

Université de Montréal

**La prolifération des myofibroblastes pulmonaires induite par l'ET-1
chez le rat normal et chez le rat insuffisant cardiaque**

Par :
Annick Préfontaine

Département de physiologie
Faculté de Médecine
Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue
de l'obtention du grade de Msc en Physiologie

Avril 2007

©, Annick Préfontaine, 2007



W

4

U58

2007

V.108

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**La prolifération des myofibroblastes pulmonaires induite par l'ET-1 chez le rat
normal et chez le rat insuffisant cardiaque**

Présenté par :
Annick Préfontaine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Bruce Allen
Président-rapporteur

Dr Jocelyn Dupuis
Directeur de recherche

Dr Angelino Calderone
Co-directeur de recherche

Dr David Langleben
Membre du jury

Résumé Français

INTRODUCTION : L'insuffisance cardiaque (IC) est caractérisée par l'épaississement des septa alvéolaires et d'une prolifération myofibroblastique. L'endothéline-1 (ET-1), un puissant agent mitogénique des myofibroblastes (MYFs), est augmentée lors d'IC et pourrait ainsi contribuer au remodelage pulmonaire par la stimulation de la prolifération des MYFs. Nous avons donc investigué le rôle de système de l'ET-1 et de ses récepteurs (ET_A-R et ET_B-R) chez des MYFs de rats normaux et IC.

MÉTHODES ET RÉSULTATS :

L'effet proliférateur de l'ET-1 (10nM) a été mesuré par incorporation de [³H]-leucine [³H]-thymidine. Le blocage sélectif d'ET_A-R (BQ-123) ou d'ET_B-R (BQ-788) n'a pas inhibé la prolifération ou la synthèse protéique. Cependant, la combinaison des deux antagonistes a complètement inhibée l'effet mitogénique de l'ET-1. Étonnamment, à l'état basal, les antagonistes sélectifs des R-ET ont activé la prolifération des MYFs. Toutefois, la combinaison des deux antagonistes seule n'a pas induit cet effet mitogénique.

Les rats IC injectés avec du 5'Bromodeoxyuridine (BrdU) ont confirmé la présence de remodelage pulmonaire par l'épaississement des septa alvéolaires et d'une augmentation significative de l'incorporation de BrdU. La réponse mitogénique à l'ET-1 chez les IC était significativement moins élevée que pour les MYFs de rats sham. Cet effet était accompagné d'une diminution de la production d'ET-1 et de l'expression d'ET_A-R et d'ET_B-R par les MYFs IC.

CONCLUSION : Nos résultats démontrent que les deux récepteurs régulent la prolifération des myofibroblastes pulmonaires et suggèrent aussi la possibilité d'une interaction entre les deux récepteurs. Nous avons également confirmé une régulation à la baisse du système de l'ET-1 dans les MYFs pulmonaires de rats souffrant d'IC.

Mots Clés : Endothelin-1, myofibroblastes, poumon, insuffisance cardiaque, récepteurs

Résumé Anglais

BACKGROUND: Congestive heart failure (CHF) is characterized by the thickening of the alveolar septa and myofibroblast (MYF) proliferation. Endothelin-1 (ET-1), a putative mitogen for MYF, is increased in CHF and may contribute to lung remodelling by directly promoting MYF proliferation. We therefore investigated the role of ET-1 and its receptors (ET_A-R and ET_B-R) on isolated normal and CHF rat lung MYF.

METHODS AND RESULTS:

The proliferative effect of ET-1 (10nM) was measured by the incorporation of [³H]-leucine and [³H]-thymidine. Selective ET_A-R blockade (BQ-123) or selective ET_B-R blockade (BQ-788) did not inhibit proliferation or protein synthesis. However, the combination of both antagonists completely abolished the proliferative effect of ET-1. Surprisingly, in basal conditions, selective ET-R antagonists alone induced a significant increase of MYF proliferation. However, the presence of both ET-R antagonists alone didn't induce this proliferation.

CHF rats injected with BrdU demonstrated lung remodelling with thickening of the alveolar septa and significant increase in BrdU uptake. The mitogenic response to ET-1 in CHF was significantly less than for sham rats. This effect was associated with a significantly lower production of ET-1 and a reduced expression of ET_A-R and ET_B-R CHF MYF.

CONCLUSION: Our findings indicate that both the ET_A-R and the ET_B-R are implicated in the proliferation of lung MYF proliferation and suggest a possible cross-talk between the receptors. We also confirmed a down-regulation of the ET-1 system in CHF MYF which could be a protective response to a chronic exposure to high level of ET-1.

Keywords: Endothelin-1, myofibroblasts, lung, congestive heart failure, receptors

