro-endothélines (ppET) sont clivés par deux groupes de protéases pour produire les endothélines matures et actives. Les ppET constituées d'environ 200 résidus sont clivés au niveau de sites dibasiques par des endopeptidases de type furine pour former des intermédiaires inactifs nommés "big" endothéline (big ET-1, -2, -3) qui sont des peptides de 37 à 41 acides aminés. Les big ET-1 et big ET-2 sont ensuite clivées au niveau de la liaison Tryptophane-Valine ou, pour la big ET-3, au niveau de la liaison Tryptophane-Isoleucine afin de former le peptide final de 21 acides aminés. Cette dernière étape est effectuée par des métalloprotéases membranaires à zinc de la superfamille des néprilysines (50) appelées enzymes de conversion de l'ET (ECE). L'ET-1 est un peptide de 21 acides aminés comportant une extrémité carboxy-terminale hydrophobe et 2 ponts disulfures en position amino-terminale. La conversion de la Big ET en ET est essentielle pour son activité biologique puisque la Big ET ne possède seulement qu'un pourcent de l'activité contractile du peptide mature (51). En 1989, deux peptides qui diffèrent de l'ET-1 par trois acides aminés dans un cas et six dans l'autre ont été identifiés et nommés respectivement endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3). Ces deux peptides ont été détectés au niveau de l'intestin, de la médullosurrénale ainsi qu'au niveau du cerveau. L'ET-3 est un peptide très abondant au niveau des tissus

neuronaux et il semble représenter la forme neuronale principale des endothélines (52) (53).

Les ECEs partagent une grande homologie avec la 24.11 endopeptidase neutre (NEP). Cette dernière est impliquée dans l'inactivation des peptides de régulation tels que le ANP. La NEP se retrouve au niveau de la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires tels que les cellules neuronales et épithéliales. Puisqu'il existe une grande homologie entre le NEP et les ECEs, il semblerait que l'inhibition pharmacologique des deux enzymes simultanément serait beaucoup plus efficace que l'inhibition d'une seule enzyme à la fois. Cinq isoformes de l'ECE, ayant toutes une localisation subcellulaire distincte, ont été clonées à ce jour de tissus humains, bovins et de rats soit ; l'ECE-1a (ECE-1 $\beta$ ) (54), l'ECE-1b (55), l'ECE-1c (ECE-1 $\alpha$ ) (56), l'ECE-2 (57) et enfin, l'ECE-3 (58). Les isoformes retrouvées chez le rat ont été nommées l'ECE-1 $\alpha$  et l'ECE-1 $\beta$  alors que les isoformes répertoriées chez l'humain ont plutôt été nommées l'ECE-1a, l'ECE-1b. Les isoformes ECE-1 $\beta$  et ECE-1 $\alpha$  présentent beaucoup d'homologies avec les isoformes humaines ECE-1a et ECE-1b, respectivement.

Un seul gène, situé sur le chromosome 1 (1p36) (55), code pour la formation des trois isoformes humaines de l'ECE et ces dernières ne diffèrent entre elles que par leur région N-terminale. Les isoformes ECE-1a/ $\beta$  et ECE-1c/ $\alpha$  sont toutes deux localisées au niveau de la surface cellulaire alors que l'isoforme ECE-1b se retrouve au niveau intracellulaire tout près de l'appareil de golgi (56). Puisque les isoformes ECEs de type 1 ont une distribution tissulaire abondante et qu'ils possèdent une activité optimale à pH neutre, ils sont très probablement responsables de la conversion de la Big ET-1 aux niveaux intracellulaire et de la membrane plasmique (59). Suite à

l'étude intensive du gène codant pour les ECEs, il a été découvert que celui-ci possédait trois régions promotrices alternatives permettant la transcription de l'acide ribonucléique (ARN) des isoformes ECE-1a, ECE-1b ainsi que ECE-1c (55). Chez l'humain et le rat, l'ARNm de l'isoforme ECE-1c/α est exprimée à des niveaux plus élevés que l'ARNm de l'isoforme ECE-1a/β. Pour sa part, l'ARNm de l'isoforme humaine ECE-1b est faiblement exprimée et ne représente que 5% de la population totale d'ARNm de l'ECE-1. L'ECE-2 est exprimée dans les cellules endothéliales humaines. Elle possède une activité enzymatique acide (pH 5.5) et 59% d'homologie avec l'ECE-1. Quatre isoformes de cette enzyme ont récemment été isolées et caractérisées chez le bovin soit l'ECE-2a-1, l'ECE-2a-2, l'ECE-2b-1 ainsi que l'ECE-2b-2. L'ECE-3, quant à elle, clive sélectivement la big ET-3 en ET-3. L'ET-3 et son récepteur ET<sub>B</sub> sont tous deux nécessaires pour le développement et la différenciation des cellules neuronales (49). De récentes observations selon lesquelles les souris "knock-out" pour les ECE-1a, ECE-1b et ECE-1c possèdent tout de même des niveaux circulants d'ET-1 détectables, quoique très faible, suggèrent que des enzymes alternatives sont en mesure de catalyser la conversion de la big ET-1 en ET-1 (60). Par exemple, les métalloprotéases matricielles vasculaires-2 et -9 peuvent toutes deux cliver la big ET-1 au niveau du site glycine<sup>32</sup>-leucine<sup>33</sup> pour former le peptide mature ET-1.

### *1.2.3 Clairance de l'endothéline-1*

Dans la circulation sanguine, nous retrouvons des niveaux plasmatiques d'ET-1 très faibles, ce qui pourrait être attribué à une clairance rapide du peptide, à un rythme de production lent ou encore à une libération préférentielle vers le muscle lisse. En



accord avec cette troisième hypothèse, il semblerait que 75% de l'ET-1 synthétisée serait sécrétée vers les cellules musculaires lisses (61).

Les poumons, les reins et le foie sont les principaux organes impliqués dans la clairance de l'ET-1. De plus, comme tout autre peptide ou hormone, cette clairance est régulée par un récepteur (62) (63). Plusieurs groupes tels que ceux de Fukuroda et Dupuis ont démontré l'importance du récepteur ET<sub>B</sub> dans la clairance rapide de l'ET-1 (64) (65) en se basant sur les résultats suivants; (1) une administration intraveineuse de l'antagoniste BQ-788 (antagoniste ET<sub>B</sub> sélectif) a réduit de façon significative la clairance et le captage de ce peptide par les poumons et les reins ; (2) un antagoniste ET<sub>A</sub> sélectif n'a eu aucun effet ; (3) 80% de l'ET-1 marquée à l'iode 125 a été captée par les poumons. Ce captage était sensible au BQ-788 mais pas au BQ-123 (66). Les récepteurs ET<sub>B</sub> se retrouvent dans plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales (67), musculaires lisses (64) et parenchymales (68) des poumons et des reins. Tout comme l'angiotensine II qui est internalisée avec son récepteur (69), il serait possible que l'ET-1 circulante soit internalisée avec le récepteur ET<sub>B</sub> de ces cellules pour ensuite être endocytosée.

#### *1.2.4 Sécrétion de l'endothéline-1*

Dans les cellules endothéliales, les protéines sont transportées du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique par deux voies de sécrétion distinctes soit la voie constitutive ou la voie induite. La voie constitutive semble être celle qui est impliquée dans la sécrétion de l'ET des cellules endothéliales de porc (32). Le fait que la voie induite implique des granules de stockage a permis de rejeter l'hypothèse voulant que cette voie soit responsable de la sécrétion de l'ET-1 (32). Pourtant, des études morphologiques ont démontré l'existence de granules de stockage

communément appelées vésicules de Weibel-Palade qui pourraient être responsables de la sécrétion de l'ET-1 (70).

Les protéines sont continuellement transportées de l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire par la voie de sécrétion constitutive. La détection de l'ET dans les vésicules de sécrétion des cellules endothéliales coronaires humaines et bovines ont démontré l'implication de la voie constitutive dans le transport de ce peptide (71). L'ECE et la big ET ont aussi été retrouvées ensembles dans les vésicules endothéliales de sécrétion (72). Ces données permettent d'affirmer que la relâche basale d'ET par les cellules endothéliales est probablement effectuée par la voie de sécrétion constitutive. La transcription semble être l'étape limitante dans la synthèse de l'ET par cette voie. Plusieurs facteurs tels que la thrombine, l'adrénaline, l'angiotensine II, la vasopressine ainsi que les forces de cisaillement peuvent réguler à la hausse la transcription du gène de l'ET.

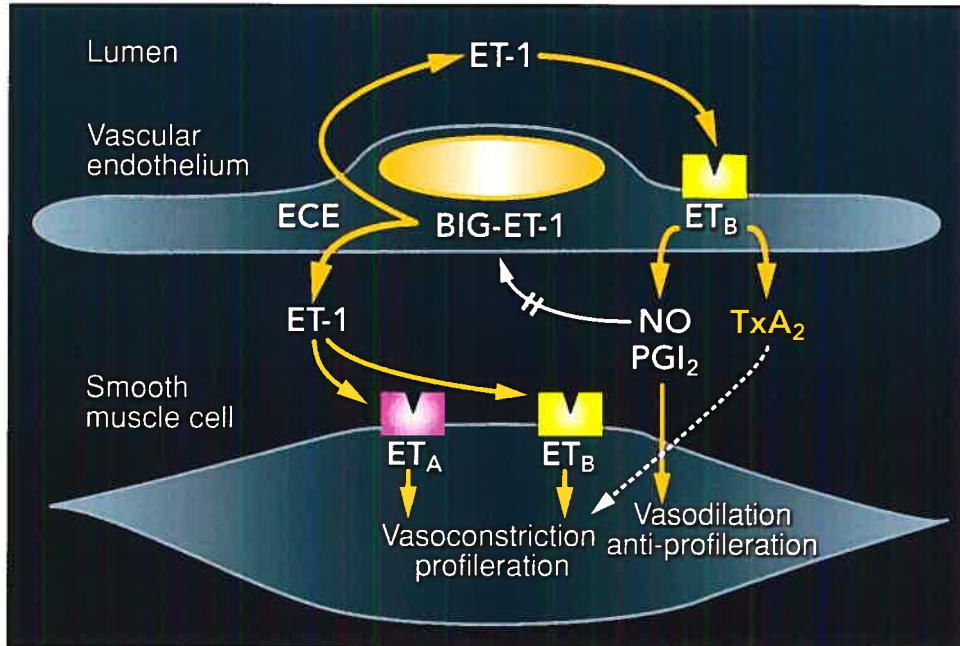
Par contre, plusieurs évidences semblent aussi indiquer un rôle de la voie de sécrétion induite dans le transport de l'ET. Plusieurs composés vasoactifs tels que l'histamine, le facteur Von Willebrand ainsi que la P-sélectine sont emmagasinés dans les corps de Weibel-Palade (73) (74) (75). Un groupe de chercheurs a émis l'hypothèse que la big ET-1 est transformée en ET-1 et emmagasinée dans ces vésicules de sécrétion pour être ultérieurement libérée (76;77).

Les voies de sécrétion constitutive et induite peuvent exister dans une même cellule. Une étude réalisée par le groupe de Davenport a démontré que la relâche d'ET par les cellules endothéliales coronaires humaine pouvait s'effectuer par la voie constitutive ou par la voie induite (77). La raison pour laquelle un même peptide utilise deux voies de sécrétions distinctes reste cependant à définir.

### 1.2.5 Récepteurs vasculaires à l'ET-1

L'ET induit ses effets *via* trois types de récepteurs soit ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sont les récepteurs les plus importants chez l'humain. Ils possèdent sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G. Le récepteur ET<sub>A</sub> humain est codé par le chromosome 4, possède 427 acides aminés et lie fortement l'ET-1, l'ET-2 et plutôt faiblement l'ET-3. Pour sa part, le récepteur ET<sub>B</sub> est codé par le chromosome 13, possède 442 acides aminés et lie les trois isoformes de l'ET de manière égale. Toutefois, le récepteur ET<sub>B</sub> ne reconnaît seulement que la portion C-terminale de l'ET-1 (78). Le clonage des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> a révélé une homologie de 60% entre les deux récepteurs. Les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> présents au niveau de la cellule musculaire lisse induisent tous deux une vasoconstriction. Par contre, le récepteur ET<sub>B</sub> endothélial a une double fonction car il peut potentialiser la vasoconstriction du muscle lisse par la libération de TxA<sub>2</sub> ou induire une vasodilatation par la libération de PGI<sub>2</sub> et de NO.

**Figure 4.** Biologie du système endothéline et de ses récepteurs au niveau de l'endothélium et de la cellule musculaire lisse (79)



Plusieurs évidences indiquent que la distribution des récepteurs à l'ET varie selon les espèces et les lits vasculaires. Au niveau des artères de conductance et de résistance pulmonaire humaines, le ratio des récepteurs  $ET_A$  par rapport aux récepteurs  $ET_B$  est de 9 pour 1 (64). Le récepteur  $ET_A$  est situé majoritairement sur les artères alors que le récepteur  $ET_B$  se retrouve de manière prédominante sur les veines (80). Au niveau des cellules endothéliales, la liaison de l'ET-1 au récepteur  $ET_B$  entraîne la relâche de NO et de  $PGI_2$ , prévient l'apoptose et diminue l'expression de l'ECE-1. Les deux types de récepteur, quoique surtout les récepteurs  $ET_B$ , sont exprimés dans plusieurs autres types cellulaires que l'endothélium et le muscle lisse vasculaire. Le récepteur  $ET_A$  se retrouve en effet au niveau des cellules musculaires lisses des voies aériennes, des cardiomyocytes, des fibroblastes, des hépatocytes ainsi

que sur les neurones. De plus, on retrouve aussi le récepteur ET<sub>A</sub> au niveau des glomérules du rein alors que les cellules du tubule rénal collecteur expriment plutôt le récepteur ET<sub>B</sub>. Par ailleurs, le récepteur ET<sub>A</sub> est exprimé dans plusieurs vaisseaux cérébraux alors que le récepteur ET<sub>B</sub> n'est exprimé que sur certains neurones. Les deux types de récepteur se retrouvent au niveau de l'oreillette et du ventricule (81).

Certaines études ont démontré que la localisation et la taille de l'artère étudiée déterminent lequel des deux types de récepteur sera responsable de la vasoconstriction induite par l'ET-1 (82). Ce groupe de chercheurs a constaté qu'il existait une grande diversité de récepteurs à l'ET-1 dans la circulation pulmonaire. Par exemple, le récepteur ET<sub>A</sub> est responsable de la vasoconstriction des artères de large diamètre (extra-pulmonaire) alors que le récepteur ET<sub>B</sub> est plutôt responsable de la vasoconstriction des petites artères de résistance (82). Cette localisation sélective se retrouve aussi dans les artères pulmonaires du porc (83). À l'encontre des résultats précédents, il semblerait que la vasoconstriction soit entièrement induite par le récepteur ET<sub>B</sub> dans l'artère pulmonaire principale du lapin (84).

#### *1.2.5.1 Dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)*

La grande majorité des gènes qui codent pour des récepteurs membranaires se retrouve dans la famille des RCPGs. Tout les RCPGs partagent une structure similaire soit 7 hélices transmembranaires qui sont liées par 3 boucles intra et extracellulaires. Les régions extracellulaires sont responsables de la liaison à l'agoniste (85) (86) alors que les régions intracellulaires sont responsables de la signalisation intracellulaire (87). Il existe trois grandes familles des RCPGs soit la famille A (récepteurs de type

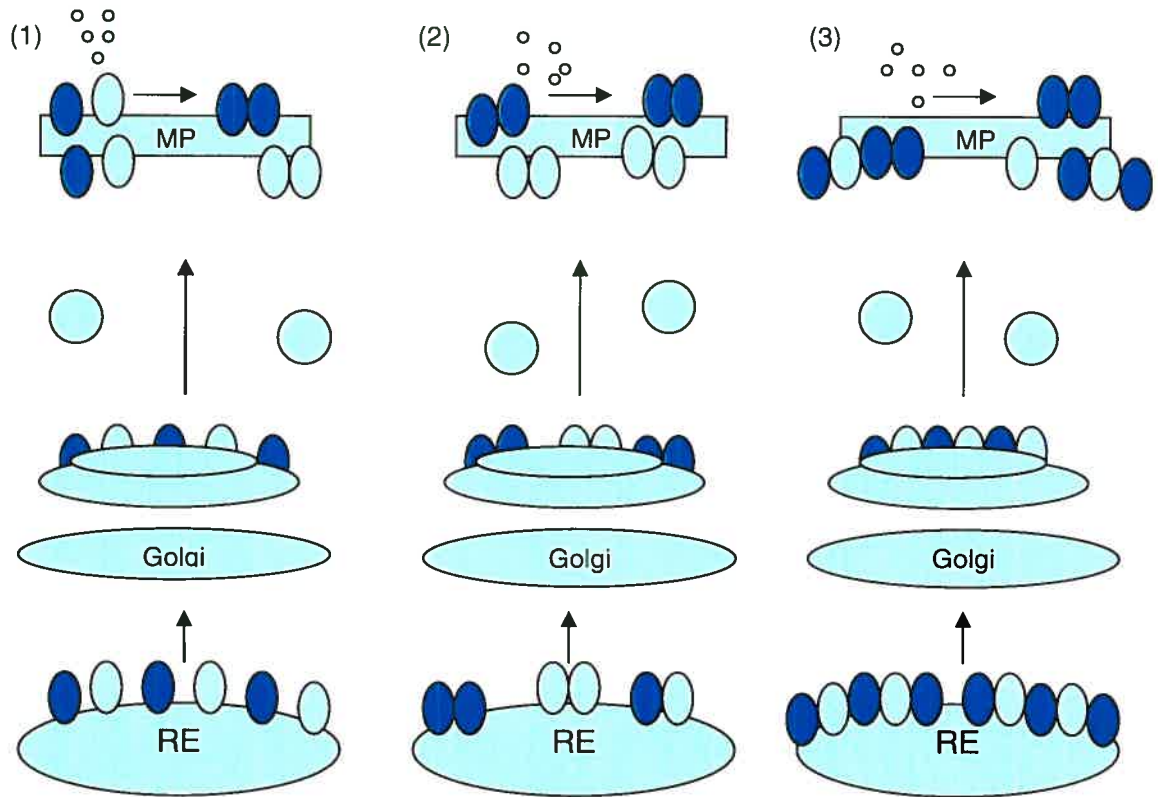
rhodopsine), la famille B (famille des récepteurs au glucagon/sécrétine) ainsi que la famille C (famille des récepteurs sensibles au calcium et aux neurotransmetteurs).

De récentes études ont démontré que les RCPGs pouvaient exister sous forme de dimères ou d'oligomères. Les récepteurs à activité tyrosine kinase, les facteurs de transcription ainsi que les récepteurs aux stéroïdes peuvent eux aussi fonctionner sous forme de dimères (88) (89) (90). Il n'est donc pas surprenant que les RCPGs puissent eux aussi exister sous forme de dimères. Il est par contre étonnant que ces récepteurs ne se limitent pas à former des homodimères mais interagissent avec d'autres membres de la famille des RCPGs pour former des hétérodimères. L'homodimérisation se définit comme une interaction physique entre deux protéines identiques alors que l'hétérodimérisation est l'association de deux protéines non identiques. Deux monomères peuvent s'associer pour former un dimère ou encore plusieurs monomères peuvent interagir pour former un oligomère.

Il existe trois scénarios possibles d'assemblage et de maturation des dimères de RCPGs. (1) Le RCPG est synthétisé dans le réticulum sarcoplasmique (RS) puis est exporté à la membrane plasmique (MP) sous forme de monomère qui se lie ensuite pour former un dimère en réponse à un agoniste. La stimulation par l'agoniste est un pré-requis pour la formation du dimère. (2) Les RCPGs s'assemblent préalablement dans un compartiment intracellulaire pour ensuite être exportés à la MP sous forme de dimères. Les dimères sont des complexes stables car ils ne sont pas affectés lors de la stimulation des récepteurs par l'agoniste. (3) Les RCPGs s'assemblent dans un compartiment intracellulaire pour ensuite être exportés à la MP sous forme de dimères/oligomères. L'agoniste peut affecter les niveaux de formation et le nombre de dimères (voir figure 5). Plusieurs études ont évalué l'effet d'agonistes sur la

dimérisation des RCPGs. Dans certains cas, la stimulation de récepteurs comme les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques par exemple, induit une stabilisation des dimères ou encore une augmentation du nombre de dimères (91). Il arrive parfois que la stimulation de récepteurs par un agoniste n'ait aucun effet comme c'est le cas pour le récepteur Muscarinique M3 (92) ou encore qu'elle entraîne plutôt la diminution du nombre de dimères. L'association des monomères pourrait être stabilisée par des liaisons covalentes, par des ponts disulfures ou encore par des liens non-covalents tels que des liens hydrophobes. Ces interactions pourraient impliquer l'association de domaines extracellulaires, de domaines transmembranaires et/ou la queue C-terminale. Plusieurs études semblent proposer une combinaison des interactions mentionnées ci-haut.

**Figure 5.** Les divers scénarios de l'assemblage et de la maturation des dimères des récepteurs couplés aux protéines G (93)



La dimérisation des RCPGs pourrait expliquer plusieurs des résultats divergents obtenus précédemment par divers groupes de recherche qui avaient alors proposé la présence de nouveaux sous-types de ET-R ou encore la possibilité d'un «cross-talk» entre les récepteurs. La formation d'hétérodimères pourrait modifier la fonction d'un récepteur en régulant la liaison de l'agoniste, la signalisation intracellulaire ainsi que les propriétés de recyclage et d'expression du récepteur (94). De plus, la formation de dimères pourrait modifier la réponse du récepteur à son agoniste. En effet, l'antagoniste d'un récepteur pourrait se lier à l'un des monomères et ainsi augmenter



la liaison de l'agoniste au monomère associé du même récepteur (95). Un groupe de recherche a récemment démontré l'existence d'homo et d'hétérodimères constitutifs des récepteurs à l'ET-1. Par ailleurs, ils ont confirmé l'activité fonctionnelle des hétérodimères dans des cellules HEK 293 transfectées (96). De plus, l'importance de la formation d'hétérodimères des ET-Rs a aussi été suggérée au niveau de la glande hypophysaire antérieure (97).

Plusieurs méthodes biochimiques, biophysiques ou encore pharmacologiques, telles que l'utilisation d'agonistes radioactifs, peuvent être utilisées pour révéler les interactions protéines-protéines. Les études de co-immunoprécipitation sont des méthodes biochimiques utilisées pour détecter la formation de dimères. De plus, il est possible de vérifier les interactions protéines-protéines dans des cellules vivantes à l'aide de techniques biophysiques telles que les techniques de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer).

#### *1.2.6 Voies de signalisation intracellulaire*

Les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> des muscles lisses étant tous deux des RCPGs, sont susceptible d'être couplés aux protéines G $\alpha$ s, G $\alpha$ i et G $\alpha$ q. La vasoconstriction induite par l'ET-1 est initiée par une augmentation biphasique du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire.