Table des Matières	
PAGE TITRE	I
L'IDENTIFICATION DU JURY	II
RESUME FRANÇAIS	III
RÉSUMÉ ANGLAIS	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTES DES SIGLES ET ABBREVIATIONS	IX
DEDICACE	XI
LES REMERCIEMENTS	XII
1 INTRODUCTION	13
1.1 SYSTEME ENDOTHELINE	13
1.1.1 Rôles Physiologique de l'ET-1	15
1.1.2 Biosynthèse et Dégradation.....	15
1.1.3 Clairance de l'ET-1.....	17
1.1.4 Sécrétion de l'ET-1	18
1.1.5 Récepteurs de l'ET-1.....	19
1.1.6 Voies de signalisation intracellulaire.....	22
1.2 CIRCULATION PULMONAIRE.....	27
1.3 L'ET-1 ET PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES.....	31
1.3.1 Insuffisance Cardiaque	31
1.3.2 Hypertension pulmonaire.....	34
1.3.3 Traitements actuel de l'HTP	37
1.3.4 Antagonistes sélectifs ou non sélectifs pour les récepteurs de l'ET-1 lors d'HTP artérielle.....	39
1.4 MYOFIBROBLASTES	39
1.5 JUSTIFICATION DE L'ETUDE	43
2 MATERIELS ET METHODES	45
2.1 LIGATURE DE L'ARTERE CORONAIRE INTERVENTRICULAIRE ANTERIEURE (LAD)	45
2.2 ISOLATION DES MYOFIBROBLASTES PULMONAIRES.....	46
2.3 ÉVALUATION DE LA SYNTHÈSE D'ADN ET PROTEIQUE	47
2.4 ISOLATION DES PROTEINES DES MYOFIBROBLASTES PULMONAIRES.....	49
2.5 IMMUNOBUVARDAGE PAR WESTERN DES RECEPTEURS ET _A ET ET _B	49
2.6 IMMUNOFLUORESCENCE DE COUPE DE POUMON	50
2.7 QUANTIFICATION D'ET-1 DANS LES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE	51
2.8 IMMUNOFLUORESCENCE	52
3 ARTICLES	53
3.1 ARTICLE 1: ROLE OF ENDOTHELIN RECEPTORS ON BASAL AND STIMULATED LUNG MYOFIBROBLASTS PROLIFERATION.....	53
3.2 ARTICLE 2: DOWN-REGULATION OF THE ET-1 SYSTEM IN CHF LUNG MYOFIBROBLASTS	74
3.3 3. RESULTS	82
4 DISCUSSION	98
4.1 ROLES DES RECEPTEURS DE L'ET-1 SUR LA PROLIFERATION DES MYOFIBROBLASTES PULMONAIRES	98
4.2 MODIFICATION DU SYSTEME DE L'ET-1 DANS LES MYOFIBROBLASTES PULMONAIRES DE RATS IC	102
4.3 LIMITES DE L'ETUDE	106
5 CONCLUSION	107
6 BIBLIOGRAPHIES	108

Liste des Tableaux**Introduction**

Table I : Fonctions des récepteurs ET _A et ET _B dans les poumons	p.23
Table II : Classification de l'hypertension pulmonaire par l'OMS	p.36
Table III : Fonctions des myofibroblastes	p.42
Table IV : Résumé des facteurs de croissances, cytokines et médiateurs de l'inflammation sécrétés par les myofibroblastes	p.42
Table V : Récepteurs exprimés par les myofibroblastes	p.43

Articles 2

Table 1 ; Hemodynamic and morphometric parameters	p.93
---	------

Liste des figures

Introduction

- Figure 1 : La séquence d'acides aminés des trois isoformes de l'endothéline p.15
- Figure 2 : Les agents activant l'endothéline-1 p.15
- Figure 3 : Biologie de l'ET-1 et de ses récepteurs au niveau de la cellule endothéliales et musculaires lisses p.22
- Figure 4 : Le mécanisme de l'ET-1 induisant la vasoconstriction p.24
- Figure 5 : La voie intracellulaire d'ERK $\frac{1}{2}$ p.25
- Figure 6 : La voie intracellulaire de JNK p.26
- Figure 7 : La voie intracellulaire de p38 p.27
- Figure 8 : La circulation sanguine intra-pulmonaire p.29
- Figure 9 : Les différentes approches thérapeutiques pour le traitement de l'HTP p.39

Article 1

- Figure 1 : Immunofluorescent study of isolated lung myofibroblasts p.70
- Figure 2 : The effect of BQ-123 and BQ-788 on protein synthesis and proliferation of lung myofibroblasts stimulated with ET-1 p.71
- Figure 3 : Lung myofibroblasts proliferation with a pre-treatment with intracellular pathway inhibitor p.72
- Figure 4 : The effect of BQ-123 and BQ-7888 on the proliferation and protein synthesis of lung myofibroblasts p.73
- Figure 5 : Quantification of ET-1 in culture media by a sandwich ELISA p.74

Article 2

- Figure 1 : Immunofluorescence expression and quantification of BrdU and vimentin in isolated lung from sham and CHF rats p.95
- Figure 2 : Protein synthesis and proliferation of sham and CHF lung myofibroblasts induced by ET-1 p.96

Figure 3 : Quantification of ET-1 secretion in culture media from sham and CHF lung MYF by a sandwich ELISA p.97

Figure 4 : Expression of ET_A and ET_B receptors by Western blot in sham and in CHF rats induced by MI p.98