##### **Phase aigüe.**

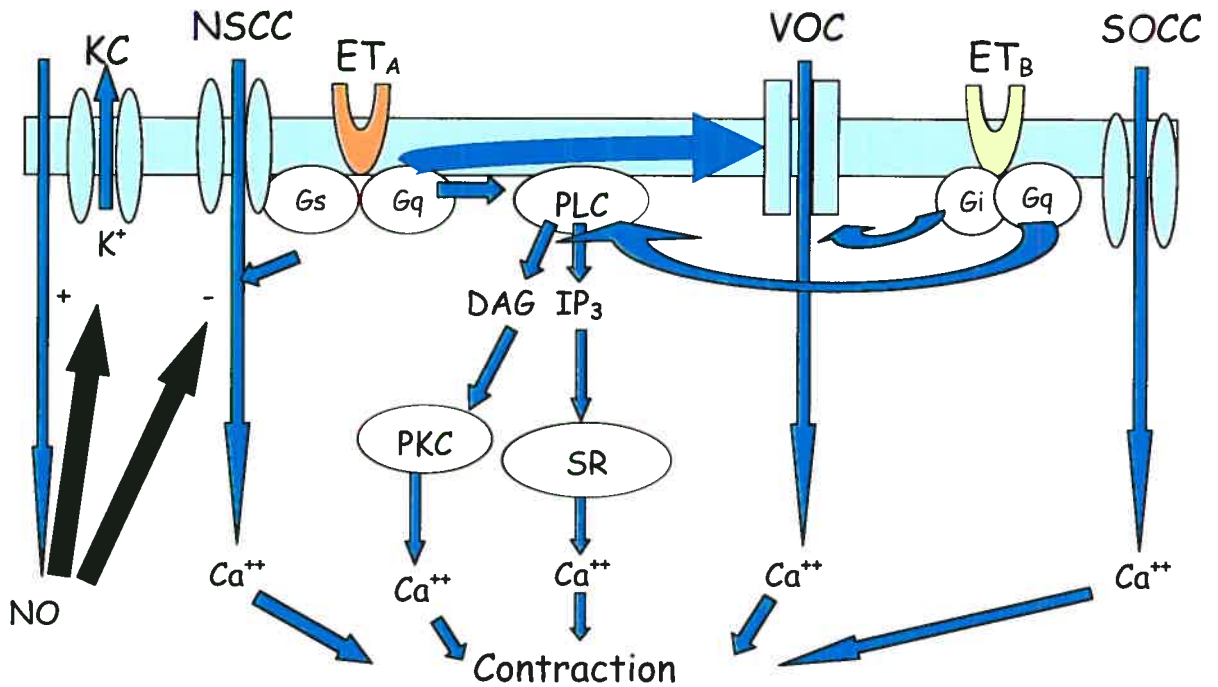
- La liaison de l'ET-1 à son récepteur entraîne l'activation, par le biais de G $\alpha$ q, de la PLC qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en deux sous-produits, soit l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le 1,2-diacylglycérol (DAG). La mobilisation rapide des réserves intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique est induite par l'IP<sub>3</sub>.

### Phase soutenue.

- L'augmentation soutenue du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est produite par un influx de calcium extracellulaire par différents canaux ioniques.
- Le DAG active une protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle directement ou indirectement les canaux  $\text{K}^+$  et provoque ainsi leur inactivation et une dépolarisation soutenue de la cellule.
- La dépolarisation de la cellule entraîne à son tour une activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L.
- L'activation des canaux cationiques sélectifs (SOCC) et non-sélectifs (NSCC) ainsi que l'activation des canaux chlore ( $\text{Cl}^-$ ) par le calcium peuvent aussi favoriser la dépolarisation cellulaire (98) (99).

L'augmentation de calcium est essentielle à la vasoconstriction musculaire lisse, mais elle permet aussi l'activation des voies de signalisation de la croissance cellulaire des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses ainsi que des cellules gliales. La croissance cellulaire dépendante de l'ET-1 est essentiellement induite par le récepteur  $\text{ET}_A$  *via* l'activation de la MAPK. Il est bien connu que l'ET-1 peut activer ou participer à plusieurs cascades intracellulaires telles que les voies de la MAPK, de la P38, de la P44/P42, de la PI3K, de la protéine kinase B, du NF-kB ainsi que de JNK (100) (101) (102) (103). Les types cellulaires où l'ET-1 peut activer ces cascades, les effets provoqués par l'ET-1 *via* l'activation de ces cascades intracellulaires et les mécanismes par lesquels l'ET-1 les active sont présentement des sujets très étudiés.

**Figure 6.** Mécanisme de contraction induite par l'ET-1 (104)



### 1.3 La circulation pulmonaire

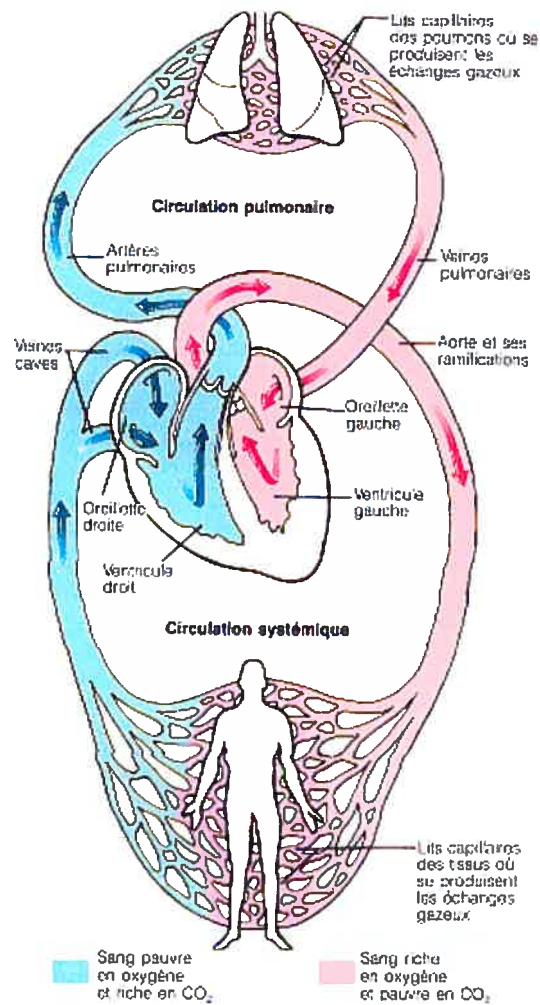
La circulation pulmonaire est une circulation à basse pression tout en étant un système à haute compliance. Elle a pour seul rôle de faire entrer le sang en contact avec les alvéoles des poumons de manière à permettre les échanges gazeux; elle ne sert pas directement les besoins métaboliques du tissu pulmonaire.

Le ventricule droit propulse le sang pauvre en oxygène dans le tronc pulmonaire qui monte en diagonale sur une distance de 8 cm pour finalement donner les artères pulmonaires droite et gauche. Dans les poumons, les artères émettent plusieurs branches qui desservent les lobes. Après avoir longer les bronches principales, ces branches se ramifient en de nombreuses artérioles pour finalement produire les réseaux denses de capillaires qui entourent les alvéoles. C'est au niveau de ces

capillaires pulmonaires que les échanges d'oxygène (O<sub>2</sub>) et de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) se produisent. Les lits capillaires pulmonaires s'écoulent dans les veinules pour finalement se réunir et former les deux veines pulmonaires de chaque poumon. Les quatre veines pulmonaires déversent leur contenu dans l'oreillette gauche. Les artères pulmonaires transportent le sang pauvre en O<sub>2</sub> mais riche en CO<sub>2</sub> alors que les veines transportent le sang riche en O<sub>2</sub> mais pauvre en CO<sub>2</sub>.

Dans la circulation pulmonaire, le débit sanguin présente plus d'une particularité. La résistance pulmonaire vasculaire (RPV) est d'environ  $67 \pm 30$  dynes·s·cm<sup>-5</sup> ce qui représente le 1/10 de la résistance vasculaire retrouvée dans la circulation systémique. La pression systolique que l'on retrouve au niveau du ventricule droit est d'environ 25 mm Hg alors que la pression diastolique est d'environ 0-1 mm Hg. Ces valeurs représentent seulement le 1/5 des valeurs que l'on retrouve au niveau du ventricule gauche. Le volume sanguin pulmonaire est d'environ 450 ml représentant seulement 9% du volume sanguin total.

**Figure 7. Circulation pulmonaire et systémique (105)**



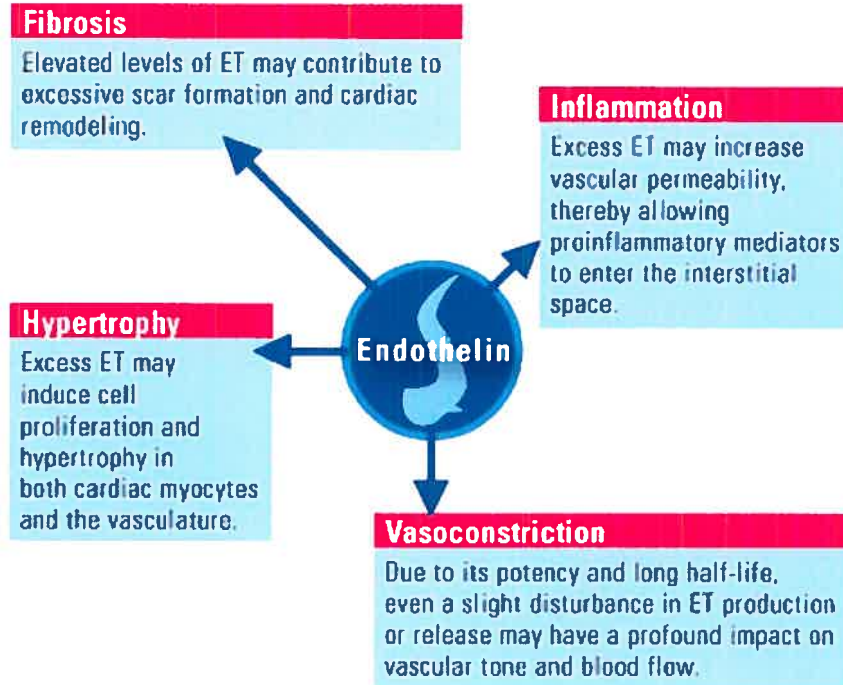
En outre, le mécanisme autorégulateur est inversé dans la circulation pulmonaire où une faible concentration d'O<sub>2</sub> cause la vasoconstriction des artéioles alors qu'une forte concentration provoque plutôt une vasodilatation. Ce phénomène est parfaitement adapté puisque lorsque les sacs alvéolaires sont remplis d'air riche en O<sub>2</sub>, les capillaires pulmonaires se gorgent de sang et sont prêts à recevoir l'O<sub>2</sub>. Par contre, si les sacs alvéolaires sont affaissés ou obstrués par du mucus, la concentration d'O<sub>2</sub> baisse dans la région et le sang la contourne.

L'œdème pulmonaire se produit de la même façon que toute autre accumulation de liquide dans les tissus ailleurs dans le corps. La fonction pulmonaire et l'intégrité du tissu dépendent du maintien des fluides. Selon les forces de Starling, la filtration des fluides dépend de 4 forces soit la pression hydrostatique du capillaire, la pression colloïdale osmotique du plasma, la pression du fluide interstitiel ainsi que la pression colloïdale osmotique du liquide interstitiel. En effet, tout facteur pouvant entraîner une augmentation de la pression colloïdale osmotique interstitielle ou de la pression hydrostatique du capillaire entraîne une entrée de liquide dans l'espace interstitiel et dans les alvéoles. Il est donc essentiel de préserver l'intégrité de la barrière épithéliale alvéolaire ainsi que l'endothélium des microvaisseaux. Les causes les plus fréquentes d'œdème pulmonaire sont une défaillance du ventricule gauche ou encore une maladie de la valve mitrale qui induit une augmentation de la pression capillaire et donc une accumulation de liquide dans l'espace interstitiel. De plus, un endommagement de la membrane capillaire pulmonaire par une infection telle qu'une pneumonie peut entraîner une fuite de protéines plasmatiques et donc une perte de liquide au niveau de l'espace interstitiel.

#### ***1.4 Endothélines et pathologies***

Puisque l'ET exerce de nombreuses fonctions biologiques, celle-ci pourrait être impliquée dans plusieurs pathologies cardiovasculaires. Étant donné que l'ET-1 a un effet vasoconstricteur puissant, le premier syndrome clinique impliquant ce peptide de façon pathologique fût l'hypertension pulmonaire (HTP). Par contre, il peut aussi être impliqué dans plusieurs autres pathologies telles que l'athérosclérose, le choc septique, la défaillance cardiaque ainsi que la défaillance rénale.

**Figure 8.** Les rôles pathologiques de l'endothéline-1 (106)



#### 1.4.1 Défaillance cardiaque et insuffisance cardiaque chronique (ICC)

La défaillance cardiaque est un syndrome clinique qui apparaît tardivement lors de maladies vasculaires telles que les maladies des artères coronaires. Cette défaillance est généralement accompagnée d'une augmentation généralisée de la résistance périphérique vasculaire qui résulte de l'activation de nombreux mécanismes de compensation. Plusieurs systèmes neurohormonaux systémiques sont activés progressivement afin de maintenir initialement l'éjection cardiaque, la perfusion des organes ainsi que l'homéostasie circulatoire. La diminution de la pression artérielle entraîne l'activation des barorécepteurs, des chémorécepteurs, de la réponse ischémique du système nerveux central, de l'axe rénine-angiotensine ainsi que de la vasopressine. Tous ces mécanismes induisent en quelques secondes une suractivation

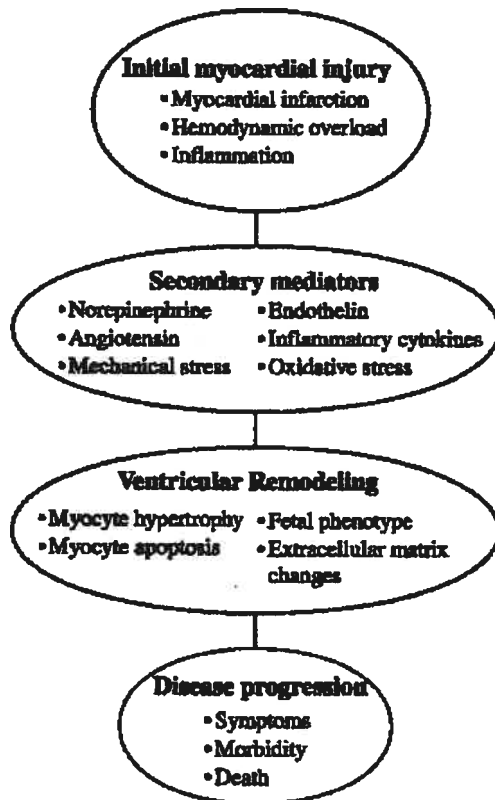
du système nerveux sympathique et une inhibition du système nerveux parasympathique. Toutefois, même si ce sont tous des mécanismes d'adaptation, ils peuvent tout de même induire une augmentation du volume en fin de diastole suite à une augmentation du tonus vasculaire périphérique délétère pour le cœur à long terme. Tous ces facteurs neurohormonaux entraînent une augmentation de la production d'ET-1 par les cellules endothéliales (107). Le rôle de l'ET dans la défaillance cardiaque est principalement dû à ses actions vasculaires et trophiques dans l'hypertrophie cardiaque. Chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique (ICC), les concentrations tissulaires d'ET-1 de même que l'activité de l'ECE-1 (108) (109) et les concentrations plasmatiques de la big ET sont augmentées au niveau des ventricules droit (110) et gauche (111) (112). Les concentrations plasmatiques de big ET-1 et d'ET-1 sont en relation directe avec la sévérité de la défaillance cardiaque et sont une indication du pronostic (111-113). Il semble que la densité des récepteurs ET<sub>A</sub> cardiaques soit aussi augmentée dans l'ICC (114). L'injection intraveineuse aiguë d'un antagoniste double comme le bosentan a induit plusieurs modifications hémodynamiques telles que des réductions de la pression artérielle moyenne, de la pression pulmonaire, de la pression de l'oreillette droite ainsi que des résistances vasculaires pulmonaire et systémique tout en induisant une augmentation de l'éjection cardiaque et du volume d'éjection (115). Chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique (ICC) et recevant initialement un traitement avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), l'administration d'un inhibiteur de l'ECE (116) ou encore d'un antagoniste ET<sub>A</sub> (117) (118) a induit une vasodilatation. Ces données démontrent bien que chez les patients souffrant d'ICC, l'ET-1 est responsable du maintien d'un tonus vasculaire élevé.



À court terme, la suractivation du système endothéline est bénéfique puisqu'elle procure un effet inotropique sur le coeur défaillant présentant une réponse  $\alpha$  ou  $\beta$ -adrénergique atténuée. Par contre, à long terme, cette suractivation peut entraîner une dysfonction de la structure et de la fonction du myocarde pour finalement induire une ICC.

**Figure 9. Principaux évènements dans la progression de la défaillance cardiaque**

(119)



#### *1.4.2 Hypertension pulmonaire associée à une pathologie cardiaque gauche (HTP)*

L'HTP est présente lorsque la pression pulmonaire artérielle systolique est supérieure à 30 mm Hg ou encore lorsque la pression artérielle pulmonaire moyenne est supérieure ou égale à 19 mm Hg. Une dysfonction ventriculaire gauche entraîne une élévation de la pression de remplissage du ventricule gauche qui induit à son tour une augmentation de la pression pulmonaire veineuse. Cette congestion pulmonaire veineuse est souvent accompagnée d'une augmentation de la RVP qui conduit progressivement à une hypertrophie ventriculaire droite. Plusieurs anomalies telles qu'une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs aux facteurs de croissance (VEGF) résultent de l'HTP. Un épaississement de la couche intimale des petites artères ainsi qu'une augmentation du nombre de couches élastiques des petites artérioles peuvent aussi être observés en condition d'HTP. L'HTP secondaire à un infarctus du myocarde est caractérisée par le remodelage que subissent les artères, l'anormalité des fibres élastiques, la fibrose de l'intima, l'hypertrophie de la media. Toutes ces modifications entraînent la rigidité vasculaire ainsi qu'une diminution de la réponse vasodilatatrice. De plus, l'HTP est caractérisée par une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses pulmonaires. Tous ces changements morphologiques altèrent l'endothélium vasculaire pulmonaire (120).

Le groupe de recherche de Cody a démontré que les patients souffrant d'ICC avaient des niveaux plasmatiques d'ET-1 très élevés qui corrélaient avec les hausses de pression artérielle pulmonaire et de RVP. Ces résultats suggèrent que l'ET-1 pourrait être un marqueur ou un médiateur de l'HTP secondaire à l'ICC.

Les niveaux élevés d'ET-1 dans l'ICC pourrait être le résultat d'une augmentation de la production et/ou une diminution de la clairance pulmonaire de ce peptide. Dupuis et ces collaborateurs ont démontré que l'ET-1 était produite et éliminée par les poumons tout en démontrant que le surplus d'ET corrélait avec la hausse de la RVP chez les patients souffrant d'ICC (65). Une augmentation de l'ARNm de la prépro-ET-1 ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'ET-1 dans les cellules endothéliales pulmonaires est observée chez les rats souffrant d'ICC et d'HTP (121). Par ailleurs, l'ET-1 pourrait être impliquée dans l'hypertrophie vasculaire (122) en stimulant le système angiotensine, en augmentant les concentrations locales de noradrénaline et en inhibant l'expression de la NOS (123).

### ***1.5 Traitements actuels de l'HTP***

L'étiologie de la maladie ainsi que la sévérité des dommages cardiaques et vasculaires déterminent le traitement optimal à utiliser. Les trois traitements spécifiques de l'HTP présentement approuvés par la FDA sont : une administration intraveineuse continue d'Epoprosténol (Flolan, prostacycline, prostaglandine I<sub>2</sub>) ; une administration sous-cutané continue de Tréprostinil (Remodulin, analogue de la prostacycline) ; ou encore une administration orale de Bosentan (Tracleer, antagoniste double des récepteurs à l'ET). Plusieurs autres médicaments tels que le sitaxsentan, le Béraprost ainsi que des inhibiteurs de la TxA<sub>2</sub>S sont présentement testés dans des études cliniques dans le but d'une éventuelle utilisation. La plupart des patients souffrant d'HTP reçoivent aussi les traitements conventionnels de la défaillance cardiaque soit des inhibiteurs de l'ECA, un  $\beta$ -bloqueur, un dérivé nitré, des diurétiques, des médicaments inotropiques ou encore des suppléments d'O<sub>2</sub> au besoin.

## ***1.6 Justification de l'étude***

Le système endothéline est la cible de nombreuses études scientifiques car en plus d'avoir plusieurs rôles physiologiques, ce système est activé dans plusieurs pathologies telles que les insuffisances cardiaque et rénale, l'hypertension pulmonaire veineuse, l'angine instable, l'infarctus du myocarde, la cirrhose ainsi que certaines formes de cancer. Plusieurs résultats ont confirmé l'activation et la contribution persistante de ce peptide dans le développement de l'HTP secondaire à une dysfonction ventriculaire gauche. L'utilisation d'un antagoniste simple ou double dans le traitement de cette pathologie demeure toujours un important sujet de débat. Plusieurs données expérimentales ont démontré l'implication du récepteur ET<sub>A</sub> dans la vasoconstriction et la prolifération cellulaire induites par l'ET-1. Par contre, le récepteur ET<sub>B</sub> a longtemps été considéré comme un récepteur entraînant une vasodilatation du muscle lisse par la relâche endothéliale de NO et de PGI<sub>2</sub>. Pourtant, depuis un certain temps déjà, ce rôle vasodilatateur est remis en question par plusieurs études qui démontrent que celui-ci est impliqué dans les effets délétères induits par l'ET-1 tels que la vasoconstriction, la prolifération cellulaire ainsi que la fibrose. Depuis les études cliniques réalisées en 2001, il a été démontré que le blocage des deux récepteurs à l'ET-1 par le bosentan s'avère un traitement efficace chez les patients souffrant d'HTP. Par contre, depuis un certain temps, plusieurs groupes de recherche prônent l'utilisation d'un antagoniste ET<sub>A</sub> sélectif (sitaxsentan) croyant qu'il est nécessaire de laisser le récepteur ET<sub>B</sub> libre d'exercer ses fonctions vasodilatatrices. Plusieurs études ont tenté d'évaluer le rôle exact de l'endothélium et des récepteurs à l'ET-1 afin d'apporter des réponses concrètes aux questions soulevées par ce débat et ainsi permettre de choisir le traitement optimal des patients

souffrant d'HTP. Par contre, la majorité des études précédentes ont été effectuées sur des artères de gros calibre ou encore sur des artères de résistance possédant un endothélium intact. Pourtant, ce sont majoritairement les artères de résistance qui sont responsables de l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire observée en situation d'HTP.

Ce projet de maîtrise avait pour but d'étudier et de caractériser la réponse pulmonaire globale ainsi que la réactivité vasculaire des artères pulmonaires de résistance.

- Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle des prostanoïdes et des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  dans la réponse pulmonaire globale.
- Par la suite, nous avons précisé notre évaluation en étudiant le rôle de l'endothélium ainsi que des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  dans la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaire. De plus, nous avons évalué la possibilité que les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  puissent former des dimères.
- Finalement, nous avons étudié les modifications de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 en situation d'insuffisance cardiaque.

Nos résultats nous ont fourni une meilleure compréhension de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 en situation contrôle et en situation pathologique. De plus, ces études nous ont permis d'évaluer l'efficacité relative des antagonistes (sélectif  $ET_A$  vs non-sélectif) des récepteurs de l'ET dans l'HTP.

## **2.0 Matériels et méthode**

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

### ***2.1 Modèles animaux***

Pour effectuer cette étude nous avons utilisé des rats mâles de race Wistar (250-300g) ainsi que des rats mâles de race Sprague-Dawley (200-250g). Ils provenaient tous d'un élevage local (Charles River, Saint-Constant, Québec). Les animaux étaient manipulés cinq jours après leur arrivée à l'animalerie du centre de recherche afin de leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement.

### ***2.2 Préparation des poumons isolés***

Pour effectuer cette étude, nous avons utilisé les rats de race Sprague-Dawley (200-250g). Les rats ont premièrement été anesthésiés avec un mélange de kétamine (Ketalean, 50 mg/Kg; Bimeda-MTC, Cambridge, Ontario) et de xylazine (Rompun, 10 mg/Kg; Bayer, Toronto, Ontario). Suite à la vérification d'une anesthésie complète par le réflexe lingual, 2000 U d'héparine (Hepalean; Organo Teknika, Toronto, Ontario) ont été administrés par injection intrapéritonéale. Par la suite, le diaphragme a été coupé et la trachée canulée avec un tube relié à un respirateur pour rongeur (Harvard Apparatus, Montréal, Québec). Le rat a été ventilé avec un volume de 1 mL d'air ambiant à 60 cycles/min et à une pression expiratoire positive finale de 2 cm H<sub>2</sub>O. Le coeur et les poumons ont été exposés après une thoracotomie médiane. L'artère pulmonaire a été canulée suite à une incision dans la portion supérieure du

ventricule droit. La perfusion du poumon a débuté par l'infusion d'une solution de Krebs. Cette solution physiologique était 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. La solution a été oxygénée (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), filtrée (filtre de 0.22 µm; Sarstedt, Newton, North Carolina) et son pH ajusté à 7.4. Par la suite, les poumons ont rapidement été isolés et suspendus dans une chambre ventilée et maintenue à 37°C avec de l'eau chaude. Ils ont par la suite été perfusés avec la solution de Krebs additionnée de 3% d'albumine à l'aide d'une pompe MasterFlex (Cole Palmer Instruments Co., Vernon Hill, Illinois) à un débit constant de 5mL/min. Le flot pulmonaire a constamment été évalué par une bague de débit (Transonic, Ithaca, New York) reliée à un appareil de mesure Transonic (modèle 208). La pression de perfusion pulmonaire a été mesurée par un transducteur de pression et enregistrée par le polygraphe Gould TA 4000.