Listes des sigles et abréviations

Ang II	angiotensine II
ANP	facteur natriurétique de l'oreillette
ARNm	acide ribonucléique messenger
BQ-123	antagoniste spécifique du récepteur A
BQ-788	antagoniste spécifique du récepteur B
BrdU	5'-bromodeoxyuridine
BSA	Sérum Albumine de boeuf
Ca ²⁺	calcium
CCPA	conseil canadien de protection des animaux
CDA	comité de déontologie animale
CE	cellule endothéliale
CHF	congestive heart failure
Cl ⁻	chlore
DAG	diacylglycérol
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ET-1	endothéline
ET _A -R	récepteur A de l'endothéline
ET _B -R	récepteur B de l'endothéline
FBS	serum de bœuf fœtal
HBSS	hank's balanced salt solution
Hsp25/27	petite protéine à choc thermique
HTP	hypertension pulmonaire
IC	insuffisance cardiaque
IP ₃	inositol trisphosphate
ITS	insulin-transferrine-selenium
K ⁺	potassium
LAD	artère coronaire interventriculaire
LU 135252	antagoniste spécifique du récepteur A de l'endothéline
LY-294002	inhibiteur spécifique pour la PI 3kinase
MI	infarctus du myocarde
mm de Hg	millimètres de mercure
MYF	myofibroblastes
NDS	normal donkey serum
NEP	endopeptidase-24.11 neutre
NSCC-1	canaux cationiques non sélectifs 1
NSCC-2	canaux cationiques non sélectifs 2
PBS	tampon de phosphate salin
PDGF	facteur de croissance plaquettaire
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PSF	fonction de point spread
PVDF	Polyvinylidene di fluoride
SB-203580	inhibiteur spécifique pour la p38α et p38β

SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	acide trichloroacétique
TGF- β	Facteur de croissance transformant β
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale
TVC	tension veineuse centrale
VEGF	facteur de croissance endothéliale

Dédicace

Ce mémoire est dédié à Francine Préfontaine ma mère bien aimée, qui a su être le meilleur modèle tant au plan de ma carrière qu'au plan familial. Malgré ton passage trop court dans ce monde, tu as réussi à me faire connaître les valeurs d'une personne indépendante, forte de caractère et persévérante. Tu m'as permis de croire qu'une femme pouvait exceller tant du côté professionnel que familial. Merci pour tout.

Les Remerciements

Je remercie mon père et mes trois sœurs, pour tout le support et l'encouragement dont vous m'avez donné. Vous m'avez toujours soutenu dans mes études et cru à ma réussite. Vous êtes responsable, en grande partie, de tout ce que j'ai accompli jusqu'à aujourd'hui. Merci

Je remercie aussi Michael D'Andrea, mon support moral irréprochable qui a su me changer les idées dans les moments où j'en avais le plus de besoin. Merci pour toutes les petites attentions et pour ton oreille attentive.

Je voudrais aussi remercier mon directeur de recherche, le Dr Jocelyn Dupuis ainsi que mon co-directeur, le Dr Angelino Calderone. Merci de m'avoir apporté toute cette aide précieuse et d'avoir partagé avec moi toutes vos connaissances scientifiques.

Merci à Stéphanie Sauvageau d'avoir partagée toutes ces connaissances scientifiques avec moi. Merci pour le support et l'aide que tu m'as apporté lors des moments difficiles. Cette maîtrise a été beaucoup plus agréable grâce à ta compagnie. P.S. Tu as réussi à rendre la pareille.

Un dernier merci à Nathalie Rüel pour toutes les petites attentions et l'aide que tu m'as apporté.

1 Introduction

1.1 Système Endothéline

L'endothéline (ET-1), considérée comme un médiateur autocrine/paracrine vasoactif de 21 acides aminés, a été découverte en 1988 par le groupe de Yanagisawa à partir de cellules endothéliales aortique porcines. L'ET-1 est l'un des plus puissant vasoconstricteur connue jusqu'à aujourd'hui (1). On le retrouve sous trois isoformes soit ET-1, ET-2 et ET-3 encodées par 3 gènes indépendants. Les trois isoformes possèdent deux ponts disulfures, une queue hydrophobe dans la portion C-terminale et une portion N-terminale qui diffère selon les isoformes. L'ET-1 est celle qui est la plus étudiée, la plus puissante des trois et la plus abondante. L'ET-2 est retrouvée surtout dans les tissus rénaux et au niveau de l'intestin, tandis que l'ET-3 se retrouve surtout dans le système nerveux central et au niveau des reins (Figure 1) (2). L'ET-1 peut-être activée par différents agonistes incluant la thrombine, l'adrénaline, le TGF- β (transforming growth factor), l'ionomycin, le phorbol ester, l'angiotensine II, la vasopressine et le stress (1, 3, 4). Par contre, la sécrétion d'ET-1 peut-être inhibée par le monoxyde d'azote, le facteur natriurétique de l'oreillette (ANP), la prostacycline et la bradykinine (Figure 2) (5).

Figure 1 : La séquence d'acides aminés des trois isoformes de l'endothéline (6)