Après une équilibration de 10 minutes, les changements de pression à des concentrations cumulatives d'ET-1 (9 nM à 30 nM) et de S6c (9 nM à 30 nM) ont été mesurés et enregistrés. La courbe dose-réponse à l'ET-1 a été effectuée en présence et en absence de méclofénamate (inhibiteur de la COX, 100 µM), d'un inhibiteur de lipoxgénase (A-85761.0, 10 µM), d'un antagoniste ET<sub>A</sub> (A-147627.1, 10 nM, 100 nM, 1 µM), d'un antagoniste ET<sub>B</sub> (A-192621.1, 1 µM, 100 µM) et d'un antagoniste non-sélectif (Bosentan, 1 µM, 10 µM, 100 µM). Afin de déterminer l'effet de la stimulation du récepteur ET<sub>B</sub>, une courbe dose-réponse à l'ET-1 a été effectuée en condition de tonus vasculaire augmenté (U-46619, analogue de la thromboxane A<sub>2</sub>, 0.1 µM) ainsi qu'en présence de l'antagoniste ET<sub>A</sub> (10 nM). Après chaque expérience, le lobe pulmonaire inférieur droit humide a été pesé puis conservé une semaine pour

obtenir son poids sec et ainsi établir le ratio poids sec / poids humide. Ceci a permis l'évaluation de la présence ou non d'œdème pulmonaire.

### ***2.3 Préparation des artères de résistance***

Pour effectuer cette étude, nous avons utilisé des rats mâles de race Wistar (250-300g). Les rats ont premièrement été anesthésiés avec un mélange de kétamine et de xylazine. Le poumon a ensuite été délicatement retiré de la cage thoracique et le lobe inférieur droit a été préservé dans une solution physiologique (PSS) composée de (mmol/L): NaCl 6.95; KCl 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18; MgSO<sub>4</sub> 1.17; NaHCO<sub>3</sub> 1.17; CaCl<sub>2</sub> 1.16; EDTA 0.023; glucose 10. Sous un microscope binoculaire (Nikon, modèle SMZ-10A), de petites artères pulmonaires ayant une longueur de 2mm et un diamètre de 150-200 µm ont été disséquées en prenant bien soin de ne pas endommager l'endothélium vasculaire. Deux fils de tungstène de 20 µm ont été insérés dans les segments d'artère puis fixés sur un myographe pour microvaisseaux (IMF, University of Vermont). Les artères ont par la suite été étirées en fonction de leur diamètre afin de leur donner une tension optimale telle que décrite par les études de Mulvany. Puisque toutes les artères possédaient un diamètre d'environ 150-200 µm, nous les avons toutes étirées jusqu'à l'obtention d'une tension de base d'environ 80-100 mg. Suite à une équilibration de 30 minutes à 37°C, dans du PSS oxygéné avec un mélange gazeux composé de 5% CO<sub>2</sub>, de 12% O<sub>2</sub> et d'une balance de N<sub>2</sub>, les artères ont été soumises à deux contractions subséquentes de 40 mmol/L KCl. Celles-ci ont permis de vérifier la viabilité de nos artères pulmonaires. La présence de l'endothélium vasculaire a aussi été vérifiée par l'ajout de 10 µM d'Ach. Pour les études sans endothélium, les artères ont été dénudées de leur endothélium en utilisant



un cheveu pour gratter l'intérieur du vaisseau. Nous avons, dans un premier temps, effectué des courbes doses réponses à l'ET-1 (0.1 nM à 0.3  $\mu$ M) et à la S6c (0.1 nM à 0.3  $\mu$ M) avec et sans la présence de l'endothélium. La courbe dose-réponse à la S6c a aussi été effectuée en présence de méclofénamate (inhibiteur des COX, 10  $\mu$ M) et de A-85761.0 (inhibiteur de la LOX, 10  $\mu$ M) alors que la courbe dose-réponse à l'ET-1 a aussi été effectuée en présence de A-147627.1 (antagoniste ET<sub>A</sub>, 10 nM), de A-192621.1 (antagoniste ET<sub>B</sub>, 1  $\mu$ M) ainsi que d'une combinaison des deux antagonistes. Pour chaque antagoniste, nous avons effectué des courbes doses-réponses à diverses concentrations afin de déterminer la concentration optimale de l'antagoniste à utiliser. Un lavage avec une solution physiologique (PSS) a suivi chaque expérience, ce qui a permis à l'artère de retrouver sa tension de base. À la fin de chaque expérience, l'artère a été stimulée avec une solution physiologique dépolarisante contenant 127 mM de KCl afin d'obtenir la contraction maximale.

#### ***2.4 Co-immunoprécipitation et western blot***

Pour effectuer cette étude nous avons utilisé des rats mâles de race Wistar (250-300g). Pour chaque condition expérimentale, nous avons disséqué et rassemblé de petites artères pulmonaires (n=24). Par la suite, nous avons effectué une extraction standard de protéine avec un tampon de lyse dénaturant ayant la composition suivante (mM): Tris-HCl pH 7.5 50,  $\beta$ -glycérophosphate 20, Sodium fluoride 20, EDTA 5, EGTA 10, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1, triton 1% v/v, cocktail d'inhibiteur de protéase: microcystéine 1  $\mu$ M, DTT 5 mM, leuptine 10  $\mu$ g/ml, PMSF 0.5mM et benzamidine 10 mM. Ces expériences ont aussi été réalisées en condition non-dénaturante avec le même tampon de lyse sans toutefois l'ajout du DTT. Nous avons ensuite fait une quantification

protéique en utilisant la technique de Bradford. Nous avons utilisé 100 µg de protéine pour chacun des échantillons auxquels nous avons ajouté du tampon de lyse afin de compléter le volume à 100 µl et 1 µl de l'anticorps au R-ET<sub>B</sub> (Biogenesis Ltd, 4113-3059, rat ET<sub>B</sub>-R amino acids 405-417, QTFEEKQSLEEKQ) ou 1 µl de l'anticorps au R-ET<sub>A</sub> (Abcam, ab1919, rat ET<sub>A</sub>-R amino acids 31-45, SSHVEDFTPFGTEF). Les échantillons ont ensuite été incubés à 4°C pendant 2 heures avec agitation. Pendant l'incubation, un tampon de lavage ayant la composition suivante : Tris 1.5 mM, triton 10%, H<sub>2</sub>O a été préparé. Nous avons alors effectué trois lavages des billes d'agarose (protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology) avant de les incuber à 4°C pendant 1 heure avec chacun des échantillons (20µl/échantillons). Suite à l'incubation, les billes ont été lavées trois fois avant l'ajout du tampon échantillon pour le Western blot.

Les protéines ont été séparées sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE avec un gradient 10-20% (w/v). Par la suite, les échantillons ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose à 100 V pendant 90 minutes et maintenus à 4°C dans un tampon ayant la composition suivante : 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 5% de méthanol. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 2 heures avec du lait 5% (Sigma) dans : 25 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl ainsi que 0.05% de Tween 20 (TBST). Les membranes ont été incubées pendant la nuit avec l'anticorps primaire (R-ET<sub>A</sub>) dilué à 1:1000 dans du lait 5% pour ensuite être lavées avec du TBST (3 X 10 minutes) et rebloquées dans une solution contenant du lait 5% et du TBST (1 X 10 min). Les membranes ont par la suite été incubées pendant 2 heures avec leur anticorps secondaire respectif dilué dans du lait 5% (horseradish peroxidase-conjugated, 1:20 000). Suite à un lavage intensif avec du TBST les bandes

ont été visualisées par chemiluminescence (Renaissance Plus, Perkin-Elmer Life Sciences) sur des films Bio-Max selon les instructions du manufacturier. Les anticorps ET<sub>A</sub> (Abcam, ab1919, rat ET<sub>A</sub>-R amino acids 31-45, SSHVEDFTPFGTEF) et ET<sub>B</sub> (Biogenesis Ltd, 4113-3059, rat ET<sub>B</sub>-R amino acids 405-417, QTFEEKQSLEEKQ) ont tous deux été synthétisés pour réagir avec des épitopes spécifiques et différents. De plus, la réactivité croisée de l'anticorps ET<sub>A</sub> a été testée puisque celui-ci n'a pas reconnu le récepteur ET<sub>B</sub> de la préparation des cellules endothéliales.

### ***2.5 Infarctus du myocarde***

Pour effectuer cette étude nous avons utilisé des rats mâles de race Wistar (250-300g, âgés de 7 ou 8 semaines). Le rat était premièrement anesthésié avec un mélange de 3% d'halothane et d'oxygène pur. Les rats ont alors été intubés et ventilés à un rythme de 70 cycles/minute (Harvard Apparatus, South Natick, MA) avec un volume tidal de 2 ml ainsi qu'une pression positive d'expiration de 2 cm d'H<sub>2</sub>O.

Le coeur a été exposé à l'aide d'une thoracotomie du côté gauche ainsi qu'une incision du péricarde. Une ligature de l'artère coronaire descendante antérieure a été effectuée à l'aide d'une soie 4-0 approximativement 2 mm après la bifurcation de l'artère coronaire principale. Suite à une injection sous-cutanée d'analgésique (Buprenorphine, 0.01 mg/Kg), l'incision a été refermée à l'aide d'une soie 2-0.

Lors du sacrifice, les rats ont été anesthésiés avec un mélange de kétamine (Ketalean, 50 mg/kg; Bimeda-MTC, Cambridge, Ontario) et de xylaxine (Rompun, 10 mg/kg; Bayer, Toronto, Ontario). Suite à la vérification d'une anesthésie complète par le réflexe lingual, 2000 U d'héparine (Hepalean; Organon Teknika, Toronto, Ontario) ont été administrés par injection intrapéritonéale. La veine jugulaire droite a été isolée,

incisée et canulée avec un cathéter Millar (2F courbé, 140 cm, Inter V medicals, Montréal, Canada) afin de mesurer la tension veineuse centrale (TVC) et la pression ventriculaire droite. Un deuxième cathéter, similaire au premier a été inséré dans l'artère carotidienne droite afin de mesurer la pression artérielle systémique et la pression ventriculaire gauche. Les mesures ont été enregistrées par un polygraphe Gould TA11 (Gould Electronics, Valley View, Ohio).

### ***2.6 Immunofluorescence confocale***

Les poumons de rat furent prélevés et immédiatement congelés puis immergés dans 2-methyl-butane (Sigma) et de l'azote liquide. Pour faire les coupes de 14  $\mu\text{m}$  au cryostat, le tissu a été orienté de façon à couper les artères transversalement. Les cryocoupes ont été fixées avec de la paraformaldéhyde (4%, pH 7.2) pendant 20 min et ensuite bloquées avec 2% de sérum normal d'âne (NDS, Jackson) et 0.5% de Triton X-100 (Sigma). Les anticorps dirigés contre les isoformes A ( $\text{ET}_A$ , lapin, Alomone) et B ( $\text{ET}_B$ , lapin, Alomone) du récepteur à l'endothéline ainsi que contre l'alpha-actine spécifique au muscle lisse (SMA, souris, Sigma) ont été incubés sur les coupes (dilués dans 1% de NDS et 0.1% de Triton X-100). L'incubation durait 16 heures à 4°C. Les anticorps secondaires dirigés contre le lapin (âne, Alexa555, Molecular Probes) et la souris (âne, Alexa 647, Molecular Probes) qui étaient dilués dans leur tampon de blocage respectif, ont été appliqués sur les coupes pendant 1 heure à la température ambiante dans le noir. Les tissus furent montés sur des lames de verre en utilisant 0.2% de DABCO (1.4-Diazabicyclo[2.2.2]-octane, Sigma) mélangé au glycérol dans un ratio de 1 pour 5 et scellés avec du vernis à ongle. Un tampon phosphate (NaCl 137 mM, KCl 2.7mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4mM) a été utilisé pour les lavages

suivant la fixation, pour la reconstitution des tampons de blocage et les diluants d'anticorps.

### *2.6.1 Microscopie confocale, déconvolution et quantification de la fluorescence*

Les lames ont été observées avec un microscope confocal LSM 510 (Zeiss) muni d'un objectif 63x/1.4 à immersion (Zeiss). Les fluorochromes Alexa 555 et Alexa 647 ont été excités à l'aide de Lasers HeNe1 (543nm) et HeNe2 (647nm) respectivement. Afin de visualiser l'autofluorescence des lames élastiques internes (IEL) et externes (EEL), le Laser Argon (488nm) a été employé et l'émission de l'autofluorescence captée entre 505nm et 530nm. Des séries d'images en Z ont été captées soit une image par tranche de 0.16  $\mu\text{m}$  pour respecter le théorème de Nyquist lequel détermine l'intervalle à respecter entre les tranches lors de la reconstruction de l'image. Cette fréquence d'acquisition, selon l'axe Z, permet la captation des images en vue d'une reconstruction en 3 dimensions sans aberrations optiques. Les séries en Z ont ensuite été déconvoluées avec le logiciel Huygens Professionnal 2.6.5a (Scientific Volume Imaging) en utilisant l'algorithme « Maximum Likelihood Estimation ». Finalement, des projections (vue de face) en 3 dimensions ont été produites à l'aide de la fonction « Projection » du logiciel LSM 510. Les images ont été sauvegardées sous le format TIFF. Dans le but de quantifier les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> selon leur localisation tissulaire, les lames basales internes (IEL) et externes (EEL) ont été sélectionnées comme frontières délimitant l'endothélium et la média, grâce au logiciel LSM510. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de la région non-masquée a été calculée sur toutes les images des séries en Z (image 8 bits, intensité allant de 0 à 255 unités de fluorescence) et une moyenne de toutes les MFI a ensuite été calculée.

## ***2.7 Composés utilisés***

L'ET-1 et la S6c provenaient tous deux de « American Peptide Company » (Sunnyvale, Californie) alors que le U-46619, l'Ach ainsi que le méclofénamate provenaient de « Sigma Chemicals » (St-Louis, Montana). L'anticorps du R-ET<sub>B</sub> provenait de « Biogenesis » alors que l'anticorps du R-ET<sub>A</sub> provenait de « Abcam » (Co-IP et western). Pour l'immunofluorescence confocale, l'anticorps du R-ET<sub>A</sub> et du R-ET<sub>B</sub> provenaient tous deux de « Alomone », alors que l'anticorps anti-SMA (smooth muscle actin, souris) provenait de « Sigma ». Les anticorps secondaires Anti-rabbit Alexa 555 (âne) et anti-mouse Alexa 647 (âne) provenaient tous deux de « Molecular Probes ». Le Ro 47-0203/001 (bosentan, antagoniste non-sélectif) nous a été gracieusement fourni par Actelion alors que le A-147627.1 (antagoniste ET<sub>A</sub>), le A-192621.1 (antagoniste ET<sub>B</sub>), et le A-85761.0 (inhibiteur de LOX) nous ont été gracieusement fournis par « Abott ».

## ***2.8 Évaluations statistiques***

Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne  $\pm$  E.S.M. Les différences entre les groupes de préparations de poumon isolé ont été analysées par une analyse de variance à mesure répétée (ANOVA) suivie d'une comparaison de groupes utilisant la correction de Bonferonni. Pour les artères de résistance, la courbe dose-réponse de chaque condition pharmacologique a été analysée avec une formule à cinq paramètres afin de déterminer la réponse maximale ainsi que la valeur de EC<sub>50</sub>. Les différences entre les groupes, pour ces paramètres, ont été analysées par un test *t* de Student non-pairé. Les différences entre les paramètres morphométriques et hémodynamiques des groupes Sham et ICC ont aussi été analysées par un test *t* non-pairé (two-tailed).

## ***2.9 Ethique***

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

### 3.0 Articles

#### 3.1 Accord des co-auteurs

##### 1. Identification de l'étudiant

Stéphanie Sauvageau  
2-525-1-0, Maîtrise en physiologie

##### 2. Description de l'article

Auteurs: Stéphanie Sauvageau, Éric Thorin, Alexandre Caron, Jocelyn Dupuis  
Contribution de l'étudiante : 95% de participation dans la réalisation des expériences et 100% dans l'écriture de la première version du papier

Titre: ET-1 induced pulmonary vasoreactivity: importance of receptors oligomers?

Revue à laquelle l'article a été soumis : Circulation

Date de soumission de l'article : 29 novembre 2005

##### 3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Stéphanie Sauvageau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation des mécanismes impliqués dans la vasoréactivité pulmonaire à l'endothéline-1

Jocelyn Dupuis

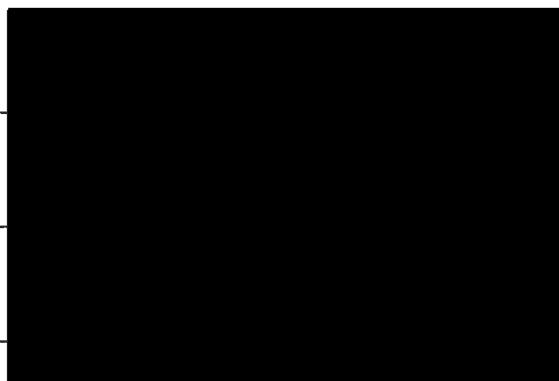
Co-auteur

Eric Thorin

Co-auteur

Alexandre Caron

Co-auteur





***3.2 Article #1: ET-1 Induced Pulmonary Vasoreactivity: Importance of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> Receptors Heterodimerization?***

**ET-1 Induced Pulmonary Vasoreactivity: Importance Of  
ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> Receptors Oligomers?**

Stéphanie Sauvageau; Éric Thorin, PhD; Alexandre Caron, MSc; Jocelyn Dupuis,  
MD, PhD

**Short Title:** Sauvageau et al. ET and pulmonary vasoreactivity

**Word Count:** 5 292

**Subject Heads: Etiology:** Pulmonary circulation and disease

**Treatment:** Cardiovascular Pharmacology

**Myocardial biology:** Pulmonary biology and circulation

**Vascular biology:** Endothelium/vascular type/nitric oxide

---

From the Research Center (S.S., E.T., A.C., J.D.), and the Faculty of Medicine (E.T., J.D.), Montreal Heart Institute and University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Jocelyn Dupuis, 5000 Belanger St East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel: 514-376-3330; Fax: 514-376-1355. E-mail:

████████████████████

## **Abstract**

**Background**-Roles of endothelin (ET) receptors (R) and of the endothelium on ET-1-induced pulmonary vasoreactivity are subjects of debate. This stems from endothelial ET<sub>B</sub>-R that can release vasodilators (nitric oxide and prostacyclin) as well as a vasoconstrictor (thromboxane A<sub>2</sub>).

**Methods and Results**-Pharmacological experiments were performed in isolated rat lungs and in resistance pulmonary arteries (150 to 200 μm). Oligomerization of receptors was evaluated by co-immunoprecipitation. In isolated lungs, ET-1 and sarafotoxin S6c induced similar vasoconstrictions. ET-1 constriction was reduced by meclofenamic acid ( $P=0.001$ ) and increased by the TxA<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor antagonist SQ 29,548 ( $P<0.001$ ). ET<sub>B</sub>-R antagonist had no effect while ET<sub>A</sub>-R antagonist reduced vasoconstriction ( $18\pm 8$  mm Hg,  $P<0.05$ ) and a dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>-R antagonist almost completely suppressed the response ( $6\pm 2$  mm Hg,  $P<0.001$ ). In precontracted lungs, ET<sub>B</sub>-R stimulation caused mild vasodilation at low concentrations, but severe vasoconstriction at higher concentrations. In isolated arteries, responses to ET-1 (Emax  $91\pm 4\%$ ) and S6c (Emax  $85\pm 4\%$ ) were not different and unaffected by removal of endothelium. Both ET<sub>A</sub>-R (10 nmol/L, Emax  $73\pm 6\%$ ) and ET<sub>B</sub>-R antagonists (1 μmol/L, Emax  $79\pm 2\%$ ) very mildly reduced ET-1 vasoconstriction. Their combination however greatly reduced both Emax ( $58\pm 3\%$ ,  $P<0.001$ ) as well as vascular sensitivity. We found co-immunoprecipitation of ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R.

**Conclusions**-Prostanoids contribute to ET-1 vasoconstriction in isolated lungs. There is a mild vasodilator role of the ET<sub>B</sub>-R only at low agonist concentration when baseline vascular tone is increased. The use of dual antagonism results in optimal blockade of vasoconstriction, possibly because the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors can form functional oligomers.

**Key Words:** endothelin ■ endothelium ■ receptors ■ lung ■ pharmacology

**Wordcount:** 248

The endothelin system (ET) is activated in pulmonary hypertension of all etiologies.<sup>1</sup> The therapeutic value of pharmacological blockade of endothelin receptors has been demonstrated in various animal models of pulmonary hypertension and led to the current approval and continued development of these drugs for the therapy of human pulmonary arterial hypertension.<sup>2</sup>

Among the chief actions of ET-1 is its ability to modulate pulmonary vascular reactivity. Although ET-1 is a recognized potent pulmonary vasoconstrictor, this peptide also has the ability, in certain experimental conditions, to cause mild vasodilation. This complex biology derives from the existence of 2 different ET-receptor (ET-R) subtypes. The ET<sub>A</sub>-R was characterized from bovine lungs<sup>3</sup> and the ET<sub>B</sub>-R was cloned from rat lungs.<sup>4</sup> In rat lungs, the proportion of these receptors is ~60% ET<sub>A</sub> and ~40% ET<sub>B</sub>.<sup>5</sup> The ET<sub>A</sub>-R demonstrates higher affinity for ET-1 than for the other isoforms ET-2 and ET-3, while the ET<sub>B</sub>-R associates equally with all 3 isoforms. Both the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R are present on vascular smooth muscle cells and induce direct vasoconstriction after stimulation.<sup>6</sup> The complexity of this system derives from the additional presence of endothelial cells ET<sub>B</sub>-R that have been demonstrated to play a dual role. They can induce vasodilation through the release of the vasodilators nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>),<sup>7</sup> but can also cause the release of the potent pulmonary vasoconstrictor thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>).<sup>8,9</sup>

Whether the net effect of either selective ET<sub>A</sub>-R receptor blockade (which would maintain the potential beneficial vasodilator effect of the endothelial

ET<sub>B</sub>-R) or non-selective ET<sub>A</sub>-R/ET<sub>B</sub>-R blockade (which would block all possible pathways of ET-induced vasoconstriction) provides greater benefit on ET-1 induced increase in pulmonary vascular tone remains a subject of debate.<sup>2</sup> The majority of previous studies evaluating the effects of ET on pulmonary vasoreactivity were performed either on large diameter pulmonary arteries that do not substantially contribute to pulmonary vascular resistance, or on small resistance arteries with an intact endothelium. No studies have previously systematically evaluated the role of prostanoids, of the endothelium and of the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R on ET-1 induced pulmonary vascular reactivity.

To tackle this problematic, we performed studies in isolated rat lungs as well as in small resistance pulmonary arteries with or without removal of the endothelium. We additionally explored the possibility that some of our functional findings could be explained by the presence of ET-R oligomers in small pulmonary arteries.

## **Materials and Methods**

The animal research and ethics committee of the Montreal Heart Institute approved the study protocol. Experiments were conducted according to guidelines from the Canadian council of animal care.