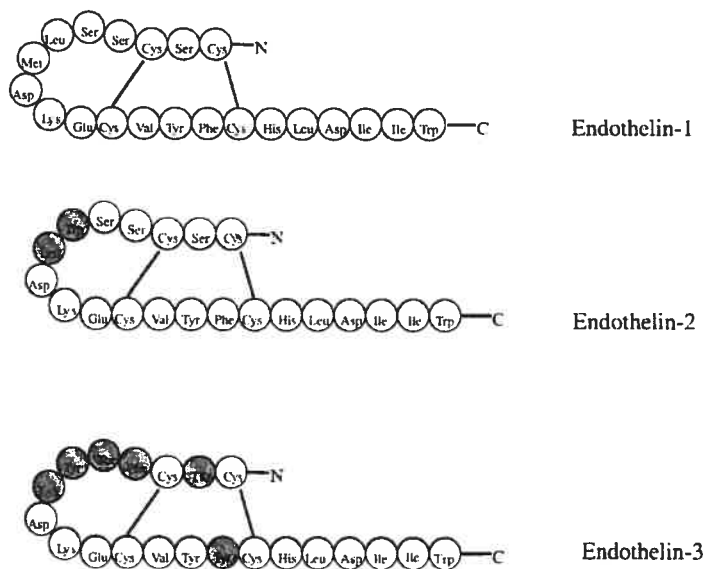
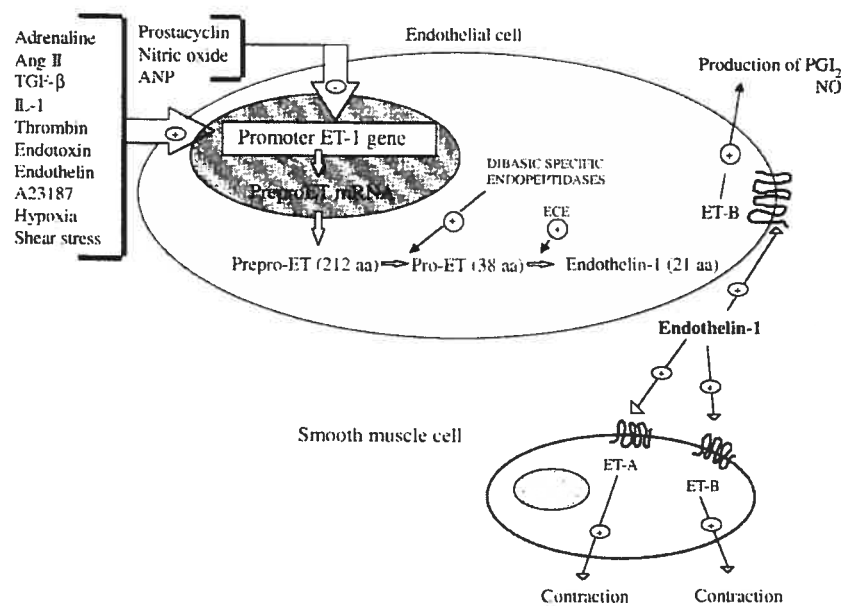


Figure 2 : Les agents activant l'endothéline-1 (6)



1.1.1 Rôles Physiologique de l'ET-1

L'ET-1 peut induire une importante vasoconstriction vasculaire par l'activation de la phospholipase C (PLC) fixée aux parties internes des récepteurs. Cette enzyme catalyse la dégradation de certains phospholipides de la membrane cellulaire, en particulier le phosphatidyl-inositol bisphosphate (PIP₂) qui va se dégrader en deux seconds messagers différents, l'inositol trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ va mobiliser le calcium contenu dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, par l'intermédiaire de ce second messager, les ions calcium vont induire la contraction cellulaire. L'ET-1 est aussi impliquée dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire par le contrôle du tonus vasculaire basal (7). Elle augmente également la pression sanguine de manière dose dépendante et contrôle plusieurs aspects de la fonction rénale. Elle permet d'augmenter la résistance vasculaire, de diminuer le flux sanguin rénale et la filtration glomérulaire (8, 9). En plus de son activité vasoconstrictrice sur les cellules musculaires lisses, l'ET-1 stimule la synthèse de collagène, la contraction et le chimiotactisme (10-12). L'ET-1 possède également une activité pro-mitogénique induisant ainsi la prolifération de différents types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les fibroblastes (13, 14). Elle induit aussi la sécrétion de plusieurs substances comme l'aldostérone, la vasopressine, l'angiotensine II et l'ANP et est aussi impliquée dans le développement fœtal et dans le processus de guérison (15-17).

1.1.2 Biosynthèse et Dégradation

Le précurseur de chacune des trois isoformes est encodé chez l'humain par des gènes distincts : préproendothelin-1 (préproET-1) se retrouve dans le chromosome 6p23-24, préproET-2 dans le chromosome 1p34 et préproET-3 dans le

chromosome 20q13.2-13.3 (18, 19). Les préproET, composées d'environ 200 acides aminés, sont clivées par des endopeptidases dibasiques de type furine spécifiques. Ce clivage protéolytique produit un peptide intermédiaire d'environ 40 acides aminés, la big ET (ET-1, ET-2 ou ET-3) (20). In vivo, big ET-1 a 1% de l'activité contractile de la forme mature de l'ET-1. La big ET-1 et la big ET-2 sont hydrolysées en ET-1 et ET-2 matures au niveau du site Tryptophane-Valine par l'une des multiples enzymes de conversion de l'endothéline (ECE). Pour ce qui est de la big ET-3, elle est clivée au niveau du site Tryptophane-Isoleucine par une ECE. Les ECEs font partis de la famille des métalloendopeptidases membranaire zinc dépendante qui comprend aussi l'endopeptidase-24.11 neutre (NEP) et la protéine associée au groupe Kell (21). Elles possèdent toutes un domaine cytoplasmique très court, un simple domaine transmembranaire et un domaine N-terminal très large qui contient le site actif de l'enzyme.