### **Isolated Rat Lungs**

Male Sprague-Dawley rats (200 to 250 g) were anesthetized by a mixture of ketamine and xylazine administered intramuscularly. The trachea was isolated, cannulated and connected to a rodent ventilator. After a midline sternotomy, the pulmonary artery was rapidly cannulated through an incision in the right ventricle. The lungs perfusion was initiated by infusion of a Krebs solution of the following composition (mM): NaCl 120; NaHCO<sub>3</sub> 25; KCl 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18; MgSO<sub>4</sub> 1.17; CaCl<sub>2</sub> 2.5 and glucose 5.5. Before each experiment, the Krebs solution was seeped through a 0.22  $\mu$ m filter (Sarstedt, Newton, NC) and adjusted to a pH of 7.4. The lungs were then rapidly removed and suspended in a water-jacketed chamber at 37°C to be perfused at a constant flow rate (10 ml/minutes) using a masterflex roller pump (Cole-Palmer Instruments Co., Vernon Hills, IL) with Krebs solution supplemented with 3% albumin. The pulmonary flow rate was constantly monitored with a flow probe (Transonic, Ithaca, NY). The pressures were also constantly recorded during the experiments.

After 10 minutes of equilibration, the changes in pressure to concentrations of ET-1 (9 nM to 30 nM) and sarafotoxin 6c (S6c, 9 nM to 30 nM) were measured with and without cyclooxygenase inhibition with meclofenamic acid (100  $\mu$ M), lipoxigenase inhibition with A-85761.0 (10  $\mu$ M), TxA<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor inhibition with SQ 29,548 (100  $\mu$ M), the ET<sub>A</sub>-R antagonist A-147627.1 (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M), the ET<sub>B</sub>-R antagonist A-192621.1 (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) and in the presence of the non-selective ET-R

antagonist Bosentan (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M). At the end of each experiment, the pulmonary right inferior lobe wet weight and dry weights were determined as an indication of the presence of pulmonary oedema.

In order to further evaluate the effect of ET<sub>B</sub>-R stimulation, concentration-response curves to ET-1 were performed in conditions of increased basal pulmonary vascular tone and with simultaneous ET<sub>A</sub>-R blockade. After lung isolation, 10 nM of the ET<sub>A</sub> antagonist was added to the perfusate and after 30 minutes of equilibration, baseline perfusion pressure was noted. The lungs were then pre-constricted with 100 nM of U-46619 and when a steady level of perfusion pressure was reached (10 minutes), concentration-response curves to ET-1 were performed.

### **Isometric Recording of Tension of Isolated Micro Vessels**

Experiments were conducted on isolated pulmonary arteries of male Wistar rats using a microvascular myograph. Intralobar arteries were dissected under a microscope and cleaned of surrounding parenchyma. The vessels were 1 to 2 mm long and 150 to 200  $\mu$ m diameter. They were set up on a myograph with a resting tension of 80 to 100 mg and bathed in a physiological salt solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 6.95; KCl 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18; MgSO<sub>4</sub> 1.17; NaHCO<sub>3</sub> 1.17; CaCl<sub>2</sub> 1.16; EDTA 0.023; glucose 10. The arteries were equilibrated for 30 minutes at 37°C in PSS and bubbled with 5% CO<sub>2</sub>, 12% O<sub>2</sub> and balance in N<sub>2</sub>. For each vessel, the integrity of the endothelium was determined by testing endothelium-dependent vasodilation

to Ach (100  $\mu$ M). Maximal vasoconstriction to 127 mM KCl was also determined for each vessel. Preparations were subjected to cumulative concentration-response curves with ET-1 (0.1 nM to 0.3  $\mu$ M) and S6c (0.1 nM to 0.3  $\mu$ M) with or without removal of the endothelium. The S6c concentration-response curve was also assessed in the presence of meclofenamic acid (10  $\mu$ M) and A-85761.0 (10  $\mu$ M) whereas the ET-1 concentration response curve was assessed in the presence of A-147627.1 (10 nM), A-192621.1 (1  $\mu$ M) and a combination of A-147627.1 and A-192621.1.

### **Co-Immunoprecipitation of ET-R**

Small intralobar pulmonary arteries from the pulmonary right inferior lobe were obtained as described above and pooled (n=24 arteries) for each experimental condition. Standard protein extraction was assessed using 2 different lysis buffers. The denaturing buffer had the following composition (mM): Tris-HCl pH 7.5 50, b-glycerophosphate 20, sodium fluoride 20, EDTA 5, EGTA 10, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1, triton 1% v/v, protease inhibitor cocktail: microcystin 1  $\mu$ M, DTT 5 mM, leupeptin 10  $\mu$ g/ml, PMSF 0.5 mM and benzamidin 10 mM. The non-denaturing buffer had the same composition although without the addition of the DTT. The protein extraction was followed by protein quantification using the Bradford analysis technique. A total of 100  $\mu$ g proteins from each sample were completed with lysis buffer to a volume of 100  $\mu$ l and 1  $\mu$ l of ET<sub>B</sub>-R antibody (Biogenesis) or ET<sub>A</sub>-R antibody (Abcam) was added. The sample was then incubated at 4°C for 2



hours with agitation. While the samples were incubating with the first antibody, a washing buffer containing Tris 1.5 mM and triton 10% H<sub>2</sub>O was prepared. Three washing of agarose beads (protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology) were carried out before they were incubated with each sample (20  $\mu$ l/sample) at 4°C for 1 hour with agitation. The samples were then washed thrice before the addition of sample buffer (containing no beta-mercaptoethanol for the non-denaturing samples) and preparation for immunoblotting.

#### **Immunoblotting for the ET<sub>A</sub>-R**

Proteins were separated on 10% to 20% (W/v) acrylamide gradient SDS-PAGE. Following SDS-PAGE, samples were transferred at 100 V and 4°C for 90 minutes onto nitrocellulose membranes in a buffer containing 25 mM Tris base, 192 mM glycine, and 5% methanol. Membranes were blocked for 2 hours using a solution of 5% skimmed milk powder (Sigma) in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20 (TBST). Membranes were incubated overnight at 4°C with the primary anti ET<sub>A</sub>-R antibodies, diluted 1: 1000 in 5% skimmed milk in TBST, washed with TBST (3  $\times$  10 minutes), reblocked with 5% non-fat milk in TBST (1  $\times$  10 minutes), and incubated for 2 hours with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit anti-ET, Sigma) diluted in 1: 20 000 in 5% non-fat milk powder. Following extensive washing with TBST, immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence's (Renaissance Plus, Perkin-

Elmer Life Sciences) according to the manufacturer's instructions using Bio-Max film.

### **Study Drugs**

The following drugs were used: ET-1 (American peptide), S6c (American peptide), meclofenamic acid SQ 29,548 (Sigma). Bosentan (non-selective ET-R antagonist) was kindly provided by Actelion. The compounds A-147627.1 (ET<sub>A</sub>-R antagonist), A-192621.1 (ET<sub>B</sub> antagonist), and A-85761.0 (Lipoxygenase inhibitor) were kindly provided by Abbott Laboratories.

### **Statistical Analyses**

All values are expressed as mean±SEM. Differences between groups for the isolated perfused lungs concentration-response curves were evaluated by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by multiple groups comparisons using Bonferroni's correction. For each pharmacological condition on each isolated artery, the isometric recording of the concentration-response curves were fitted using a 5-parameter logistic fit to determine the maximal responses as well as the EC50 values. For these parameters, the differences between groups were evaluated with an unpaired student *t* test. Statistical significance was assumed when  $P < 0.05$ .

## Results

### Isolated Perfused Rat Lungs Preparation

In isolated lungs, both ET-1 (delta pressure  $37\pm 6$  mm Hg) and S6c ( $36\pm 8$  mm Hg) induced important and similar increase in perfusion pressure (Figure 1A). Cyclooxygenase inhibition with meclofenamic acid partially antagonized ET-mediated vasoconstriction ( $20\pm 2$  mm Hg,  $P=0.001$ ) whereas the lipoxygenase inhibitor A-85761.0 had no significant effect (Figure 1A). The  $\text{TxA}_2$ /prostaglandin  $\text{H}_2$  receptor antagonist increased ET-1-induced vasoconstriction to  $58\pm 3$  mm Hg ( $P<0.001$ ). The  $\text{ET}_A$ -R antagonist A-147627.1 significantly reduced ET-1-induced pulmonary vasoconstriction ( $18\pm 2$  mm Hg, Figure 1B), the effect being already maximal at the lowest tested concentration of 10 nM. The  $\text{ET}_B$ -R antagonist A-192621.1 had no significant effect although it tended to potentiate ET-1 vasoconstriction at the lowest tested concentration of 1  $\mu\text{M}$  (Figure 1C). Bosentan, a dual ET-R antagonist, dose-dependently reduced ET-1-induced pulmonary vasoconstriction down to  $6\pm 2$  mm Hg ( $P=0.001$ , Figure 1D).

Both ET-1 and S6c provoked similar severe pulmonary edema (Figure 2B). In addition to their effects on ET-1-induced pulmonary vasoconstriction, the use of meclofenamic acid and bosentan also prevented the development of pulmonary edema. The lipoxygenase inhibitor, the  $\text{TxA}_2$ /prostaglandin  $\text{H}_2$  inhibitor, the  $\text{ET}_A$ -R antagonist or the  $\text{ET}_B$ -R antagonist alone were however unable to prevent this complication.

In conditions of augmented basal pulmonary vascular tone and in the presence of ET<sub>A</sub>-R blockade with A-147627.1 (10 nM), low concentrations of ET-1 (1 pM to 1 nM) induced mild vasodilation with a reduction of the delta perfusion pressure from 5.5±1.0 to 1.5±0.7 mm Hg. Subsequent higher ET-1 concentrations (1 nM to 30 nM) however markedly increased perfusion pressure up to 70 mm Hg (Figure 3).

### **Isometric Recording of Tension of Isolated Micro Vessels**

In isolated arteries, the vasoconstriction induced by ET-1 (E<sub>max</sub> 93±3%, EC<sub>50</sub> 11.0±2.2 nM) and S6c (E<sub>max</sub> 85±4%, EC<sub>50</sub> 5.0±1.6 nM) were also similar. Removal of the endothelium did not significantly modify the maximal response to ET-1 (78±6%, Figure 4A) or S6c (91±4%, Figure 4B) and also did not affect EC<sub>50</sub> values. Cyclooxygenase inhibition and lipoxygenase inhibition did not modify the response (Figure 4C).

Both the ET<sub>A</sub>-R antagonist (Figure 5A) and the ET<sub>B</sub>-R antagonist (Figure 5B) dose-dependently reduced ET-1 vasoconstriction. To explore potential receptor interactions, experiments were performed by combining weakly effective doses of these selective antagonists. The results are presented in Figure 6. Both the ET<sub>A</sub>-R (10 nM, E<sub>max</sub> 73±6%) and the ET<sub>B</sub>-R antagonists alone (1 μM, E<sub>max</sub> 79±2%) very mildly reduced ET-1 vasoconstriction without affecting vascular sensitivity (EC<sub>50</sub> ~4 nM). The combination of both antagonists however greatly reduced the maximal response (E<sub>max</sub>

57.7±3.0%,  $P < 0.001$ ) as well as the vascular sensitivity to ET-1 ( $EC_{50} > 1 \mu\text{M}$ ).

### **ET-R Expression in Pulmonary Arteries After Immunoprecipitations**

The objective of these studies was to determine if the  $ET_A$ -R and the  $ET_B$ -R could form oligomers in small pulmonary arteries. In denaturing condition, when the  $ET_A$ -R was immunoprecipitated, the immunoblot for  $ET_A$ -R expression revealed a large and elongated band indicative of the abundance of receptor protein (Figure 7). When the  $ET_B$ -R was immunoprecipitated, a narrow band for the putative  $ET_A$ -R was expressed at 48.42 kDa, demonstrating that the  $ET_A$ -R co-immunoprecipitated with the  $ET_B$ -R. A negative control experiment carried out in porcine aortic endothelial cells lacking the  $ET_A$ -R confirmed the absence of detectable  $ET_A$ -R after immunoprecipitation of the  $ET_B$  receptor. We additionally excluded the possibility that the observed band for the  $ET_A$ -R could represent the heavy chain of the immunoprecipitation antibody, and also obtained no detectable band (data not shown). These results suggest that the  $ET_A$ -R and  $ET_B$ -R can form oligomers in small pulmonary arteries.

Confirmatory co-immunoprecipitation experiments were therefore performed after immunoprecipitation of the  $ET_B$ -R in non-denaturing conditions (Figure 8A). Immunoblot for the  $ET_A$ -R in pulmonary arteries revealed 2 higher molecular weight bands suggesting that  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors can form heterodimers (100.14 kDa) as well as heterotrimers (165.27 kD). A negative control experiment carried out in porcine aortic endothelial cells

again revealed no detectable band confirming the absence of oligomers on these cells. To further verify the efficacy of immunoprecipitation of the ET<sub>B</sub> receptor, the membranes were stripped and incubated with the ET<sub>B</sub> receptor antibody (Figure 8B). The endothelial preparation reveals a single putative ET<sub>B</sub> receptor band at 44.31 KDa. In pulmonary arteries we again found 2 detectable bands at 100.14 kDa and 165.27 kDa confirming the presence of the ET<sub>B</sub> receptors in the formation of heterodimers and heterotrimers.

## **Discussion**

The aim of this study was to elucidate the roles of the endothelium, of prostanoids, and of the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors on ET-1-induced pulmonary vasoreactivity. Previous studies separately evaluating these processes have raised the potential modulator role of NO, PGI<sub>2</sub> and TxA<sub>2</sub> after stimulation of the endothelial ET<sub>B</sub>-R.<sup>1</sup> In addition to this dual “vasodilator-vasoconstrictor” role of the ET<sub>B</sub> receptor, the proportion and distribution of pulmonary ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R, which has been shown to vary along the pulmonary vascular tree,<sup>10</sup> could also modify the vasoreactivity to ET-1. These factors could by themselves explain the sometimes incongruous results of vasoreactivity studies depending on the preparations used (isolated lungs, large arteries or small arteries or veins), and have generated a scientific debate pertaining to the optimal use of ET-R antagonists for conditions associated with increased pulmonary vascular tone. To tackle this problematic, we systematically evaluated ET-1-induced vasoreactivity in isolated lungs as well as in small

pulmonary arteries, the latter enabling the study of predominant resistance vessels with and without removal of the endothelium.

Our major findings are: 1) that selective ET<sub>B</sub>-R stimulation with S6c causes important vasoconstriction commensurate to that of stimulation with ET-1 alone in both isolated lungs and small arteries; 2) that removal of the endothelium does not affect ET-1 or S6c responses in small arteries; 3) that cyclooxygenase products contribute to ET-1 induced pulmonary vasoconstriction in isolated lungs, but not in small pulmonary arteries; 4) that in conditions of increased baseline vascular tone, ET<sub>B</sub>-R stimulation causes mild vasodilation at low agonist concentration but severe vasoconstriction with higher doses; 5) that combination of minimally effective doses of selective ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R antagonists results in near maximal inhibition of ET-1-induced vasoconstriction; and finally that 6) the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R exist as oligomers in small pulmonary arteries.

### **Role of Prostanoids in ET-1-Induced Pulmonary Vasoconstriction**

Previous investigators have firmly established that ET-1 releases cyclooxygenase products in isolated lungs.<sup>8,11,12</sup> Studies on the mechanisms of ET-1-induced pulmonary vasoconstriction in guinea pig and rat lungs recognized that ET-1 was a potent predominant pulmonary venous constrictor causing associated pulmonary oedema, these effects being reduced by a TxA<sub>2</sub> antagonist<sup>11,13</sup> This is consistent with other studies in isolated small pulmonary arteries and veins demonstrating that ET-1 was a predominant

pulmonary vasoconstrictor, with attenuation of the response by indomethacin in veins only.<sup>14</sup> The present experiments performed in isolated small pulmonary arteries accordingly failed to reveal any modulatory role of prostanoids or of the endothelium on ET-1 and S6c responses. Our study in isolated lungs however confirmed the role of cyclooxygenase products on ET-1 induced vasoconstriction in the intact organ. The TxA<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor antagonist SQ 29,548 however did not reduce but rather increased ET-1 induced vasoconstriction in isolated lungs. In a previous study, the same compound effectively reduced ET-1 induced pulmonary vasoconstriction in guinea pig lungs<sup>11</sup> suggesting the importance and variability of the lung prostanoid system between species. Interestingly and in accordance with a predominant vasoconstrictor effect, meclofenamic acid and the ET<sub>B</sub>-R antagonist also prevented the development of pulmonary oedema while the ET<sub>A</sub>-R antagonist alone did not. Collectively, these results suggest that cyclooxygenase products released from pulmonary veins contribute to pulmonary vasoconstriction and the development of pulmonary oedema but that their relative importance may vary between species and remains to be demonstrated in man. It is however also well acknowledged that ET-1 is a potent pulmonary bronchoconstrictor and that cyclooxygenase products modulate this response.<sup>15</sup> A bronchial origin of prostanoids therefore cannot be excluded.



### **Dual Roles of the ET<sub>B</sub> Receptor on Pulmonary Vasoreactivity**

We also sought to evaluate and dissect out the dual vasodilator/vasoconstrictor actions of the ET<sub>B</sub>-R in the pulmonary circulation. In both isolated lungs and isolated small arteries, selective ET<sub>B</sub>-R stimulation with S6c caused important vasoconstriction, similar to that of ET-1 stimulation. Equally important ET<sub>B</sub>-R dependent vasoconstriction in response to S6c was previously reported in isolated resistance rat pulmonary arteries.<sup>6,16</sup> These results are however in clear contrast with those we obtained in isolated lungs since the selective ET<sub>B</sub>-R antagonist not only did not reduce the response to ET-1, but tended to enhance it! To isolate the effects of ET<sub>B</sub>-R stimulation, we performed concentration-response curves to ET-1 in the presence of ET<sub>A</sub>-R blockade and when baseline pulmonary vascular tone was increased by the TxA<sub>2</sub> analog U-46619. Under these conditions, ET<sub>B</sub>-R stimulation caused mild vasodilation at low ET-1 concentrations, but very severe vasoconstriction at higher concentrations.

Our results therefore confirm both the vasodilator and vasoconstrictor roles of the ET<sub>B</sub>-R and shed new light on the overall balance of these effects in rat lungs. We found that reactivity findings can yield different results whether the ET<sub>B</sub>-R is stimulated or inhibited. A predominant overall vasoconstrictor role for the ET<sub>B</sub>-R is evident during stimulation. A mild vasodilator role can be seen only when baseline tone is increased and at low agonist concentrations.<sup>17,18</sup> or when the ET<sub>B</sub>-R is selectively blocked. This potentially “protective” role of the ET<sub>B</sub>-R may therefore be relevant to pathologic

conditions and the significance of this latter finding was previously suggested in the monocrotaline and hypoxic models of pulmonary hypertension, as selective ET<sub>B</sub> antagonists could acutely deteriorate vascular tone.<sup>19,20</sup> The initial vasodilation seen at low ET<sub>B</sub>-R agonist concentration has been attributed to endothelial ET<sub>B</sub>-R stimulation with subsequent release of vasodilators (nitric oxide and prostacyclin).<sup>17,21</sup> We however did not observe any effect of endothelium removal on ET-1 or S6c responses in isolated small arteries, again suggesting that the vasodilator effect of the ET<sub>B</sub>-R may originate from other parts of the vascular tree, possibly pulmonary veins. Our findings that selective ET<sub>B</sub>-R inhibition reduced ET-1-induced vasoconstriction in small isolated arteries, but tended to increase it in isolated lungs are compatible with this hypothesis. Importantly, we found that combined ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R blockade in isolated lungs as well as in small arteries resulted in the most complete inhibition of vasoconstriction without any deleterious effects even at lower antagonist concentrations.

### **Functional Importance of ET-R Oligomers in the Lungs?**

Some findings of the present study are difficult to conciliate with classical receptor biology and pharmacology. In the past, some investigators have evoked the possibility of additional ET-R subtypes or of receptors “crosstalk” in an effort to explain all of their findings. Both the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R belong to the G-protein-coupled receptors family (GPCR). In recent years, the dogma that GPCR function as monomeric proteins has been challenged by numerous

studies demonstrating that they can exist as dimers or even higher-structure oligomers. The formation of oligomers could modulate receptor function by regulating ligand binding, signalling as well as receptor trafficking properties.<sup>22</sup> The oligomerization could alter how a receptor functionally responds to a ligand, such that the antagonist of one receptor can now positively augment the action of the agonist of the associated receptor.<sup>23</sup> Moreover, there has been new evidence that ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R can form constitutive homodimers and heterodimers in transfected HEK293 cells with indication of functional activity of the heterodimers.<sup>24,25</sup> The pharmacological importance of ET-R heterodimers has also been recently suggested in the anterior pituitary gland.<sup>26</sup> We accordingly hypothesized that this recently demonstrated oligomerization of ET-Rs could explain the 2 apparent functional paradigms observed in this study: 1) that in isolated lungs and isolated arteries ET<sub>B</sub>-R stimulation with S6c causes important vasoconstriction while selective ET<sub>B</sub>-R antagonist in isolated lungs tends to increase ET-1-induced vasoconstriction; 2) that in isolated arteries, combination of minimally effective doses of selective ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R antagonists results in near maximal inhibition of ET-1-induced vasoconstriction.

We therefore evaluated if ET-Rs could exist as oligomers in the pulmonary circulation. Immunoprecipitation of the ET<sub>B</sub> receptor and western blotting for the expression of the ET<sub>A</sub>-R confirmed that the receptors could form heterodimers and even heterotrimers in small pulmonary arteries. The

functional implications of ET-R oligomers in the pulmonary circulation remains highly speculative at this point, but to explain part of our findings we can evoke that blockade of only one of the 2 receptors could still induce vasoconstriction through compensation and signalling by the receptor not targeted by the antagonist. This is supported by the more complete inhibition of the ET response by a combination of both antagonists. Furthermore, ET-R oligomerization could provide for a pharmacologic complexity that could conciliate some previously published findings.

### **Limitations of this Study**

The proportions of ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R in different segments of the pulmonary circulation can vary between species and can be affected by pathologic conditions. The present findings, observed in the normal rat lungs, would therefore require validation in humans and further evaluation in pathologic conditions. Although the selective of ET-R antagonists used in this study had high selectivity for their respective receptors, some selectivity is lost when these drugs are used in high concentrations and dual ET-R blockade may occur.

### **Conclusions**

Prostanoids contribute to ET-1 vasoconstriction in isolated lungs but not in small pulmonary arteries, suggesting that ET-1 stimulates the release of a vasoconstrictor from the pulmonary veins or bronchial tree. There is a mild pulmonary vasodilator role of the ET<sub>B</sub>-R seen only at low agonist

concentrations and when baseline vascular tone is increased. The use of dual ET-R antagonism results in optimal blockade of pulmonary vasoconstriction, possibly because the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors can form functional oligomers.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada. Dr. Jocelyn Dupuis is a National Researcher and Dr. Eric Thorin is a senior scholar from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec”.

### **Conflict of interests**

There is no conflict of interests to disclose.

## References

1. Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:542-554.
2. Channick RN, Sitbon O, Barst RJ, Manes A, Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:62S-67S.
3. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor [see comments]. *Nature.* 1990;348:730-732.
4. 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 [see comments]. *Nature.* 1990;348:732-735.
5. Jasmin JF, Cernacek P, Dupuis J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ET<sub>A</sub> receptor blockade. *Clin Sci (Lond).* 2003;105:647-653.
6. MacLean MR, McCulloch KM, Baird M. Endothelin ET<sub>A</sub>- and ET<sub>B</sub>-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;23:838-845.
7. de Nucci G, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1988;85:9797-9800.

8. D'Orleans-Juste P, Claing A, Telemaque S, Maurice MC, Yano M, Gratton JP. Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A<sub>2</sub> from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ET<sub>B</sub> receptor antagonist, BQ-788. *Br J Pharmacol.* 1994;113:1257-1262.
9. Lewis K, Cadieux A, Rae GA, D'Orleans-Juste P. L-NAME potentiates endothelin-stimulated thromboxane release from guinea pig lung. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31(Suppl 1):S109-S111.
10. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J. ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:398-405.
11. Horgan MJ, Pinheiro JM, Malik AB. Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. *Circ Res.* 1991;69:157-164.
12. Faltin DL, Weber A, Lacroix JS, Jorge-Costa M, Morel DR. Lung mechanics and pulmonary but not systemic vascular responses to ET-1 are Tx and infusion rate dependent. *J Appl Physiol.* 1996;80:1716-1723.
13. Aharinejad S, Schraufnagel DE, Miksovsky A, Larson EK, Marks SC Jr. Endothelin-1 focally constricts pulmonary veins in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110:148-156.
14. Toga H, Ibe BO, Raj JU. In vitro responses of ovine intrapulmonary arteries and veins to endothelin-1. *Am J Physiol.* 1992;263:L15-L21.

15. Battistini B, Filep J, Sirois P. Potent thromboxane-mediated in vitro bronchoconstrictor effect of endothelin in the guinea-pig. *Eur J Pharmacol.* 1990;178:141-142.
16. McCulloch KM, Docherty C, MacLean MR. Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol.* 1998;123:1621-1630.
17. Lal H, Woodward B, Williams KI. Investigation of the contributions of nitric oxide and prostaglandins to the actions of endothelins and sarafotoxin 6c in rat isolated perfused lungs. *Br J Pharmacol.* 1996;118:1931-1938.
18. Eddahibi S, Springall D, Mannan M, Carville C, Chabrier PE, Levame M, Raffestin B, Polak J, Adnot S. Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia. *Am J Physiol.* 1993;265 (Pt 1):L571-L580.
19. Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ET<sub>B</sub> receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000;13:135-140.
20. Muramatsu M, Oka M, Morio Y, Soma S, Takahashi H, Fukuchi Y. Chronic hypoxia augments endothelin-B receptor-mediated vasodilation in isolated perfused rat lungs. *Am J Physiol.* 1999;276:L358-L364.
21. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;91:1367-1373.



22. Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 2004;5:30-34.
23. Gomes I, Gupta A, Filipovska J, Szeto HH, Pintar JE, Devi LA. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:5135-5139.
24. Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W, Oksche A. Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44:S30-S33.
25. Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem.* 2004;279:27679-27687.
26. Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub> receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol.* 2002;22:207-226.

## Figure Legends

**Figure 1.** Endothelin-1 (ET-1) and sarafotoxine 6c (S6c) induced pulmonary vasoconstriction of isolated rat lungs perfused at constant flow rate. MEC, meclofenamic acid; LOX, lipoxygenase inhibitor; ant, antagonist; Bos, dual ET-R antagonist Bosentan; SQ 29,548 TxA<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor antagonist: n=6-8/group. \**P*<0.001, †*P*<0.01, ‡*P*<0.05 versus ET-1 curve for graph A, and versus control curve for graphs B, C and D. Values are mean±SEM.

**Figure 2.** Effect of ET-1 and S6c and of various antagonists on the development of pulmonary oedema as measured from the dry/wet lung weight ratio. n=6-8/group. \**P*<0.001, ‡*P*<0.05 versus control. Values are mean±SEM.

**Figure 3.** Effects of selective ET<sub>B</sub>-R stimulation on vasoreactivity of isolated rat lungs in the presence of increased basal pulmonary vascular tone and with selective ET<sub>A</sub>-R blockade (10 nM). The changes in pulmonary perfusion pressure (delta pressure) induced by U-46619 and after cumulative concentration-response curve to ET-1 are presented (n=5). Values are mean±SEM.

**Figure 4.** ET-1 (graph A) and S6c (graph B) induced vasoconstriction of isolated pulmonary resistance arteries with (endo+) or without (endo-) vascular endothelium. Graph C: Effect of lipoxygenase (Lox) and cyclooxygenase inhibition with meclofenamic acid (Mec) on cumulative concentration-response curve to S6c. n=5-7/group. Values are mean±SEM.

**Figure 5.** Effect of increasing concentrations of selective ET<sub>A</sub>-R (graph A) and selective ET<sub>B</sub>-R antagonist on ET-1-induced vasoconstriction of pulmonary resistance arteries. n=2-6/group. †*P*<0.01, ‡*P*<0.05 versus control. Values are mean±SEM.

**Figure 6.** Effect of the combination of mildly effective doses of selective ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R antagonists on ET-1-induced vasoconstriction of pulmonary resistance arteries. n=6-7/group. \**P*<0.001, ‡*P*<0.05 versus control. Values are mean±SEM.

**Figure 7.** Co-immunoprecipitation of ET-Rs in denaturing conditions. Immunoblot for the ET<sub>A</sub>-R was performed after immunoprecipitation of the ET<sub>A</sub>-R or ET<sub>B</sub>-R (right lane) in resistance pulmonary arteries. Endothelial cells (endo, left lane) were used as a negative control.

**Figure 8.** Co-immunoprecipitation of ET-Rs in non-denaturing conditions. Two left lanes: Immunoprecipitation of the ET<sub>B</sub>-R followed by immunoblot for the ET<sub>A</sub>-R in resistance pulmonary arteries (right lane) and endothelial cells (endo, left lane) as a negative control. Two right lanes: after stripping of the same membrane, immunoblot for ET<sub>B</sub>-R was performed and confirms the presence of this receptor in endothelial cells (left lane, positive control) as well as in the 2 higher molecular weight bands in resistance pulmonary arteries (right lane).

Figure 1.

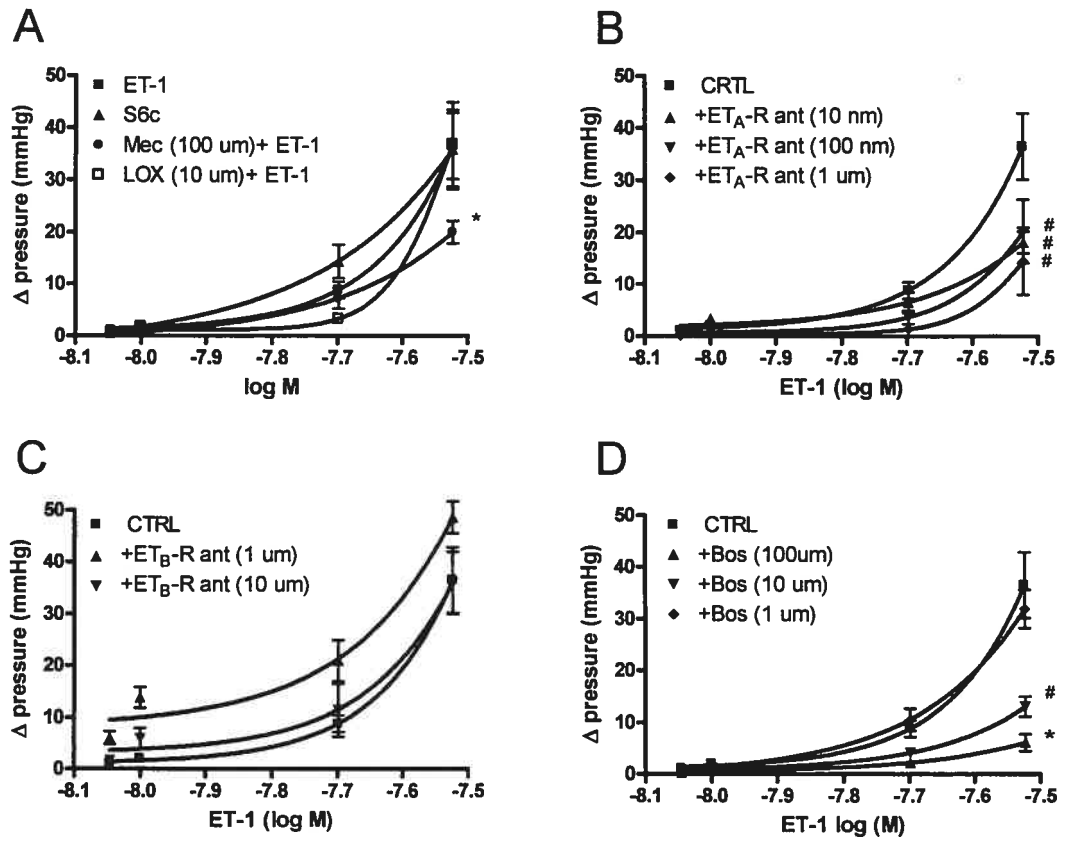


Figure 2.

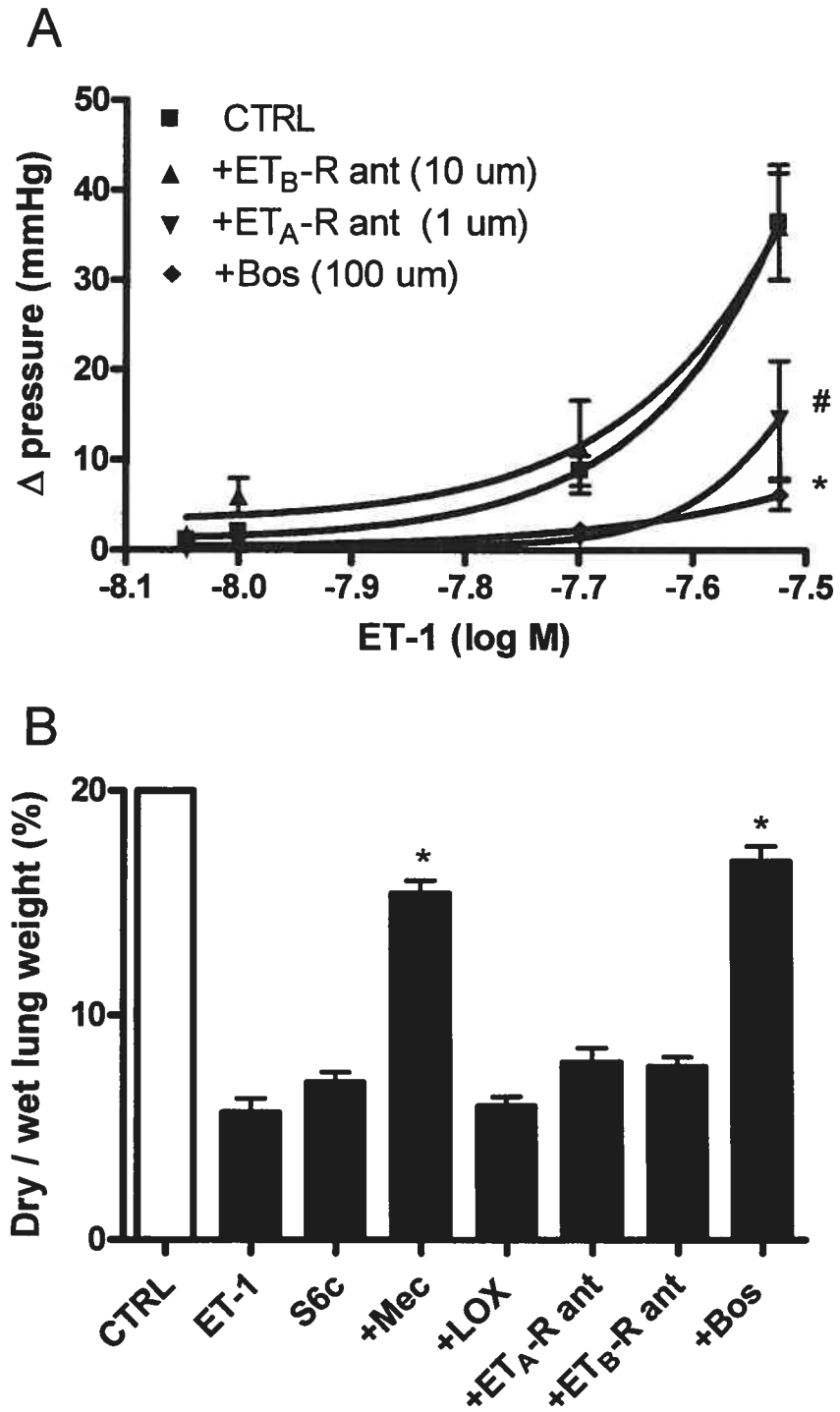


Figure 3.

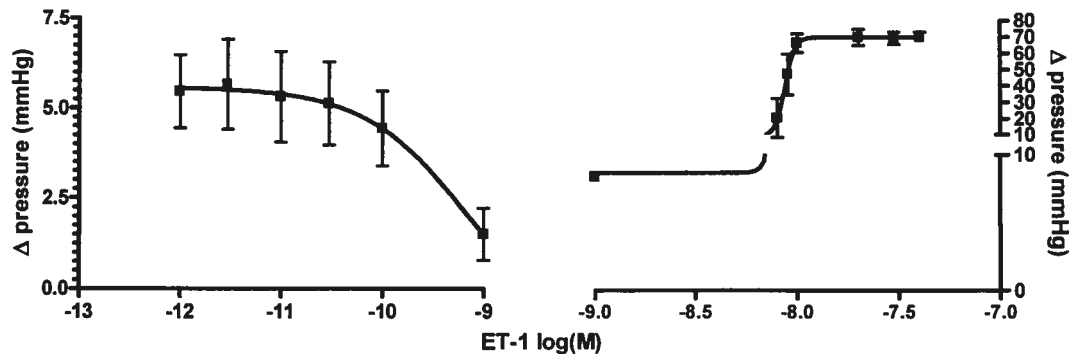


Figure 4.

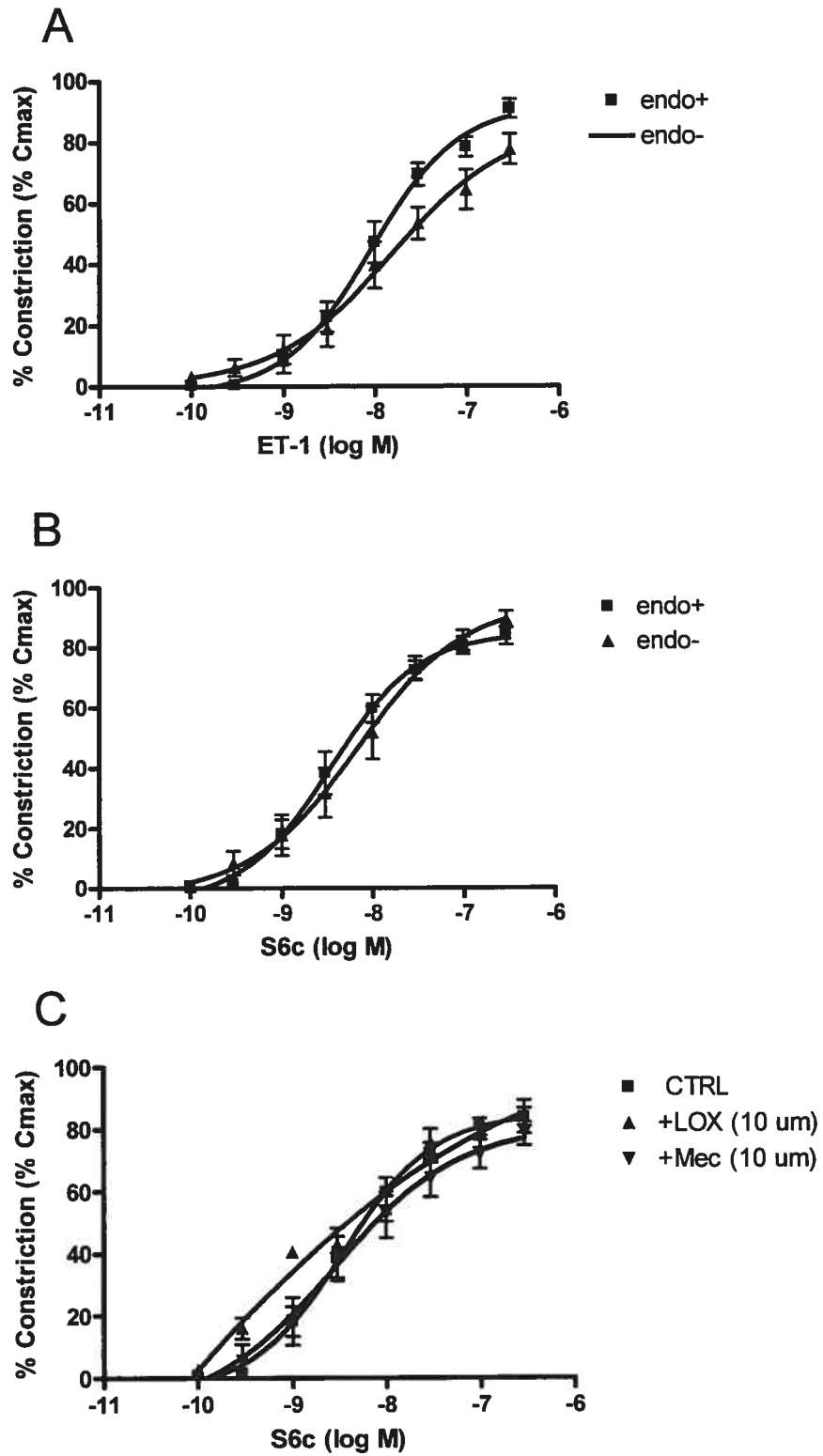


Figure 5.

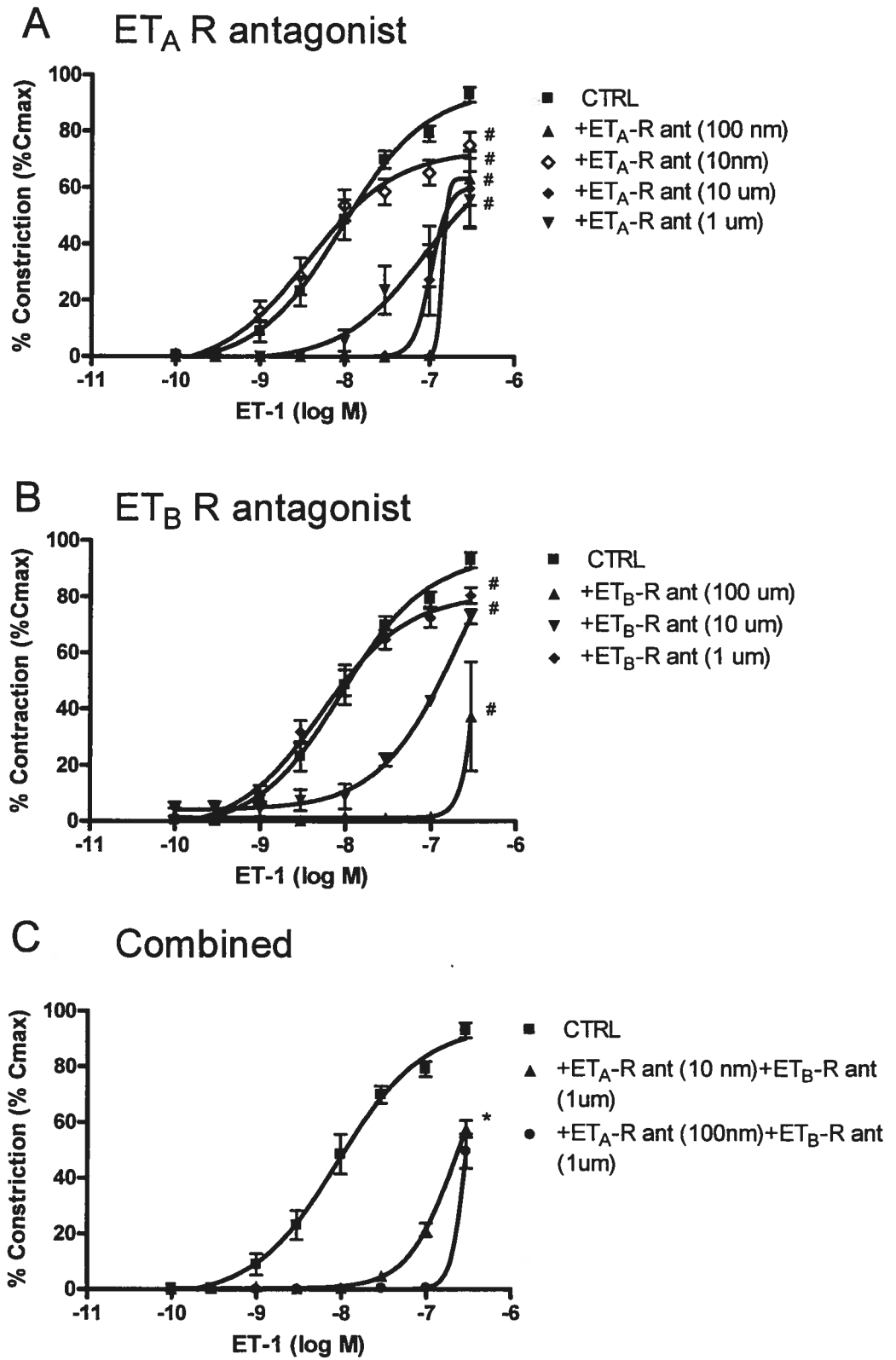
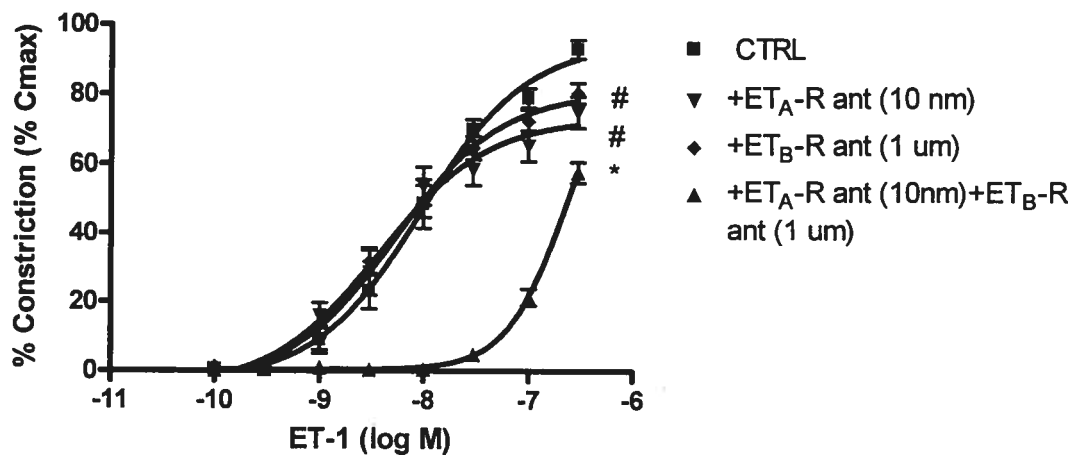
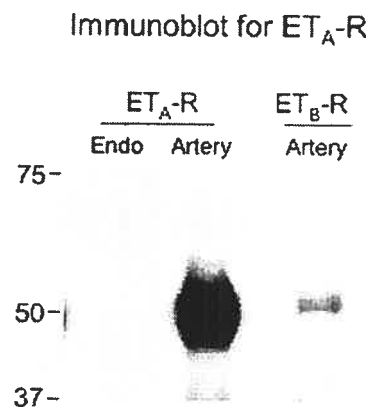




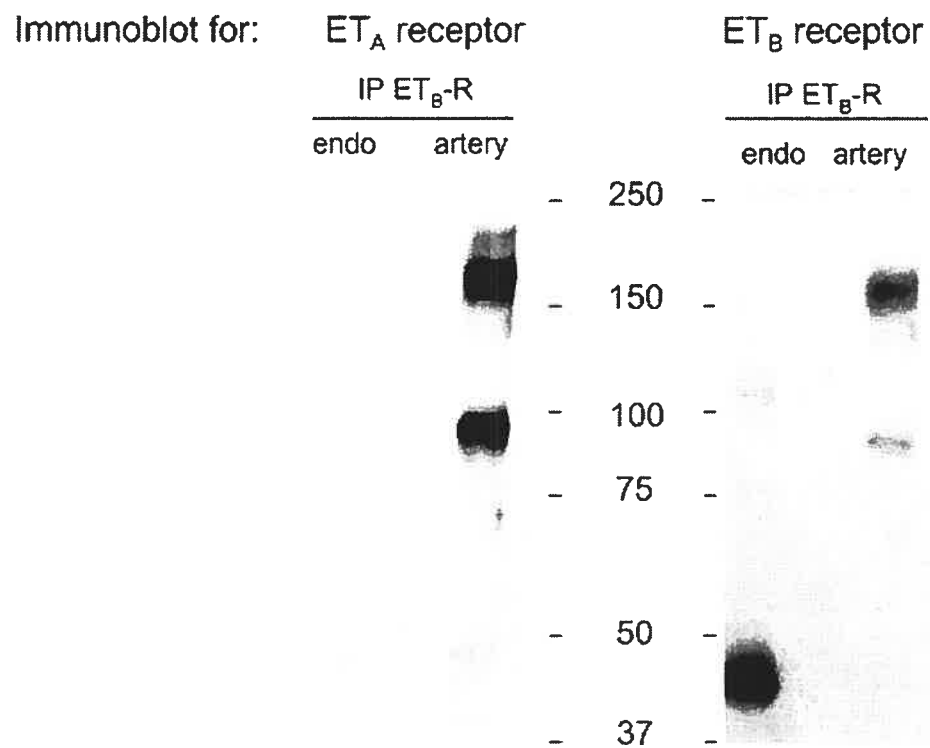
Figure 6.