L'ECE-1 qui est encodée dans le chromosome 1p36 se retrouve sous quatre isoformes : ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c et ECE-1d (22, 23). Les différentes isoformes dérivent du même gène par des promoteurs alternatifs et ont une distribution distincte entre les tissus et les cellules. L'ARNm d'ECE-1c est la plus prédominante et se situe comme ECE-1a et ECE-1d au niveau de la surface cellulaire. ECE-1b se retrouve au niveau intracellulaire et co-localise avec des marqueurs pour l'appareil de golgi (24). La plus grande concentration d'ARNm d'ECE-2 est retrouvée au niveau des tissus neuronaux et son activité maximal se retrouve à un pH anormalement acide, pH = 5.5 (25). ECE-1 et ECE-2 sont très spécifiques pour la big ET-1 mais pas pour la big ET-2 ou la big ET-3. L'ECE-3 est reconnue pour son affinité plus élevée pour la big ET-3 que pour la big ET-1. De plus, la masse

moléculaire de l'ECE-3 (140 kDa) est plus élevée que celle de l'ECE-1 et de l'ECE-2 (130 kDa) (26).

Il a été démontré que le phosphoramidon protège partiellement l'inactivation de l'ET-1 à l'aide d'une peptidase présente dans l'homogénat de plusieurs organes et dans la fraction membranaire des reins et des poumons. Étant donné que le phosphoramidon est un inhibiteur spécifique de la NEP localisée au niveau membranaire de plusieurs types cellulaires, il a été conclu que la NEP jouait probablement un rôle dans l'inactivation de l'ET-1 (27). En effet, il a été démontré par le groupe de recherche de Vijayaraghavan que l'ET-1 était hydrolysée par la NEP et que la voie d'hydrolyse de l'ET-1 variait selon la structure de l'ET-1 (28).

1.1.3 Clairance de l'ET-1

Les organes responsables de la clairance de l'ET-1 comprennent les reins, le foie et les poumons (29). Comme plusieurs autres peptides, il a été démontré que la clairance de l'ET-1 était exclusivement régulée par l'un de ses récepteurs. En effet, deux études ont démontré le rôle exclusif du récepteur ET_B dans la clairance de l'ET-1 circulante. Le groupe de recherche de Fukuroda a démontré chez le rat que le récepteur ET_B joue un rôle important dans la clairance rapide de l'ET-1 dans la circulation sanguine. En inhibant le récepteur ET_B par infusion intraveineuse d'un antagoniste spécifique pour ce récepteur, BQ-788, ils ont significativement inhibé l'extraction d'[¹²⁵I]ET-1 par les poumons et les reins et ont également bloqué la vitesse de clairance de l'ET-1. De plus, dans le modèle de poumons isolés ils ont prouvé que 80% de l'[¹²⁵I]ET-1 est captée par les poumons lors d'un seul passage et que l'ajout de l'antagoniste BQ-788 diminue significativement cette captation par les

poumons (29). Une autre étude faite chez le chien a démontré le rôle important des poumons dans la clairance de l'ET-1 en prouvant que le poumon était capable d'extraire jusqu'à $31 \pm 8\%$ de l'ET-1 circulante lors d'un seul temps de transit pulmonaire. De plus, ils ont démontré que la clairance de l'ET-1 était complètement régulée par le récepteur ET_B par le fait qu'un traitement avec un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_B , BQ-788, a complètement inhibé la clairance pulmonaire et qu'un traitement avec un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A n'a eu aucun impact sur cette clairance (30). Comme d'autres peptides tel que l'Ang II et l'ANP, il est très probable que l'ET-1 circulante se lie à son récepteur ET_B et soit internalisé dans la cellule par endocytose.

1.1.4 Sécrétion de l'ET-1

La majorité de l'ET-1 synthétisée est relâchée au niveau basolatéral de la cellule (80%) vers le muscle lisse tandis que 20% est relâchée dans la circulation sanguine. La concentration d'ET-1 est environ 100 fois plus élevée au niveau tissulaire que plasmatique ou interstitielle.(2, 31) Dans les cellules eucaryotes, les protéines destinées à la sécrétion extracellulaire sont transportées vers la surface soit par la voie constitutive ou soit par la voie régulée (32). Le choix de la voie de sécrétion des protéines se fait au niveau du réseau trans-Golgi où les protéines sont condensées et enveloppées dans soit des vésicules de sécrétions constitutives ou soit dans des granules de sécrétions immatures (33, 34). La sécrétion de protéines par la voie régulée peut être contrôlée par différents stimuli externes qui permettent une sécrétion rapide de la protéine à une concentration élevée. La voie constitutive est par contre un processus continu se produisant à un taux constant, régulée majoritairement au niveau de la biosynthèse de la protéine. À l'état basal, les

cellules endothéliales relâchent l'ET-1 continuellement par la voie constitutive. Cette production endogène continue d'ET-1 contribue donc au maintien du tonus vasculaire. Le tonus vasculaire est maintenu à l'aide d'agents vasoconstricteurs tels que l'ET-1 et à l'aide d'agents vasodilatateurs tel que le NO (35). Comme plusieurs autres peptides tel que le facteur von Willebrand, l'ET-1 peut-être aussi emmagasinée dans des corps de Weibel-Palade afin d'être relâchée rapidement en réponse à un stimuli externe tel que mentionné précédemment. Ces corps de Weibel-Palade contient l'ET-1, la big ET-1 et l'ECE, permettant ainsi l'hydrolyse de la big ET-1 à l'intérieur de ses corps et le stockage de l'ET-1 (20, 36).

1.1.5 Récepteurs de l'ET-1

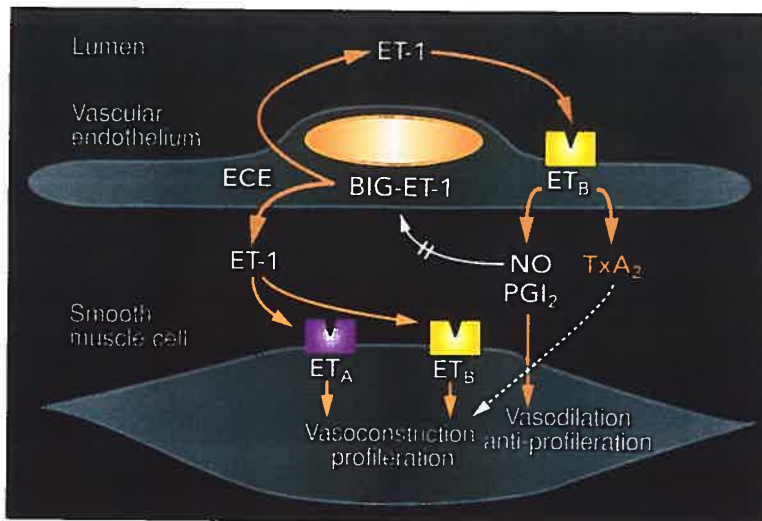
Chez l'humain, deux récepteurs pour l'ET-1 ont été clonés ET_A -R et ET_B -R (37). Ces deux récepteurs possèdent de l'homologie avec d'autres récepteurs de la super famille de la rhodopsine. Ils sont composés de sept passages transmembranaires et sont couplés aux protéines-G. Le récepteur ET_A d'humain est encodé dans le chromosome 4, contient 427 acides aminés et se lie fortement à l'ET-1 et l'ET-2 tandis qu'il a une affinité moindre pour l'ET-3. Pour ce qui est du récepteur ET_B , il est encodé dans le chromosome 13, possède 442 acides aminés et se lie fortement avec une affinité égale pour les trois isoformes de l'ET. Le clonage des récepteurs ET_A -R et ET_B -R a révélé une homologie à 60% entre les deux récepteurs. Les effets biologiques des récepteurs de l'ET-1 (rET-1) varient selon le nombre relatif de la population de chaque récepteur et selon le tissu ou l'organes où ils sont exprimés. L'expression d'un récepteur peut être régulée et ceci est spécifique à chaque récepteur. Par exemple, la cyclosporine induit au niveau des reins une augmentation de l'expression du récepteur ET_B tandis qu'elle n'affecte pas

l'expression du récepteur ET_A (38, 39). Les deux types de récepteurs à l'ET-1 sont exprimés dans plusieurs types cellulaires. On retrouve le récepteur ET_A au niveau des cardiomyocytes, des fibroblastes, des hépatocytes ainsi que sur les neurones. On peut également le retrouver au niveau des glomérules rénales et dans plusieurs vaisseaux cérébraux. Le récepteur ET_B est retrouvé dans les cellules du tubule rénal collecteur et sur certains neurones. Par ailleurs, les deux types de récepteur se retrouvent au niveau des oreillettes et des ventricules (40).

1.1.5.1 Récepteurs vasculaires de l'ET-1

La distribution des récepteurs ET_A et ET_B dans la circulation pulmonaires chez l'humain varie selon le diamètre des vaisseaux : plus le diamètre du vaisseau diminue, plus la proportion du récepteur ET_B augmente (41). Le récepteur ET_A prédomine au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires chez la plus part des espèces et n'est pas présent au niveau des cellules endothéliales. En général, le récepteur ET_A induit la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et la déposition de matrice extracellulaire. Le récepteur ET_B présent au niveau de la cellule musculaire lisse induit une vasoconstriction tandis qu'au niveau des cellules endothéliales, le récepteur ET_B possède une double fonction. En effet, il induit soit à une vasodilatation par la relâche de prostaglandine et de NO permettant ainsi d'inhiber l'effet vasoconstricteur et proliférateur de l'ET-1 par le récepteur ET_A ou soit potentialise la vasoconstriction des vaisseaux par la relâche de thromboxane A₂ (Figure 3) (42). Certaines études ont démontré chez certains tissus de certaines espèces que le récepteur ET_B pouvait induire la prolifération cellulaire et la vasoconstriction (43, 44).

Figure 3 : Biologie de l'ET-1 et de ses récepteurs au niveau de la cellule endothéliales et musculaires lisses



1.1.5.2 Récepteurs à l'ET-1 dans les poumons

Il est maintenant bien établi que l'ET-1 peut moduler les fonctions de plusieurs types cellulaires situés dans les poumons. Ces effets sont induits via la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B, qui sont largement distribués distinctivement dans les poumons. Les cellules musculaires lisses, les nerfs parasympathiques ainsi que les cellules épithéliales des voies aériennes chez l'humain expriment les deux récepteurs. Leurs fonctions sont résumées dans le tableau I. L'ET-1 possède également un rôle pro-inflammatoire dans les poumons exerçant différents effets sur plusieurs cellules résidentes et non-résidentes des voies aériennes, incluant les macrophages, les éosinophiles, les neutrophiles et les fibroblastes (45). Chez l'humain l'activation des macrophages par l'ET-1 provoque la production de cytokines comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) ainsi que la sécrétion d'anions superoxydes et de fibronectine (46, 47). Les récepteurs à l'ET-1 sont

également exprimés chez les cellules épithéliales alvéolaires et les cellules endothéliales des capillaires alvéolaires.