**Figure 7.**



**Figure 8**



### **3.3 Accord des co-auteurs**

#### **1. Identification de l'étudiant**

Stéphanie Sauvageau  
2-525-1-0, Maîtrise en physiologie

#### **2. Description de l'article**

Auteurs: Stéphanie Sauvageau, Éric Thorin, Alexandre Caron, Jocelyn Dupuis  
Contribution de l'étudiante : 90% dans la réalisation des expériences et 100 % dans l'écriture de la première version du papier

Titre: Evaluation of endothelin-1 induced pulmonary vasoconstriction following myocardial infarction

Revue à laquelle l'article a été soumis : Experimental Biology and Medicine

Date d'acceptation de l'article : 1<sup>er</sup> décembre 2005

#### **3. Déclaration de tous les co-auteurs autres que l'étudiant**

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Stéphanie Sauvageau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation des mécanismes impliqués dans la vasoréactivité pulmonaire à l'endothéline-1

Jocelyn Dupuis

Co-auteur

Eric Thorin

Co-auteur

Alexandre Caron

Co-auteur

*3.4 Article #2: Evaluation of ET-1 induced pulmonary vasoconstriction following myocardial infarction*

**Evaluation of Endothelin-1 Induced Pulmonary Vasoconstriction Following Myocardial Infarction**

Sauvageau S, Thorin E, PhD, Caron A, MSc, Dupuis J, MD, PhD

**Short Title:** ET and Pulmonary Vasoreactivity in MI

---

From the Research Center, Montreal Heart Institute and the Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Dr. Dupuis detains a national researcher scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec. Dr. Thorin is a senior scholar from the Fonds de la recherche en santé du Québec.

Address for correspondence: Dr Jocelyn Dupuis, MD, PhD, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8.

Tel : 514-376-3330; Fax: 514-376-1355. Email: [REDACTED]

## Abstract

**Background.** Endothelin (ET) levels are elevated in congestive heart failure secondary to myocardial infarction (MI) and correlate well with the severity of pulmonary hypertension (PH), suggesting that this peptide could contribute to the pathophysiology of venous PH. Alterations of pulmonary vasoreactivity to ET following MI and the respective roles of the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors (R) have never been evaluated. **Methods.** MI was induced in rats. Three weeks later, small pulmonary resistance arteries were mounted on a microvascular myograph. Cumulative concentration-response curves to ET-1 and sarafotoxin 6c (S6c) were performed. Response to ET was also assessed in the presence of ET-R antagonists. Heterodimerization of receptors was evaluated by immunoprecipitation of the ET<sub>B</sub>-R, followed by western blotting for the expression of the ET<sub>A</sub>-R. **Results.** Maximal vasoconstriction and sensitivity to ET-1 were similar in sham and MI with E<sub>max</sub> values of 88±3.9% and 80±3.8% respectively. The response to S6c was similarly less in both sham (67±5.7%) and MI groups (60±6.6%). When given alone the ET<sub>A</sub>-R antagonist (10 nM, A-147627.1) and ET<sub>B</sub>-R antagonist (1 μM, A-192621.1) had no significant effect. Their combination however markedly reduced vasoconstriction (52±5.3%, P<0.001). The endothelial and medial distribution of ET-Rs was similar in sham and MI groups. In vitro studies demonstrated co-immunoprecipitation of the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R. **Conclusion.** Vasoconstriction of isolated resistance pulmonary arteries to ET agonists is not altered, following MI. Dual antagonism results in optimal blockade of

vasoconstriction, possibly because the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R can form functional heterodimers.

**Key words:** Myocardial infarction, heart failure, pulmonary hypertension, endothelin, endothelium, receptors, lung, pharmacology

## **Introduction**

Pulmonary venous hypertension is a frequent complication of congestive heart failure (CHF) that carries a poor prognosis. The ET system is activated in CHF of all etiologies, including myocardial infarction, with plasma ET levels correlating especially well with the severity of secondary pulmonary hypertension (PH) (1-4). The pulmonary circulation is the primary site for both ET production and clearance in humans (5) and there is evidence for increase of both ET-1 expression (6, 7) as well as ET converting enzyme (ECE) activity (8) in lung tissue of animal models of CHF.

In normal humans, approximately 50% of circulating ET-1 is extracted by the pulmonary circulation within a single transit time (5). This clearance is exclusively mediated by the endothelial ET<sub>B</sub> receptor (9). Humans with congestive heart failure have reduced pulmonary ET-1 clearance that correlates well with the severity of PH (10). This is consistent with the demonstrated lower protein level of the ET<sub>B</sub> receptor in the lung of CHF rats after MI (11). The specific contributions of the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R on ET-induced pulmonary vascular reactivity following MI could therefore be modified and have significant physiopathologic implications.

The aim of this study was therefore to evaluate possible alterations of pulmonary vasoreactivity to ET-1 following MI and to characterize the respective roles of the ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R.



## **Materials and Methods**

The animals research and ethics committee of the Montreal Heart Institute approved the study protocol. Experiments were conducted according to guidelines from the Canadian council for the care of laboratory animals. Male wistar rats (250-300 g) were used for this study. Animals were submitted to sham operation (n=11) or to myocardial infarction (MI, n=33) induced by ligation of the left anterior descending coronary artery as previously described (12).

**Isometric Recording of Tension of Isolated Micro Vessels.** Three weeks after MI, rats were anesthetized for hemodynamic measurements followed by isolation of small pulmonary arteries as previously described (13). For each vessel, the integrity of the endothelium was determined by testing endothelium-dependent vasodilation to acetylcholine (100  $\mu$ M). Maximal vasoconstriction to 127 mM KCl was also determined for each vessel. Preparations were subjected to a cumulative concentration-response curve to ET-1 (0.1 nM to 0.3  $\mu$ M) and S6c (0.1 nM to 0.3  $\mu$ M). The ET-1 concentration-response curve was assessed in the presence of the ET<sub>A</sub>-R antagonist (A-147627.1, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), the ET<sub>B</sub>-R antagonist (A-192621.1, 1 $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) and a combination of both antagonists.

**Immunohistology of ET Receptors in Small Pulmonary Arteries.** Immunofluorescence and confocal imaging were performed as recently

described in detail (13). ET<sub>A</sub>-R antibody (ET<sub>A</sub>, rabbit, Alomone) and ET<sub>B</sub>-R antibody (ET<sub>B</sub>, rabbit, Alomone) were incubated respectively with alpha smooth muscle actin antibody (mouse, Sigma). Anti-rabbit Alexa 555 (donkey, Molecular Probes) and anti-mouse Alexa 647 (donkey, Molecular Probes) antibodies were diluted in their respective antibody diluents and applied. In order to quantify fluorescence intensity of ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R we used the internal elastic lamina (IEL) and external elastic lamina (EEL) auto-fluorescence to identify the limits of the media and of the endothelium.

#### **Confocal Imaging, Deconvolution and Fluorescence Quantification.**

Slides were analysed using a Zeiss LSM 510 confocal microscope. We used a plan Apo-Chromat 63×/1.4 oil DIC objectif. HeNe1 (543 nm) and HeNe2 (633 nm) lasers were used for excitation of the anti-rabbit Alexa 555 and anti-mouse Alexa 647 antibodies respectively. Internal elastic lamina (IEL) and external elastic lamina (EEL) auto fluorescence was obtained with the Argon laser line (488 nm) and collected between 505-530 nm. Z-stacks of each tissues were performed and images were taken at every 0.16 μM (top to bottom) in order to respect the Nyquist criteria in z-sampling. Z-stacks were then deconvolved using the Maximum Likelihood Estimation (MLE) algorithm of the Huygens Pro software (version 2.4.1, Scientific Volume Imaging). Transparent projections (in face view) were applied to each z-stack using the Projection tool of the LSM 510 software. Images were saved in Tiff files format. In order to quantify fluorescence intensity of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>

receptors we used IEL and EEL auto fluorescence to identify the limits of the media and the endothelium. Using the “Close free shape curve” tool of the LSM image software we can isolate the endothelium or the media by masking the remaining of the image. Mean fluorescence intensity (MFI) was calculated over the non-masked region by the LSM 510 software. This operation was executed at every 5 images of each z-stack. The MFI of all the images in a z-stack were then averaged.

**Co-Immunoprecipitation.** Small intralobar pulmonary arteries from the pulmonary right inferior lobe were obtained as and pooled (n=24 arteries) for each experimental condition. Standard protein extraction was assessed using a lysis buffer with the following composition (mM): Tris-HCl pH 7.5 50, b-glycerophosphate 20, sodium fluoride 20, EDTA 5, EGTA 10, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1, triton 1% v/v, protease inhibitor cocktail: microcystin 1 μM, DTT 5 mM, leupeptin 10 μg/ml, PMSF 0.5 mM and benzamidin 10 mM followed by protein quantification using the Bradford technique. A total of 100 μg proteins from each sample were completed with lysis buffer to a volume of 100 μl and 1 μl of ET<sub>B</sub>-R antibody (Biogenesis) or of ET<sub>A</sub>-R antibody (Abcam) was added. The sample was then incubated at 4°C for 2 hours with agitation. While the samples were incubating with the first antibody, a washing buffer containing Tris 1.5 mM and triton 10% H<sub>2</sub>O was prepared. Three washing of agarose beads (protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology) were carried out before they were incubated with each sample (20 μl/sample) at 4°C

for 1 hour with agitation. The samples were then washed thrice before the addition of sample buffer and preparation for immunoblotting.

**Immunoblotting for the ET<sub>A</sub>-R.** Proteins were separated on 10-20% (W/v) acrylamide gradient SDS-PAGE. Following SDS-PAGE, samples were transferred at 100 V and 4°C for 90 minutes onto nitrocellulose membranes in a buffer containing 25 mM Tris base, 192 mM glycine, and 5% methanol. Membranes were blocked for 2 hours using a solution of 5% skimmed milk powder (Sigma) in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20 (TBST). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (ET<sub>A</sub>-R abcam), diluted 1:1000 in 5% milk in TBST, washed with TBST (3 × 10 min), reblocked with 5% non-fat milk in TBST (1 × 10 min), and incubated for 2 hours with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, Sigma) diluted in 1:20 000 in 5% non-fat milk powder. Following extensive washing with TBST, immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence's (Renaissance Plus, Perkin-Elmer Life Sciences) according to the manufacturer's instructions using Bio-Max film. The ET<sub>A</sub>-R (Abcam, ab1919, rat ET<sub>A</sub>-R amino acids 31-45, SSHVEDFTPFPGTEF) and ET<sub>B</sub>-R antibodies (Biogenesis Ltd, 4113-3059, rat ET<sub>B</sub>-R amino acids 405-417, QTFEKQSLEEKQ) were both raised against different and specific targets. We have tested the cross-reactivity of the ET<sub>A</sub>-R antibody in our endothelial

preparation. The ET<sub>A</sub>-R antibody did not recognize the ET<sub>B</sub>-R of the endothelial preparation.

**Study Drugs.** The following agonists were used: ET-1 (American peptide), S6c (American peptide). The ET<sub>A</sub>-R antagonist A-147627.1 and ET<sub>B</sub>-R antagonist A-192621.1 were kindly provided by Abbott Laboratories.

**Statistical Analysis.** All values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Differences between the sham and MI groups for morphometric and hemodynamic parameters were analyzed by a two-tailed unpaired t test. For each pharmacological condition on each isolated artery, the isometric recording of the concentration-response curves was fitted using a five parameter logistic fit to determine the maximal responses as well as the EC50 values. For these parameters, the differences between groups were evaluated with an unpaired Student t test. Statistical significance was assumed when  $P < 0.05$ .

## **Results**

Three weeks following surgery, the infarct animals developed CHF with secondary venous PH as evidence by higher left ventricular end diastolic pressure ( $15 \pm 2$  mmHg vs  $3 \pm 1$  mmHg,  $P < 0.01$ ) and right ventricular systolic pressure ( $38 \pm 2$  mmHg vs  $29 \pm 1$  mmHg,  $P < 0.05$ ).

**Reactivity of Small Pulmonary Arteries.** In isolated arteries, the maximal vasoconstriction and sensitivity induced by ET-1 were similar in sham and MI groups with  $E_{max}$  values of  $88\pm 3.9\%$  and  $80\pm 3.8\%$  respectively (Figure 1A). The response to S6c was similarly less in both shams ( $67\pm 5.7\%$ ) and MI groups ( $60\pm 6.6\%$ , Figure 1B). In the MI group, the  $ET_A$ -R antagonist mildly reduced ET-1 induced pulmonary vasoconstriction, but this did not reach statistical significance. The  $ET_B$ -R antagonist reduced vasoconstriction markedly, but only at the very high dose of  $100\ \mu\text{M}$ . To explore potential receptor interactions, experiments were performed by combining non-effective doses of these selective antagonists. The results are presented in Figure 2. In the MI groups, both the  $ET_A$ -R antagonist ( $10\ \text{nM}$ ,  $E_{max}\ 81\pm 2.5$ ) and the  $ET_B$ -R antagonist alone ( $1\ \mu\text{M}$ ,  $E_{max}\ 88\pm 2.2$ ) mildly reduced ET-1 vasoconstriction without affecting  $EC_{50}$  values (Figure 2). The combination of both antagonists in sham ( $34\pm 9.0$ ,  $P<0.001$ , Figure 2A) and MI groups ( $52\pm 5.3\%$ ,  $P<0.001$ , Figure 2B) however greatly reduced  $E_{max}$ , the  $EC_{50}$  becoming immeasurable.

**Expression of ET-R in Small Pulmonary Arteries.** Examples of composite Z-stack images obtained with the  $ET_A$ -R and  $ET_B$ -R antibodies and smooth muscle actin antibody are shown in Figure 3. Auto-fluorescence of the IEL and EEL enables easy demarcation of the endothelium. As expected, the  $ET_B$ -R was present on both the endothelium and media of pulmonary resistance arteries whereas the  $ET_A$ -R was only present on the media. Fluorescence

intensity revealed no difference between the ET<sub>A</sub>-R from MI lung preparations compared with sham preparations. Moreover, there were also no differences between the intensity of endothelial and smooth muscle ET<sub>B</sub>-R of MI lung preparations compared with sham preparations.

**ET<sub>A</sub>-R Expression in Pulmonary Arteries After Immunoprecipitations of ET-Rs (Figure 4).** This experiment was undertaken to determine the possible formation of ET-Rs heterodimers in the pulmonary circulation. When the ET<sub>A</sub>-R was immunoprecipitated, the immunoblot for ET<sub>A</sub>-R expression revealed a large and elongated band indicative of the abundance of receptor protein. When the ET<sub>B</sub>-R was immunoprecipitated, a narrow band for the putative ET<sub>A</sub>-R was expressed at 49.69 kDa, demonstrating that the ET<sub>A</sub>-R co-immunoprecipitated with the ET<sub>B</sub>-R. A negative control experiment carried out in aortic porcine endothelial cells lacking the ET<sub>A</sub>-R confirmed the absence of detectable ET<sub>A</sub>-R after immunoprecipitation of the ET<sub>B</sub>-R. We additionally excluded the possibility that the observed band for the ET<sub>A</sub>-R could represent the heavy chain of the immunoprecipitation antibody, and again obtained no detectable band (data not shown).

## **Discussion**

This study was designed to evaluate possible alterations of ET-1 vasoreactivity in pulmonary resistance arteries following MI. The results demonstrate that there is no modification of the response to ET-1 in this

condition. We also demonstrate that selective stimulation the ET<sub>B</sub>-R with S6c substantially contributes to vasoconstriction in both sham and MI animals. Consistent with these results we demonstrate a lack of modification in ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R distributions in the lung circulation of the MI group. Finally, combined ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R receptor blockade was necessary to obtain maximal inhibition of ET-1 induced vasoconstriction. A possible explanation for this finding was explored with the demonstration that ET-Rs can exist as heterodimers in both sham and MI rats.

It is well established that chronic stimulation of G protein coupled receptors can result in their desensitization and down regulation. Our findings demonstrate that in the case of ET, the documented activation of this system in CHF with increased lung ECE activity and ET-1 levels (6-8) is therefore not associated with reduced ET-1 induced pulmonary vasoconstriction. This would suggest a lack of desensitization and/or down regulation of ET-Rs in small pulmonary arteries following MI. It is thus plausible that the good correlation between ET levels in CHF and the severity of associated pulmonary venous hypertension (1-4) may represent a cause to effect relationship.

Using immunohistology, we found that the relative distribution of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in small pulmonary arteries was not modified in the MI group. We more specifically did not observe a modification in the proportion of endothelial ET<sub>B</sub>-R. In the same model, others have previously demonstrated a reduction of ET<sub>B</sub>-R mRNA expression and protein level in whole lung tissues



(11). We have also previously observed a reduction of circulating ET-1 clearance in the lungs from this CHF model (14) as well as in humans with CHF (10), and interpreted these results as evidence of endothelial ET<sub>B</sub>-R desensitization and/or down regulation. A reduction of ET<sub>B</sub>-R density at sites other than the small resistance vessels evaluated in the present study could conciliate these apparently discordant findings.

More importantly, our evaluation of ET-1 induced vasoconstriction in the presence of selective ET-R antagonists confirms that dual blockade is necessary to obtain maximal inhibition. Indeed, both selective antagonists alone had little effect except at the very elevated concentration of the ET<sub>B</sub>-R antagonist (100 μM) where loss of selectivity probably occurred. When we combined non-effective concentrations of both selective ET-Rs antagonists, we however observed a marked reduction in E<sub>max</sub>. Consistent findings were previously observed in human resistance pulmonary arteries where optimal blockade was achieved by dual inhibition of ET-Rs (15, 16).

Both ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R belong to the G protein coupled receptors family (GPCR). It has been firmly established that GPCR can form dimers or even higher-structure oligomers (17). The formation of heterodimers could modulate receptor function by regulating ligand binding, signalling, as well as receptor trafficking properties. The heterodimerization could alter how a receptor functionally respond to a ligand, such that the antagonist of one receptor can now positively augment the action of the agonist of the associated receptor (18). Moreover, there has been new evidence that the

ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R could form constitutive heterodimers (19). To further investigate the ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor functioning we therefore evaluated if ET-Rs could exist as heterodimers in the pulmonary circulation. Immunoprecipitation of the ET<sub>B</sub>-R and Western blotting for the expression of the ET<sub>A</sub>-R confirmed that the receptors could form heterodimers in small pulmonary arteries. The functional implications of ET-R heterodimers in the pulmonary circulation remains highly speculative at this point, but to explain part of our findings we can evoke that blockade of only one of the two dimers could still induce vasoconstriction through compensation and signalling by the dimer not targeted by the antagonist. This is supported by the more complete inhibition of the ET response by a combination of both antagonists. Furthermore, our results suggest that dimerization of ET-Rs and its functional importance is not modified following MI. Another possible simpler explanation for our findings is that activation of either coexisting ET receptor subtype alone can elicit maximal contraction and thus, complete blockade of one type leaves open activation of the other to induce maximal response.

In conclusion, we found that the vasoconstriction of isolated resistance pulmonary arteries to ET agonists is not altered after MI. ET-1 induced pulmonary vasoconstriction is in part mediated by the ET<sub>B</sub>-R and dual blockade is necessary for optimal inhibition of ET-1 induced vasoconstriction. The ET-Rs can exist as heterodimers in pulmonary arteries of both sham and MI rats and this may have pharmacological importance.

## References

1. Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Maistre G, Piette JC, Godeau P, Cabrol C, Gandjbakhch I. Plasma endothelin and pulmonary pressures in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 126:1484-1488, 1993.
2. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure [published erratum appears in *Circulation* 1993;87:1064]. *Circulation* 85:504-509, 1992.
3. Pousset F, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Escolano S, Thomas D, Komajda M. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 18:254-258, 1997.
4. Dupuis J. Endothelin receptor antagonists and their developing role in cardiovascular therapeutics. *Can J Cardiol* 16:903-910, 2000.
5. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 94:1578-1584, 1996.
6. Tonnessen T, Lunde PK, Giaid A, Sejersted OM, Christensen G. Pulmonary and cardiac expression of preproendothelin-1 mRNA are increased in heart failure after myocardial infarction in rats. Localization of preproendothelin-1 mRNA and endothelin peptide. *Cardiovasc Res* 39:633-643, 1998.

7. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Yamaguchi I, Kobayashi M, Goto K, Sugishita Y. Pulmonary hypertension caused by congestive heart failure is ameliorated by long-term application of an endothelin receptor antagonist. Increased expression of endothelin-1 messenger ribonucleic acid and endothelin-1-like immunoreactivity in the lung in congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol* 28:1580-1588, 1996.
8. von Lueder TG, Kjekshus H, Edvardsen T, E OI, Urheim S, Vinge LE, Ahmed MS, Smiseth OA, Attramadal H. Mechanisms of elevated plasma endothelin-1 in CHF: congestion increases pulmonary synthesis and secretion of endothelin-1. *Cardiovasc Res* 63:41-50, 2004.
9. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 81:1510-1515, 1996.
10. Staniloae C, Dupuis J, White M, Gosselin G, Dyrda I, Bois M, Crepeau J, Bonan R, Caron A, Lavoie J. Reduced pulmonary clearance of endothelin in congestive heart failure: a marker of secondary pulmonary hypertension. *J Card Fail* 10:427-432, 2004.
11. Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Down-regulation of ETB receptor, but not ETA receptor, in congestive lung secondary to heart failure. *Life Sci* 62:185-193, 1998.
12. Jasmin JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L, Dupuis J. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 58:621-631, 2003.

13. Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N, Dupuis J. Chronically Elevated Endothelin Levels Reduce Pulmonary Vascular Reactivity to Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 171:506-513, 2005.
14. Dupuis J, Rouleau JL, Cernacek P. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction. *Circulation* 98:1684-1687, 1998.
15. MacLean MR, Docherty CC, McCulloch KM, Morecroft I. Effect of novel mixed ETA/ETB antagonists on responses to ET-1 in human small muscular pulmonary arteries. *Pulm Pharmacol Ther* 11(2-3):147-149, 1998.
16. McCulloch KM, Docherty CC, Morecroft I, MacLean MR. EndothelinB receptor-mediated contraction in human pulmonary resistance arteries. *Br J Pharmacol* 119:1125-1130, 1996.
17. Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5:30-34, 2004.
18. Gomes I, Gupta A, Filipovska J, Szeto HH, Pintar JE, Devi LA. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5135-5139, 2004.
19. Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 279:27679-27687, 2004.

## Figure Legends

**Figure 1.** ET-1 (A) and S6c (B) induced vasoconstriction of pulmonary resistance arteries. In sham and MI rats. #  $P < 0.05$ , &  $P < 0.01$  versus ET-1.

**Figure 2.** Effect of selective and combined ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R blockade on ET-1 induced vasoconstriction of pulmonary resistance arteries from A) sham and B) MI rats.

\*  $P < 0.001$  versus control.

**Figure 3.** Distribution and quantification of ET<sub>A</sub>-R and ET<sub>B</sub>-R receptors by immunohistology of small pulmonary resistance arteries. The pictures represent examples of composite Z stacks that were deconvolved to measure mean fluorescence intensity (MFI). The first line displays the fluorescence for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> from left to right in both the sham and MI preparations (all in red). The second line displays the same components, but with the addition of the internal elastic lamina (IEL) and external elastic lamina (EEL) (in green) that enables easy demarcation of the endothelium (E) from the media (M). The third line displays the fluorescence for smooth muscle actin (in blue) which is limited to the media and co-localizes with the ET<sub>A</sub> receptor (on the left) and the ET<sub>B</sub> receptor (on the right). The computed mean fluorescence intensities are presented in the bar graph.