Tableau I : Fonctions des récepteurs ET_A et ET_B dans les poumons

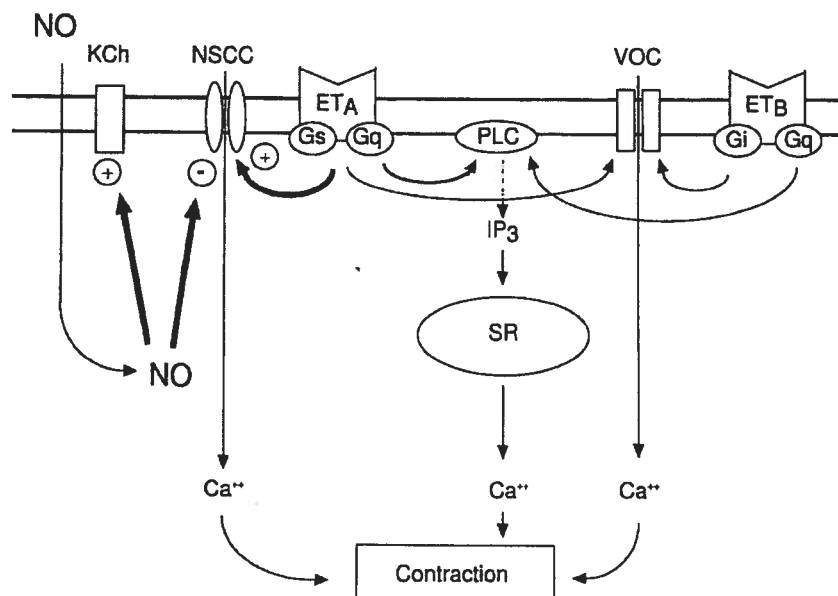
Types cellulaires	ET _A	ET _B
Cellules musculaires lisses des voies aériennes	Prolifération (48) Contraction (49-51)	Contraction (49-51)
Nerfs parasympathiques	Facilite neurotransmission (rat, souris, lapin)	Facilite neurotransmission chez l'humain
Cellules épithéliales des voies aériennes	Sécrétion de prostanoïdes (52) Sécrétion de fibronectine (53)	-----

1.1.6 Voies de signalisation intracellulaire

Les récepteurs ET_A et ET_B peuvent se coupler à différentes protéines G telles que Gas, Gai et Gaq, selon le type cellulaire où ils se retrouvent. L'ET-1 induit la contraction des cellules musculaires lisses par l'activation de la phospholipase C (PLC) qui est probablement activé par Gaq. La PLC va par la suite hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en deux sous-produits, soit l'IP₃ et le DAG. L'IP₃ va par la suite diffuser vers la surface du réticulum endoplasmique et se lier à un récepteur particulier, une conductine à calcium composée de quatre protomères identiques pourvus chacun d'un site de fixation pour l'IP₃. Chaque protomère comporte un domaine C-terminale qui traverse deux fois la membrane et l'ensemble des domaines transmembranaires des quatre protomères constitue le tunnel à Ca²⁺. La liaison de l'IP₃ à son récepteur provoque alors l'ouverture du tunnel permettant aux ions Ca²⁺ de passer du réticulum endoplasmique au cytosol.(54, 55) Ainsi, par l'intermédiaire de ce second messager, les ions calcium seront rapidement libérés dans le cytoplasme représentant la phase transitionnelle de

la contraction.(56) La phase soutenue de la contraction cellulaire est occasionnée par un influx de Ca^{2+} extracellulaire par l'entremise de canaux calciques à voltage dépendant. Suite à son activation, le DAG active la PKC qui va par la suite phosphoryler directement ou indirectement les canaux K^+ . La phosphorylation des canaux K^+ provoque leur inactivation et induit ainsi une dépolarisation de la cellule. La dépolarisation de la cellule entraîne alors l'activation des canaux calciques voltage dépendants de type L. L'ouverture de ces canaux calciques apporte donc une augmentation soutenue de Ca^{2+} . Cette augmentation intracellulaire de Ca^{2+} permet ainsi d'induire la contraction cellulaire. Il a aussi été démontré que trois types de canaux calciques à voltage indépendant peuvent être impliqués dans la mobilisation du calcium tels que les canaux cationiques non sélectifs (NSCC-1 et NSCC-2) ainsi que l'activation des canaux chlore (Cl^-) par le calcium (Figure 4) (57, 58).

Figure 4 : Le mécanisme de l'ET-1 induisant la vasoconstriction (58)