**Figure 4.** Heterodimerization of ET-Rs in rat pulmonary resistance arteries. Immunoblots for the ET<sub>A</sub> receptor was performed after immunoprecipitation of the ET<sub>A</sub>-R or the ET<sub>B</sub>-R. Endothelial cells (endo, left lane) were used as a negative control. Immunoprecipitation of the ET<sub>A</sub>-R in pulmonary artery

(second lane) was used as a positive control. The results confirm co-immunoprecipitation of the ET<sub>A</sub>-R with the ET<sub>B</sub>-R in resistance pulmonary arteries of sham and MI rats (right lanes).

Figure 1

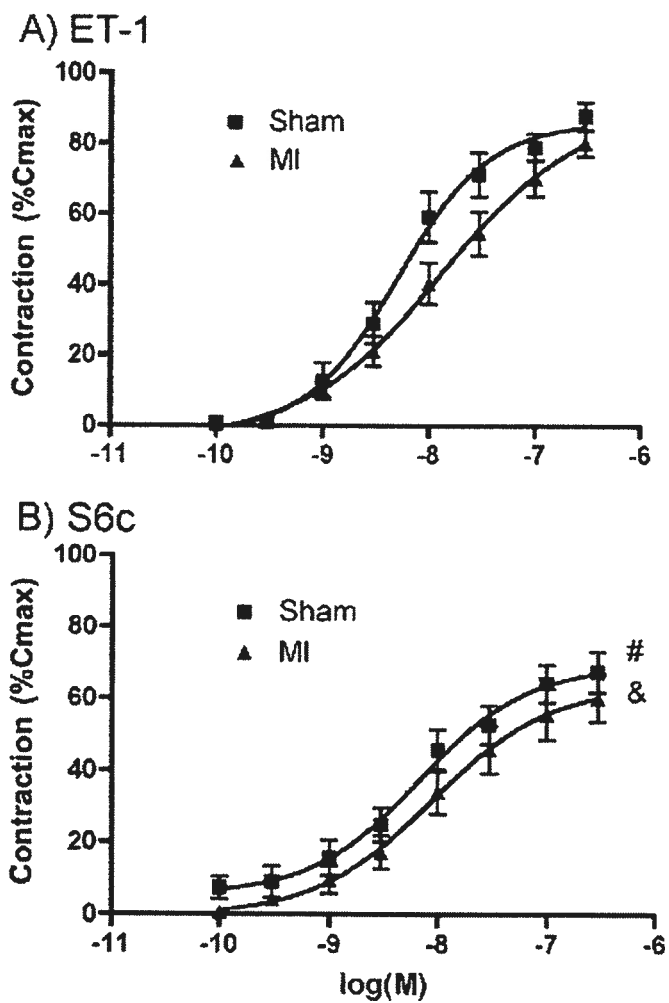




Figure 2

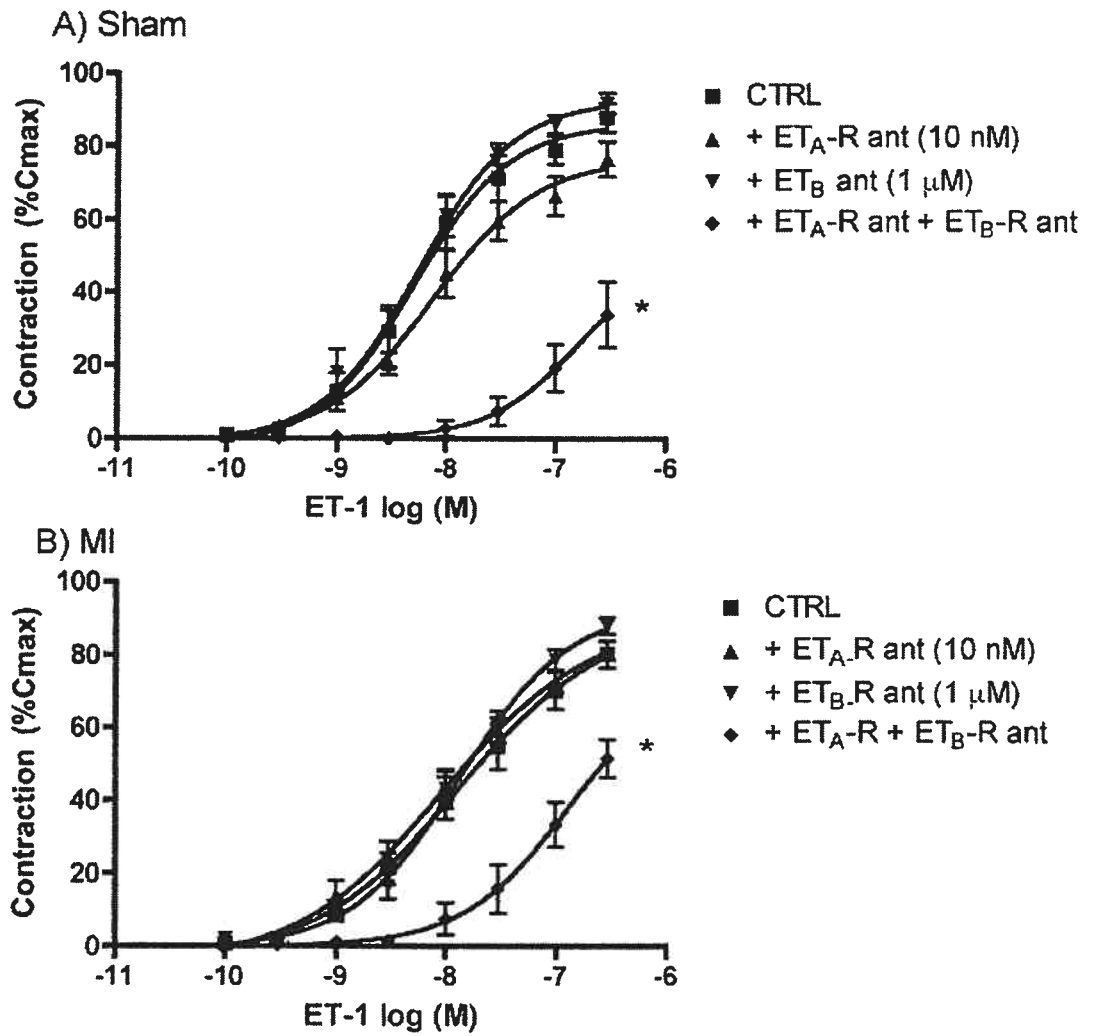


Figure 3.

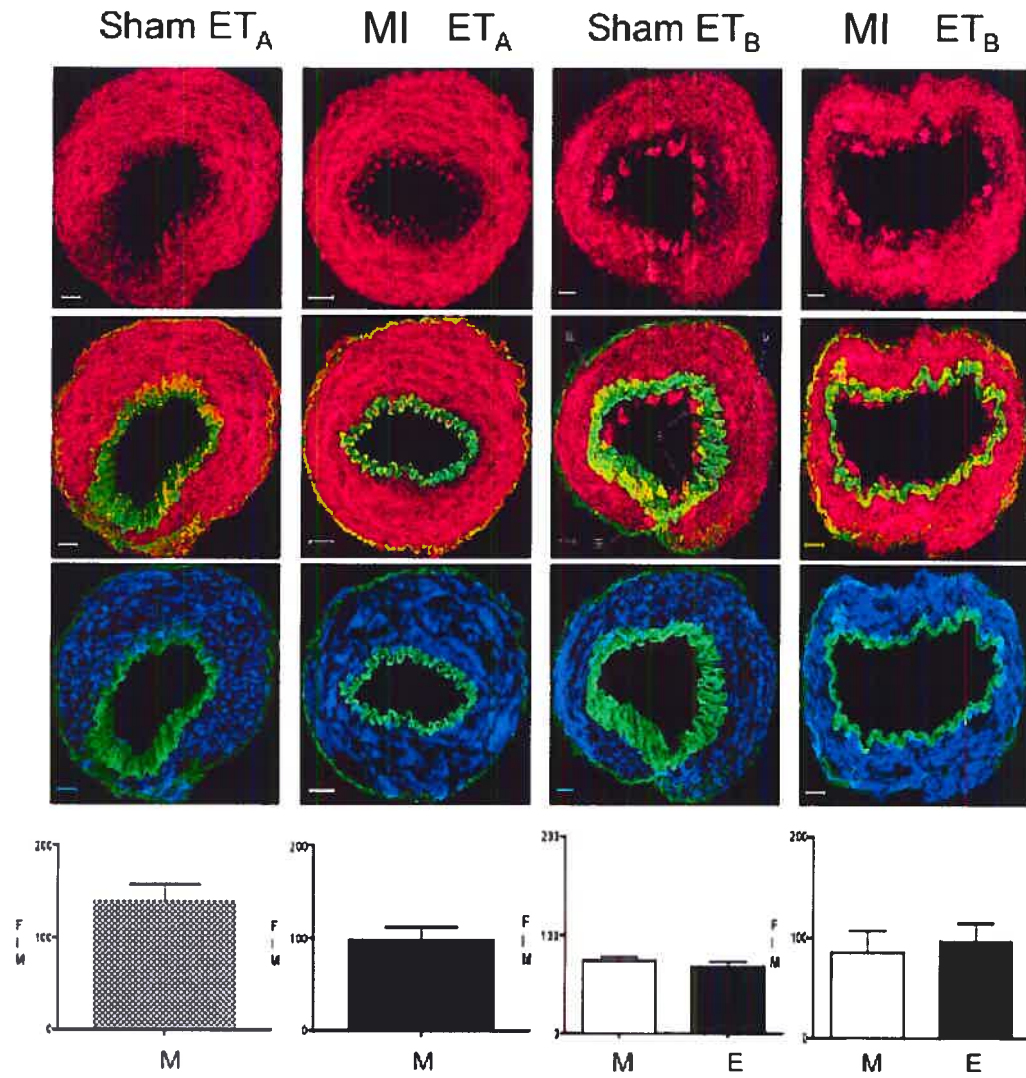
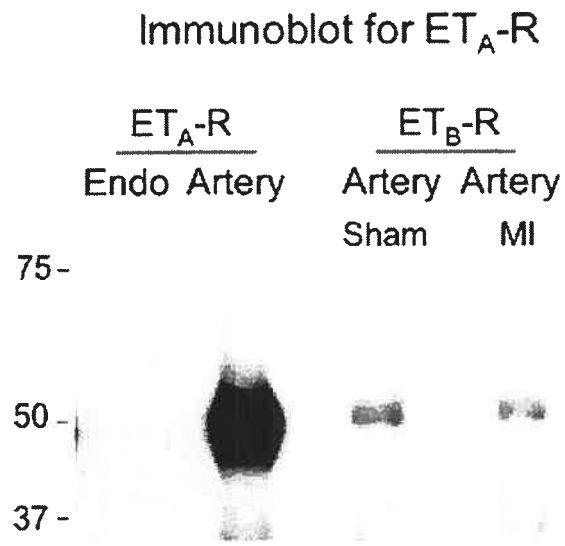


Figure 4.



## 4.0 Discussion

### **4.1 Rôle de l'endothélium et des récepteurs $ET_A$ et $ET_B$ dans la vasoconstriction pulmonaire dépendante de l'ET-1**

Plusieurs études ont démontré l'importance ainsi que les rôles modulateurs du NO, de la  $PGI_2$  et de la  $TxA_2$  suite à une stimulation du récepteur  $ET_B$  endothélial (124). Plusieurs facteurs tels que la proportion et la distribution des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  qui varient selon la taille et l'artère étudiée de même que la double fonction du récepteur  $ET_B$  endothélial (vasoconstriction et vasodilatation) peuvent modifier la vasoréactivité pulmonaire (125). Ces facteurs pourraient être à l'origine de plusieurs divergences obtenues par divers groupes de recherche selon la préparation utilisée (espèce, artère de résistance, veine, poumon) pour l'étude de la vasoréactivité pulmonaire.

Au cours des dernières années, un grand débat sur le traitement optimal (antagoniste ET double *versus* simple) de pathologies telles que l'HTP a vu le jour en raison de ces divergences de résultats. Afin de répondre à la question soulevée par ce débat, nous avons d'abord évalué le rôle de l'endothélium et des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  lors de contraction induites par l'ET-1 dans l'organe complet puis dans les artères de résistances pulmonaires.

Cette étude nous a permis de découvrir que :

- 1) La stimulation du récepteur  $ET_B$  par la S6c entraîne une vasoconstriction similaire à l'ET-1 dans le poumon isolé et dans les artères de résistance pulmonaire;

- 2) La dénudation des artères de résistance pulmonaire de leur endothélium ne modifie pas la réponse à l'ET-1 et à la S6c;
- 3) Les produits dérivés de l'activité de la cyclooxygénase contribuent à la vasoconstriction pulmonaire dépendante de l'ET-1 dans le poumon isolé mais ils n'ont aucun rôle dans les artères de résistance pulmonaire;
- 4) Lorsque pré-constricte, la stimulation des artères de résistance par une faible concentration d'ET-1 entraîne une vasodilatation alors qu'une stimulation à forte concentration entraîne une importante vasoconstriction;
- 5) L'utilisation simultanée de faibles concentrations des antagonistes  $ET_A$  et  $ET_B$  entraînent une inhibition supérieure de la réponse induite par ET-1 que lorsqu'un seul antagoniste est utilisé à la fois ;
- 6) Enfin, les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  peuvent former des dimères fonctionnels dans les artères de résistance pulmonaire.

Rôle des prostanoides dans la vasoconstriction pulmonaire dépendante de l'ET-1

Il a été démontré par plusieurs groupes de recherche que l'ET-1 pouvait induire la relâche de produits de la COX au niveau du poumon isolé (126) (127) (128). Chez le rat et le cochon d'inde, il a été démontré que l'ET-1 était préférentiellement veino-constricteur dans le poumon. Ces études ont également démontré que ce peptide pouvait entraîner la formation d'oedème pulmonaire pouvant être prévenu par un antagoniste des récepteurs de la TxA<sub>2</sub> (127) (129). Ces résultats concordent avec l'étude réalisée par le groupe de Toga qui suggère aussi que l'ET-1 a un rôle veino-constricteur prédominant et que l'utilisation d'indométhacine peut atténuer son effet constricteur (130).

Nos études effectuées sur le poumon isolé ont confirmé l'implication des produits de la COX dans la vasoconstriction induite par l'ET-1 et confirmé l'effet veino-constricteur de l'ET-1 puisque l'utilisation du méclofénamate ou du bosentan a prévenu le développement de l'oedème pulmonaire. Dans les artères de résistance pulmonaire, nous n'avons pas pu mettre en évidence ce rôle de prostanoides et l'endothélium. L'utilisation d'un antagoniste ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> seul n'ont pu prévenir le développement de l'oedème. Ces résultats suggèrent que la relâche veineuse pulmonaire de produits de la COX, probablement le TxA<sub>2</sub>, contribue à la vasoconstriction induite par l'ET-1 tout en entraînant le développement d'oedème, alors que l'activation de la COX n'est pas impliquée dans la réponse constrictrice induite par l'ET-1 dans les artères pulmonaires. Toutefois, il a aussi été démontré que l'ET-1 est un

puissant agent broncho-constricteur (131). On ne peut donc exclure la possibilité que les produits de la COX proviennent des bronches.

#### Fonctions opposées des récepteur $ET_B$ endothéliaux et musculaires

Au cours de cette étude, nous avons tenté d'évaluer la double fonction du récepteur  $ET_B$  dans la circulation pulmonaire. Dans le poumon isolé et les artères de résistance, la stimulation du récepteur  $ET_B$  par la S6c a induit une vasoconstriction pulmonaire similaire à celle induite par l'ET-1 seule. Des études antérieures réalisées par le groupe de McCulloch ont démontré que l'ET-1 et la S6c induisaient des vasoconstrictions similaires au niveau des artères de résistance pulmonaire (82) (132). Par contre, au niveau du poumon isolé, l'utilisation d'un antagoniste  $ET_B$  seul n'a pu réduire la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 mais l'a plutôt augmentée. Pour tenter d'évaluer l'effet de la stimulation du récepteur  $ET_B$  nous avons effectué une courbe dose-réponse à l'ET-1 en condition de tonus vasculaire augmenté (avec un analogue de la  $TxA_2$  : U-46619) ainsi qu'en présence d'un antagoniste  $ET_A$ . Dans ces conditions, la stimulation à faible concentration d'ET-1 du récepteur  $ET_B$  a entraîné une légère vasodilatation alors que la stimulation à forte concentration a plutôt entraîné une sévère vasoconstriction accompagnée d'oedème pulmonaire.

Nos résultats révèlent la double fonction du récepteur  $ET_B$  tout en apportant des données supplémentaires sur la balance de ses effets dans le poumon isolé de rat. De plus, nous avons découvert que la stimulation et

l'inhibition d'un récepteur n'induisent pas nécessairement des effets contraires au niveau de la vasoréactivité pulmonaire. Le récepteur ET<sub>B</sub> a un rôle vasoconstricteur prédominant lorsqu'il est stimulé à forte concentration d'ET-1. Toutefois à faible concentration (133) (134) d'ET-1 et en condition de préconstriction, un rôle vasodilatateur peut alors être observé. Ces résultats deviennent importants dans certaines pathologies où le tonus vasculaire est augmenté telles qu'en situation d'HTP puisque le récepteur pourrait alors dans ces conditions exercer ses effets « protecteurs ». Cela a été démontré dans une étude utilisant le modèle d'HTP chez le rat induit par la monocrotaline où l'utilisation aiguë d'un antagoniste ET<sub>B</sub> pouvait inhiber le tonus vasculaire (135).

Lors d'une courbe dose-réponse à l'ET-1, la vasodilatation observée initialement est due à l'activation du récepteur ET<sub>B</sub> endothélial qui favorise probablement la relâche de vasodilatateurs tels que le NO et la PGI<sub>2</sub> (133) (136). Par contre, la dénudation des artères de résistance de leur endothélium n'a eu aucun effet sur les vasoconstrictions dépendantes de l'ET-1 et de la S6c suggérant de nouveau que la vasodilatation observée pourrait avoir une autre origine que l'artère elle-même telle que les veines pulmonaires par exemple. Nos résultats supportent cette hypothèse car l'inhibition du récepteur ET<sub>B</sub> dans les artères pulmonaires réduit la vasoconstriction alors que dans le poumon isolé cette même inhibition augmente la vasoconstriction. Nous avons de plus démontré que l'utilisation simultanée des antagonistes ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>



procurait une inhibition supérieure de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1.

*Importance fonctionnelle de l'hétérodimérisation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>*

Deux hypothèses ont été évoquées pour expliquer les résultats discordants obtenus par divers groupes de recherche, soit l'existence possible de récepteurs additionnels à l'ET ou encore l'existence d'un «cross-talk» entre les récepteurs. Les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> appartiennent tous deux à la famille des RCPGs. Il a été démontré récemment que les récepteurs de cette famille pouvaient former des dimères ou encore des oligomères. La formation d'hétérodimères pourrait en fait altérer la fonction du récepteur en modifiant sa liaison à l'agoniste de même que sa cascade de signalisation intracellulaire (94). De plus, la formation d'un hétérodimère pourrait altérer la réponse de celui-ci à un ligand de telle façon que l'antagoniste d'un des deux récepteurs pourrait augmenter la liaison de l'agoniste au récepteur associé (95). De récentes études ont démontré que les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> pouvaient former des homodimères et des hétérodimères fonctionnels dans des cellules HEK293 transfectées (96;137). D'autre part, l'existence de cette hétérodimérisation des récepteurs à l'ET-1 a aussi été démontrée dans le lobe antérieur de l'hypophyse (138). Nous avons donc supposé que la formation de dimères des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> pouvait expliquer les résultats divergents observés dans nos études. Soit que 1) la stimulation du récepteur ET<sub>B</sub> avec la S6c induit une vasoconstriction similaire à l'ET-1 dans les artères de résistance pulmonaire et

dans le poumon isolé, alors que l'antagonisme seul du récepteur ET<sub>B</sub> dans le poumon isolé tend à augmenter cette vasoconstriction. Soit que 2) l'utilisation simultanée des antagonistes ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> est nécessaire afin d'obtenir une inhibition supérieure de la vasoconstriction induite par l'ET-1.

Nous avons donc évalué la possibilité que les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> pouvaient former des hétérodimères fonctionnels dans les vaisseaux pulmonaires. En situation dénaturante, l'immunoprécipitation du récepteur ET<sub>B</sub> suivie d'un immunobuvardage de type Western pour dévoiler l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> ont révélé que les récepteurs à l'ET-1 pouvaient former des hétérodimères dans les artères de résistance pulmonaire. Ces résultats ont été confirmés en condition non-dénaturante où le poids plus élevé du dimère peut être constaté. De plus, dans ces conditions nous avons observé la présence d'un trimère. Toutefois, l'importance et l'implication fonctionnelle de la formation d'oligomères restent hypothétiques. Nous pouvons supposer que l'antagonisme seul de l'un des deux récepteurs est sans effet et entraîne une vasoconstriction pulmonaire par stimulation du récepteur associé. L'inhibition supérieure de la vasoconstriction pulmonaire par l'utilisation simultanée des deux types d'antagoniste supporte cette hypothèse. De plus, l'existence d'oligomères des récepteurs à l'ET-1 pourrait expliquer plusieurs des résultats obtenus par d'autres groupes de recherche dans le passé. Le groupe de Webb a obtenu des résultats similaires au niveau des artères mésentériques isolées où l'utilisation d'un antagoniste ET<sub>A</sub> seul a partiellement réduit la vasoconstriction induite par l'ET-1 alors que

l'utilisation d'un antagoniste  $ET_B$  seul n'a eu aucun effet. Par contre, le blocage des deux récepteurs a entraîné une inhibition maximale de la vasoconstriction induite par l'ET-1 (139). Afin d'expliquer leurs résultats, ils ont émis l'hypothèse de l'existence d'un «cross-talk» entre les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$ . Une seconde étude réalisée par le groupe de MacLean a démontré qu'il était nécessaire de bloquer simultanément les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  des artères de résistance pulmonaire humaines afin d'obtenir une inhibition maximale de la réponse induite par l'ET-1. Toutefois, il a aussi démontré que l'utilisation de l'un des antagonistes  $ET_A$  ou  $ET_B$  seul à de très fortes concentrations pouvait aussi entraîner une inhibition de la réponse induite par l'ET-1 s'expliquant par la perte de sélectivité des antagonistes aux différentes doses utilisées (140). Afin d'expliquer la nécessité d'utiliser un antagoniste double, le groupe a proposé l'existence d'une synergie entre les récepteurs à l'ET-1. Ces études, réalisées par ces groupes de recherche, pourraient en fait être expliquées par le fait que les récepteurs peuvent former des oligomères au niveau de la cellule musculaire lisse. Toutefois, il existe une seconde explication beaucoup plus simple qui permet d'expliquer les résultats obtenus. En effet la stimulation de l'un des deux récepteurs,  $ET_A$  ou  $ET_B$ , est suffisante pour entraîner une réponse maximale ainsi, lorsqu'un seul des deux récepteurs est bloqué par l'antagoniste, le second récepteur est alors disponible pour induire la réponse maximale.

#### ***4.2 Modification de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 suite à un infarctus du myocarde***

La deuxième partie de notre étude consistait à évaluer les modifications de la vasoconstriction pulmonaire à l'ET-1 qu'induit un infarctus du myocarde. Trois semaines suivant l'opération, les rats du groupe infarctus (ICC) ont développé une insuffisance ventriculaire gauche ainsi qu'une hypertension pulmonaire associée. Leurs pressions systoliques ventriculaires droite et gauche en fin de diastole étaient supérieures à celles du groupe Sham. Nos études de vasoréactivité des artères de résistance pulmonaire ont démontré qu'il n'y avait aucune modification de la réponse pulmonaire à l'ET-1 suite à un infarctus du myocarde. De plus, nos études d'immunofluorescence ont confirmé qu'il n'y avait aucune modification des patrons d'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> du groupe MI comparativement au groupe Sham.

Plusieurs paramètres ont été étudiés dans l'insuffisance cardiaque. Toutefois, la caractérisation de la vasoréactivité pulmonaire suite à un infarctus du myocarde n'a jamais été étudiée. L'ET-1 et la S6c ont induit des vasoconstrictions pulmonaires similaires des artères de résistance dans les deux groupes (Sham vs MI). Toutefois, la vasoconstriction pulmonaire induite par la S6c était réduite comparativement à celle induite par l'ET-1 dans les groupes Sham et MI. Ces résultats sont surprenants puisque plusieurs études ont démontré que la réduction de la clairance de l'ET-1, par le récepteur ET<sub>B</sub>, était responsable des niveaux circulants élevés d'ET-1 dans l'ICC. Une étude par le groupe de Kobayashi a démontré qu'en situation d'ICC on observait une diminution de l'expression du récepteur ET<sub>B</sub> dans les poumons (141). En

nous basant sur ces résultats, nous pensions obtenir une réduction de la vasoconstriction dépendante du récepteur ET<sub>B</sub> dans le groupe MI comparativement au groupe Sham. Nos résultats semblent donc être en désaccord avec les résultats de Kobayashi et de ses collaborateurs. Nos résultats sont supportés par nos expériences de microscopie confocale qui démontrent l'absence de modifications du niveau d'expression des récepteurs à l'ET-1 dans les poumons des rats MI *versus* Sham. Ces résultats suggèrent que même si la clairance de l'ET-1 est réduite en situation d'ICC, les récepteurs ET<sub>B</sub> pulmonaires ne sont pas responsables de l'augmentation des niveaux circulants d'ET-1. L'utilisation d'un antagoniste ET<sub>A</sub> à diverses concentrations (10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM) n'a pas modifié la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1. De plus, l'utilisation à faible concentration de l'antagoniste ET<sub>B</sub> n'a pas modifié la réponse induite par ET-1. Par contre, à forte concentration l'antagoniste ET<sub>B</sub> a significativement réduit la vasoconstriction pulmonaire dépendante de l'ET-1. Ceci pourrait être attribué à une perte de la sélectivité de l'antagoniste ET<sub>B</sub> à forte concentration. L'utilisation simultanée des deux types d'antagonistes a entraîné une inhibition supérieure de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 comparativement à l'utilisation seule d'un des deux antagonistes. Ces résultats démontrent à nouveau que l'utilisation des deux types d'antagonistes est nécessaire afin d'inhiber complètement la vasoconstriction pulmonaire dépendante de l'ET-1

Tel que mentionné précédemment, les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  appartiennent à la famille des RCPGs et ils peuvent former des hétérodimères. Nous avons voulu vérifier si en condition pathologique les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  pouvaient toujours former des hétérodimères. Les résultats obtenus confirment que même en situation de MI et d'HTP veineuse les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  peuvent toujours former des dimères dans les artères de résistance pulmonaire.

## **5.0 Conclusion**

Ces études nous ont permis de démontrer que les prostanoïdes contribuent à la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 dans le poumon isolé mais pas dans les artères de résistance. Cela démontre que l'ET-1 pourrait entraîner une relâche de prostanoïdes dans les veines pulmonaires ou encore dans l'arbre bronchique. Le rôle vasodilatateur du récepteur  $ET_B$  est observé qu'à faibles concentrations d'agonistes et en condition de pré-contraction. Nos résultats démontrent aussi qu'un infarctus du myocarde n'induit aucune modification de la vasoconstriction pulmonaire dépendante de l'ET-1 au niveau des artères de résistance. Que ce soit en situation contrôle ou pathologique, il est nécessaire d'utiliser les antagonistes  $ET_A$  et  $ET_B$  simultanément afin d'obtenir une inhibition supérieure de la vasoconstriction pulmonaire induite par ce peptide.

## 6.0 Remerciement

Un merci particulier à celui qui a été pour moi une ressource inépuisable. Dans les moments difficiles, Stéphane Krummen a été pour moi une aide précieuse autant au niveau scientifique que personnel. Il a toujours su me remonter le moral, me redonner confiance en moi et m'a aussi permis de toujours me dépasser. Il m'a fait comprendre que le plus important n'est pas l'opinion des autres mais bien de toujours avoir confiance en soi et de persévérer. Grâce à sa patience inébranlable, il a su m'apprendre beaucoup. Il est un modèle à suivre au niveau scientifique et j'espère un jour pouvoir le rattraper. Sans lui cette expérience aurait été beaucoup plus difficile à traverser.

J'aimerais dire un gros merci à mes parents et à mon frère qui m'ont soutenue depuis le tout début de mes études. Ils ont toujours cru en moi et n'ont jamais douté de ma réussite. Leurs nombreux encouragements m'ont permis de persévérer et de toujours avoir confiance en moi. Ils sont responsables, en grande partie, de tout ce que j'ai accompli jusqu'à aujourd'hui.

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr Jocelyn Dupuis. Je le remercie de m'avoir donné une chance et de m'avoir accepté dans son laboratoire de recherche. Il m'a fait découvrir le domaine de la recherche avec un projet scientifique que j'ai adoré. Je suis très heureuse de poursuivre au doctorat avec lui à mes côtés.

Un merci particulier à mon co-directeur de recherche, le Dr Éric Thorin. Il a été le premier de tous à me faire confiance et à me faire comprendre que j'étais à ma place dans le domaine scientifique. Dans les moments difficiles il m'a remonté le moral et m'a redonné confiance en moi. Ce chercheur est pour moi un modèle à suivre. Je suis très heureuse d'avoir terminé ma maîtrise avec lui mais encore plus de débiter mon doctorat sous son aile.

Je remercie Marie-Ève Gendron pour son apport scientifique mais surtout pour notre amitié qui a rendu cette expérience des plus agréables. Merci pour ces nombreux fou rires interminables que nous seules pouvions comprendre.

Je remercie Annick Préfontaine pour ses petites attentions de tous les jours. Elle a su être une amie formidable et une oreille attentive à mes nombreuses frustrations de la journée. J'espère pouvoir lui rendre la pareille durant sa maîtrise.

Je remercie le Dr Angelo Calderone qui m'a apporté son aide précieuse en biologie moléculaire et qui a toujours su m'encourager à persévérer.



## 7.0 Bibliographie

- (1) Vanhoutte P.M. Endothelium dependant hyperpolarizations: the history. *Pharmacological research* 2004; 49:503-8.
- (2) Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
- (3) Palmer RM, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-6.
- (4) Moncada S, Palmer JN, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.
- (5) Jansens SP, Shimoushi A, Quertermous T et al. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267:14 519-14 522.
- (6) Nakane M, Schimidt HH, Pollock JS et al. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS* 1993; 316:175-80.
- (7) Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351:714-8.
- (8) Vodovotz Y, Kwon NS, Pospischil M et al. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; 152:4110-8.
- (9) MacNaul KL, Hutchinson NI. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196:1330-4.
- (10) Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:154-8.
- (11) Cosentino F, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovascular research* 1999; 43:274-8.
- (12) Luca Parrenta, Mario Perretti. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenase: two enzyme in the spotlight. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65:153-9.

- (13) Bishop-Bailey D, Pepper JR, Haddad EB et al. Induction of cyclooxygenase-2 in human saphenous veins and internal mammary artery. *Atheroscler Tromb Vasc Biol* 1997; 9:1644-8.
- (14) Shubert R, Serebryakov NV, Engel H, Hopp HH. Iloprost activates KCa channels of vascular smooth muscle cells: role of cyclic-AMP-dependant proteine kinase. *Am J Physiology* 1996; 271:C1203-C1211.
- (15) Jackson WF, Konig A, Dambacher T, Busse R. Prostacyclin-induced vasodilatation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiology* 1993; 264:H238-H243.
- (16) Parkingson HC, Tonta M, Coleman H, Tare M. Role of membrane potential in endothelium-dependant relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 1995; 484(469):480.
- (17) Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9:272-4.
- (18) Feletou M, Vanhoutte P.M. Endothelium-dependant hyperpolarisation of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 1988; 93:515-24.
- (19) Chen G, Yamamoto Y, Miwa K, Suzuki H. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substance. *American journal of physiology* 1991; 260:H1888-H1892.
- (20) Mombouli JV, Bissiriou I, Agboton VD, Vanhoutte P.M. Bioassays of endothelium-derived hyperpolarising factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221:484-8.
- (21) Hamberg M, Svensson J SB. Thromboxane- a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72:2994-8.
- (22) Needleman P, Moncada S, Bunting S et al. Identification of an enzyme in platelet microsome which generates thromboxane A2 from prostaglandines endoperoxides. *Nature* 2197 June; 261:558-60.
- (23) Narumiya S, Sugimoto Y, Fumitaka U. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; 79:1193-226.
- (24) Dom GW, Becker MW, Davis MG. Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992; 267:24897-905.

- (25) Halushka PV, Allan CJ, Dacis-Bruno KL. Thromboxane A2 receptors. *Journal of lipid mediators and cell signalling* 1995; 12:361-78.
- (26) Mestel F, Oetliker O, Beck E et al. Severe bleeding association with defective thromboxane synthase. *Lancet* 1980;157.
- (27) Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F et al. Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J Clin Invest* 1994; 94:1662-7.
- (28) Farrukh IS, Micheal JR, Summer WR et al. Thromboxane-induced pulmonary vasoconstriction. Involvement of calcium. *J Appl Physiol* 1985; 58:34-44.
- (29) Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R et al. Tromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1990; 335:751-4.
- (30) Chen ST, Hsu CY, Hogan EL et al. Thromboxane A2, prostacyclin and leukotrienes in cerebral ischemia. *Neurology* 1986; 36:466-70.
- (31) Whittle BRJ, Kauffman GL, Moncada S. Ulceration of the gastric mucosa following vasoconstriction with tromboxane A2. *Nature* 1981; 292:472-4.
- (32) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-5.
- (33) Yanagisawa H, Inouie A, Takuwa Y et al. *Cardio Pharmacol* 1989; 13(5):S13-S17.
- (34) Yoshizumi M, Kuhihara T, Sugiyama F et al. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:859-64.
- (35) Imai T, Hirata T, Emori M et al. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992; 19:753-7.
- (36) Kramer BK, Ackermann M, Kohler SM, Riegger GAJ. Role of endothelin in hypertension. *Clin Investig* 1994; 72:88-93.
- (37) Giannessi D, Del RY S, Vitale L. The roles of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacological research* 2001; 43(2):111-26.
- (38) Lipton H, Goff J, Hyman A. Effects of endothelin in the systemic and renal vascular beds in vivo. *J Pharmacol* 1988; 155:197-9.

- (39) Beggini A. Endothelin antagonists in renal disease. *Kidney Int* 2005; 57:1778-94.
- (40) Marsen TA, Schrame K.H, Dunn M.J. Renal actions of endothelin: linking cellular signaling pathways to kidney disease. *Kidney Int* 1994; 45:336-44.
- (41) Pollock D.M. Renal endothelin in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9:157-64.
- (42) Lerman A, Holmes DR, Malcom R et al. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *circulation* 1995;(92):2426-31.
- (43) Goraca A. New view of the role of endothelin. *Endocrine regulations* 2002; 36:161-7.
- (44) Lin H, Mariem S, Smith MJ, Young DB. Effect of endothelin-1 on glomerular hydraulic pressure and renin release in dogs. *Hypertension* 1993; 21:845-51.
- (45) Tagahi H, Reinach PS, Yoshimura N, Honda Y. Endothelin-1 promotes corneal epithelial wound healing in rabbits. *Curr Eye Res* 1994; 13(8):625-8.
- (46) Muller DN, Fiebeler A, Park JK et al. Angiotensin II and endothelin induce inflammation and thereby promote hypertension-induced end-organ damage. *Clin Nephrol* 2003; 60(1):S2-S12.
- (47) Marsh MM, Findlay JK, Salamonsen LA. Endothelin and menstruation. *Human Reproduction* 1996; 11(2):83-90.
- (48) Uchide T, Masuda H, Mitsui Y, Saida K. Gene expression of vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 in ovary, uterus and embryo: comprehensive gene expression profiles of the endothelin ligand-receptor system revealed by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis in adult mouse tissues and during late embryonic development. *J Mol Endocrinol* 1999; 22(2):161-71.
- (49) Baynash AG, Hosoda K, Giaid A et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994; 79:1277-85.
- (50) Hooper NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS* 1994; 354:1-6.
- (51) Hunley TE, Kon V. Update on endothelin-biology and clinical implications. *Pediatric nephrology* 2001; 16:752-62.

- (52) Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J Biol Chem* 1989; 264:18 156-18 161.
- (53) Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M et al. Specific expression of human endothelin-2 gene in a renal adenocarcinoma cell line. *FEBS lett* 1990; 274:136-40.
- (54) Xu D, Emoto N, Giaid A et al. ECE-1: A membrane bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big-ET-1. *Cell* 1994; 78:473-85.
- (55) Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei M.G. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* 1995; 270:29794-8.
- (56) Schweiser A, Valdenaire O, Nelbock P et al. Human endothelin converting enzyme: three isoforms with distinct subcellular localization. *Biochem J* 1997; 328:871-7.
- (57) Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin converting enzyme-2 is a membrane-bound phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995; 270:15262-8.
- (58) Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS* 1998; 428:304-8.
- (59) Xu D, Emoto N, Giaid A et al. ECE-1; A membrane bound metalloprotease that catalyses the proteolytic activation of big-ET-1. *Cell* 1994; 78:473-85.
- (60) Yanagisawa M, Yanagisawa H, Kapur R P et al. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signalling revealed by targeted disruption of endothelin-converting enzyme-1 gene. *Development* 1998; 125:825-36.
- (61) Wagner OF, Christ G, Wojta J. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:16 066-16 068.
- (62) Anderson K.M, Murahashi T, Dostal D.E, Peach M.J. Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiology* 1993; 264:C179-88.
- (63) Nussenzveig D.R, Lewicki J.A, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 1990; 265:20 952-20 958.

- (64) Fukuroda T, Kobayashi M, Ozaki S. Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. *J Appl Physiol* 1994; 76:1976-82.
- (65) Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptor. *J Appl Physiol* 1996; 81:1510-5.
- (66) Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptor in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199(3):1461-5.
- (67) Tagayanagi R, Kitazumi K, Takazaki C et al. Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS* 1991; 282:103-6.
- (68) Ihara M, Sacki T, Funabashi K et al. Two endothelin receptor subtypes in porcine arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17(S119):S121.
- (69) Rimar S, Gillis C.N. Differential uptake of endothelin-1 by the coronary and pulmonary circulations. *J Apply Physiol* 1992; 73:557-62.
- (70) Weibel E.R, Palade G.E. New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol* 1964; 23:101-12.
- (71) Harrison V.J, Corder R, Anggard E.E, Vane JR. Evidence for vesicles that transport endothelin-1 in bovine aortic endothelial cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S57-S60.
- (72) Barnes K, Brown C, Turner A.J. Endothelin-converting enzyme. Ultrastructure localisation and its recycling from the cell surface. *Hypertension* 1998; 31:3-9.
- (73) Fujimoto S, Yamamoto K, Arashidani K et al. Endothelial specific granule in the umbilical veins of the post-natal rabbit. *Cell Tissu res* 1982; 227:509-18.
- (74) Wagner DD, Olmsted J.B, Marder VJ. Immunolocalisation of von willebrand protein in weidel-palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982; 95:355-60.
- (75) Doi Y, Ozaka T, Katzuki M et al. Histamine release from weidel-palade bodies of toad aortas induced by endothelin-1 and sarafotoxin-6b. *Anat rec* 1995; 242:374-82.

- (76) Russel FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules. A novel intracellular site for isoforms of the endothelin converting enzyme. *Circ Res* 1998; 83:314-21.
- (77) Russel FD, Skepper JN, Davenport A. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31:424-30.
- (78) Portoghese PS. Bivalent ligand and the message address concept in the design of selective opioid receptor antagonist. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10:230-5.
- (79) Dupuis J. Endothelin-receptor antagonists in pulmonary hypertension. *Lancet* 2001; 358:1113-4.
- (80) Moreland S, McMullen D, Aboa-Offei B, Seymour A. Evidence for a different location of vasoconstrictor endothelin receptor in the vasculature. *British Journal of Pharmacology* 1994; 112:704-8.
- (81) Moleenar P, Oreilly G, Sharkey A et al. Characterization and localization of endothelin receptors subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 1993; 72:526-38.
- (82) Margaret R, MacLean, McCulloch K.M, Baird M. Endothelin ETA and ETB receptor mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1993; 23:838-45.
- (83) Perrault T, Baribeau J. Characterization of endothelin receptor in newborn piglet lung. *Am J Physiology* 1995; 268:L607-L614.
- (84) Ladouceur DM, Flynn MA, Keiser SA et al. ETa and ETb receptor coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196:209-15.
- (85) Coughlin SR. Expanding horizons for receptors coupled to G proteins; diversity and disease. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:191-7.
- (86) Schwartz TW, Fraser CM. Locating ligand binding sites in 7 TM receptors by protein engineering. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 5:434-44.
- (87) Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Ann Rev Biochem* 1991; 60:653-88.
- (88) Heldin C.H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995; 80:213-23.

- (89) Taggart AK, Pugh BF. Dimerization of TFIID when not bound to DNA. *Science* 1996; 272:1331-3.
- (90) Whitfield GK, Jurutka PW, Haussier MR, Haussier CA. Steroid hormones receptors; evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem* 1999; 32/33:110-22.
- (91) Hébert T, Moffet S, Morello JP et al. A peptide derived from a B2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptors dimerization and activation. *J Biol Chem* 1996; 271:16 384-16 392.
- (92) Zeng FY, Wess J. Identification and molecular characterization of M3 muscarini receptor dimers. *J Biol Chem* 1999; 274:19487-97.
- (93) Rios CD, Jordan BA, Gomes LA. G protein coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmaceuticals and therapeutics* 2001; 92:71-87.
- (94) Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 2004; 5:30-4.
- (95) Gomes I, Gupta A, Filipovska J et al. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:5135-9.
- (96) Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G et al. Ligand dependant differences in the internalization of endothelin A and B receptors heterodimers. *J Biol Chem* 2004; 279:27 679-27 687.
- (97) Harata N, Himeno A, Shigematsu K et al. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimers. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22:207-26.
- (98) Masaki T, Miwa S, Sawamura T et al. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *European Journal of Pharmacology* 1999; 375:133-8.
- (99) Iwamuro T, MiwaS, Zhang XF et al. Activation of three types of voltage-independent Ca<sup>2+</sup> entry channel in A7r5 cells by endothelin-1 revealed by a novel Ca<sup>2+</sup> entry channel blocker LOE 908. *British Journal of Pharmacology* 2005; 126:1107-14.
- (100) Aquilla E, Whelchel A, Knot HJ et al. Activation of multiple mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways by the endothelin B receptor requires the cytoplasmic tails. *J Biol Chem* 1996; 271:31 572-31 579.



- (101) Sugden PH. Signaling pathways activated by vasoactive peptides in the cardiac myocytes and their role in myocardial pathologies. *J Card Fail* 2002; 8:S359-S369.
- (102) Wang X, Tokuda H, Hirade K, Kozawa O. Stress activated protein kinase/c-JUN N-terminal Kinase plays a part in endothelin-1 induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002; 87:417-23.
- (103) Kodama H, Fukuda K, Takahashi E. Selective involvement of p130 cas/Crk/Pyk2/c-Src in endothelin-1 induced JNK activation. *Hypertension* 2003; 41:1372-9.
- (104) Masaki T, Miwa S, Sawamura T et al. Subcellular mechanism of endothelin action in vascular system. *European Journal of Pharmacology* 1999; 375:133-8.
- (105) Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaine*. Marieb 1992;610.
- (106) Actelion Pharmaceuticals. Pathophysiological role of endothelin. Internet 2005.
- (107) Miyauchi T, Goto K. Heart failure and endothelin receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20:210-7.
- (108) Ergul A, Grubbs AL, Zhang Y, Spinale FG. Selective upregulation of endothelin converting enzyme-1a in the human failing heart. *J Card Fail* 2000; 6:314-20.
- (109) Serneri GG, Cecioni I, Vanni S et al. Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy: endothelin-1 system in the human failing heart. *Circ Res* 2000; 86:377-85.
- (110) Tonnessen T, Lyberg T, Geriran O, Christensen G. Cardiac endothelin-like immunoreactivity and preproendothelin-1 mRNA expression in human heart failure. *Scan cardiovasc J* 2000; 34:21-7.
- (111) Galatius-Jensen S, Wroblewski H, Emmeluth C et al. Plasma endothelin in congestive heart failure: a predictor of cardiac death? *J Card Fail* 1996; 2:71-6.
- (112) Pousset F, Isnard R, Lechat P et al. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur heart J* 1997; 18:254-8.
- (113) Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M, Hartter E, Ogris E, Frey B, Heinz G, and Maurer G.

Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. 3 27, 633-641. 1996. 8606275, J Am Coll Cardiol. Ref Type: Generic

- (114) Puesje B, Beryerman B, Breu V et al. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *circulation* 1999; 99:1802-9.
- (115) Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P et al. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995; 346:732-6.
- (116) Love MP, Haynes WG, Gray GA et al. Vasodilator effects of endothelin-converting enzyme inhibition and endothelin ETA receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors. *circulation* 1996; 94:2131-7.
- (117) Spieker LE, Mitrovic V, Noll G et al. Acute hemodynamic and neurohumoral effects of selective ET(A) receptor blockade in patients with congestive heart failure. ET 003 Investigators. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:1745-52.
- (118) Love MP, Ferro CJ, Haynes WG et al. Endothelin receptor antagonism in patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 47:166-72.
- (119) Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1998; 80:15L-25L.
- (120) Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46:325-415.
- (121) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328:1732-9.
- (122) Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ETA receptor antagonist. *circulation* 1997; 96:1593-7.
- (123) Markewitz BA, Micheal JR, Kohan DE. Endothelin-1 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiology* 1997; 272:L1078-L1083.
- (124) Michel R.P, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:542-54.

- (125) Michel RP, Langleben D, Dupuis J, Tesiph CJPP2, 81:542-54. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:398-405.
- (126) D'Orleans-Juste P. Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A2 from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ETB receptor antagonist, BQ-788. *British Journal of Pharmacology* 1994; 113:1257-62.
- (127) Horgan MJ. Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. *Circ Res* 1991; 69:157-64.
- (128) Faltin DL, Weber A, Lacroix JS et al. Lung mechanics and pulmonary but not systemic vascular responses to ET-1 are Tx and infusion rate dependent. *J Appl Physiol* 1996; 80:1716-23.
- (129) Aharinejad S, Schraufnagel DE, Miksovsky A et al. Endothelin-1 focally constricts pulmonary veins in rats. *Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:148-56.
- (130) Toga H, Ibe BO, Raj JU. In vitro responses of ovine intrapulmonary arteries and veins to endothelin-1. *Am J Physiology* 1992; 263:L15-L21.
- (131) Battistini B, Filep J, Sirois P. Potent thromboxane-mediated in vitro bronchoconstrictor effect of endothelin in the guinea-pig. *European Journal of Pharmacology* 1990; 178:141-200.
- (132) 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; 123:1621-30.
- (133) Lal H, Woodward B, Williams KI. Investigation of the contributions of nitric oxide and prostaglandins to the actions of endothelins and sarafotoxin 6c in rat isolated perfused lungs. *British Journal of Pharmacology* 1996; 118:1931-8.
- (134) Eddahibi S, Springall D, Mannan M et al. Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia. *Am J Physiology* 1995; 265:L571-L580.
- (135) Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ET(B)Receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Therapy* 2000; 13:135-40.

- (136) Hirata Y, Emori T, Eguchi S et al. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 91:1367-73.
- (137) Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W, Oksche A. Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *Cardio Pharmacol* 2004; 44:S30-S33.
- (138) Harada N. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22:207-26.
- (139) Emma J Mickley, Gillian A Gray, and David J Webb. Activation of endothelin ETA receptor masks the constrictor role of endothelin B receptors in rat isolated small mesenteric arteries. 120, 1376-1382. 1997.  
Ref Type: Generic
- (140) M.R.MacClean, C.C Docherty, K.M McCulloch, and I Morecroft. Effect of novel mixed ETA/ETB antagonists on response to ET-1 in human small muscular pulmonary arteries. 11, 147-149. 1998.  
Ref Type: Generic
- (141) Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S et al. Down-regulation of ETB receptor, but not ETA receptor, in congestive lung secondary to heart failure. *Life Science* 1998; 62:185-93.

Q

Q

not a student