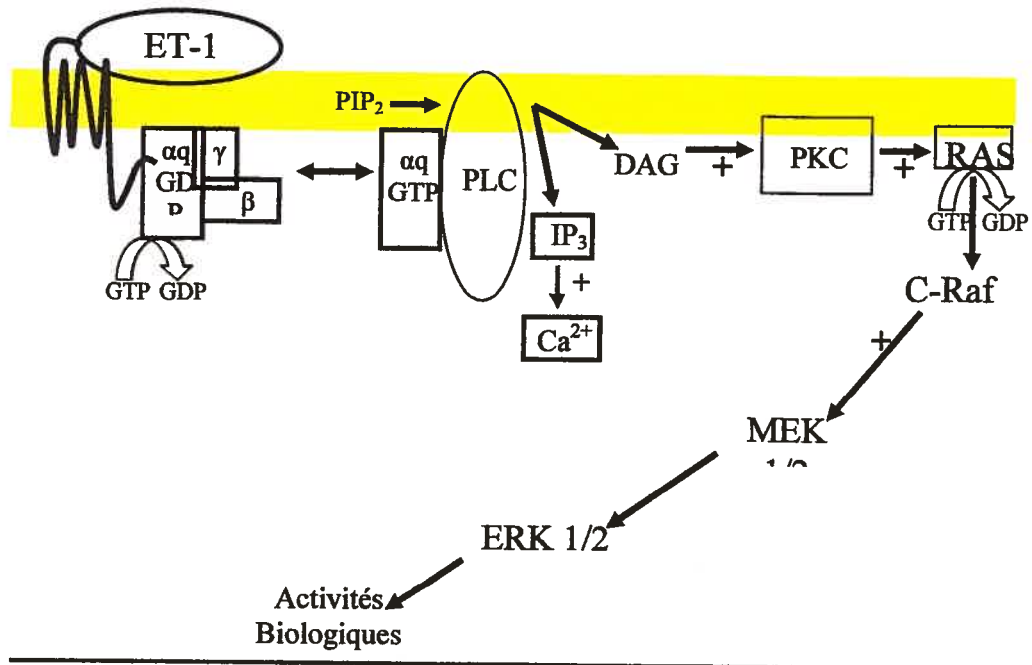


L'ET-1 peut aussi activer au moins trois autres voies intracellulaires importantes. Les mieux caractérisées sont celle de la DAG/PKC et les trois voies de

la MAPK, mais l'ET-1 peut aussi activer la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT. Les PKCs et les MAPKs possèdent différents rôles dans la cellule. Elles régulent la croissance cellulaire, la division cellulaire, les réactions cellulaires lors de stress cytotoxique et régulent la survie cellulaire. Les PKCs peuvent aussi réguler les mouvements ioniques et la contractilité cellulaire. La voie PI3K/AKT contrôle la synthèse protéique et la survie cellulaire. Les 3 voies des MAPKs sont la voie d'ERK1/2, JNK et de p38.

L'ET-1 active la voie d'ERK 1/2 par l'activation de la PKC qui va amener l'activation de Ras. Ras est une protéine liée à la membrane plasmique qui est biologiquement inactive. L'échange de son GDP en GTP permet à Ras de se transformer en sa forme active et ainsi permet à c-Raf de se lier et de se translocaliser vers la membrane plasmique. Cette translocation de c-Raf à la membrane plasmique permet d'augmenter son activité kinase protéique. C-Raf va alors activer MEK1 et MEK2 qui vont par la suite phosphoryler ERK 1/2 (Figure 5) (59-62).

Figure 5 : La voie intracellulaire d'ERK 1/2



L'Activation de la voie de JNK et de p38 commence par différentes MAPK kinase dont deux protéines G provenant de la sous-famille de Rho (Rac et Cdc42). Les MAPK Kinase pour ses cascades sont MKK4/MKK7 pour JNK et MKK3/MKK6 pour p38. JNK va alors phosphoryler c-Jun tandis que p38 va aller phosphoryler et activer la protéine active MAPK- «activated protein kinase-2» qui va par la suite phosphoryler la petite protéine à choc thermique Hsp25/27 (Figure 6 et 7) (63, 64).

Figure 6 : La voie intracellulaire de JNK

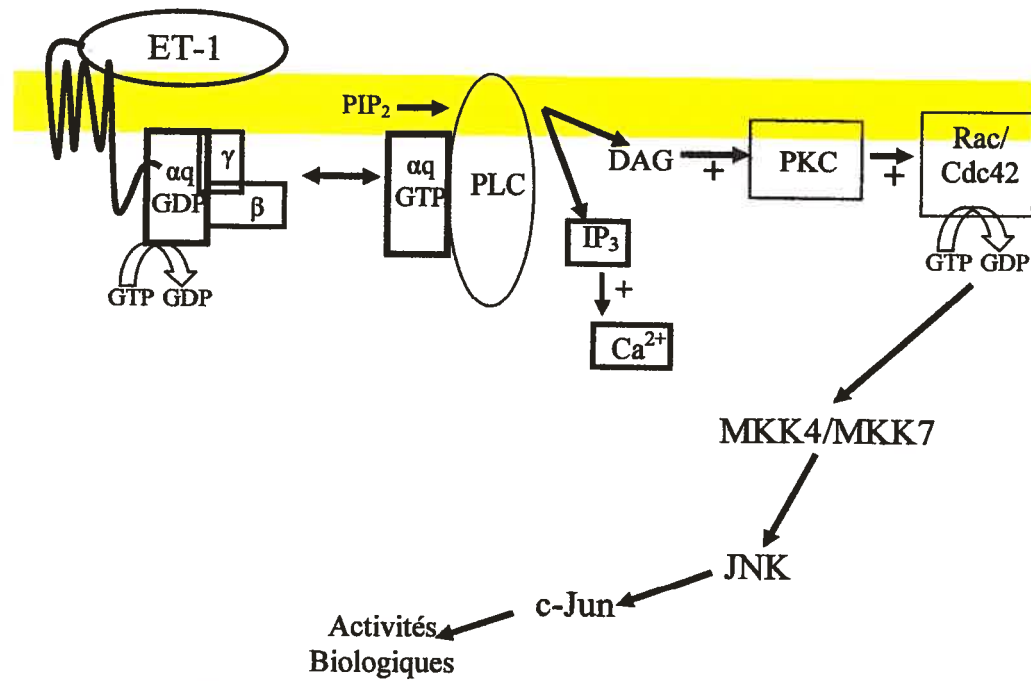
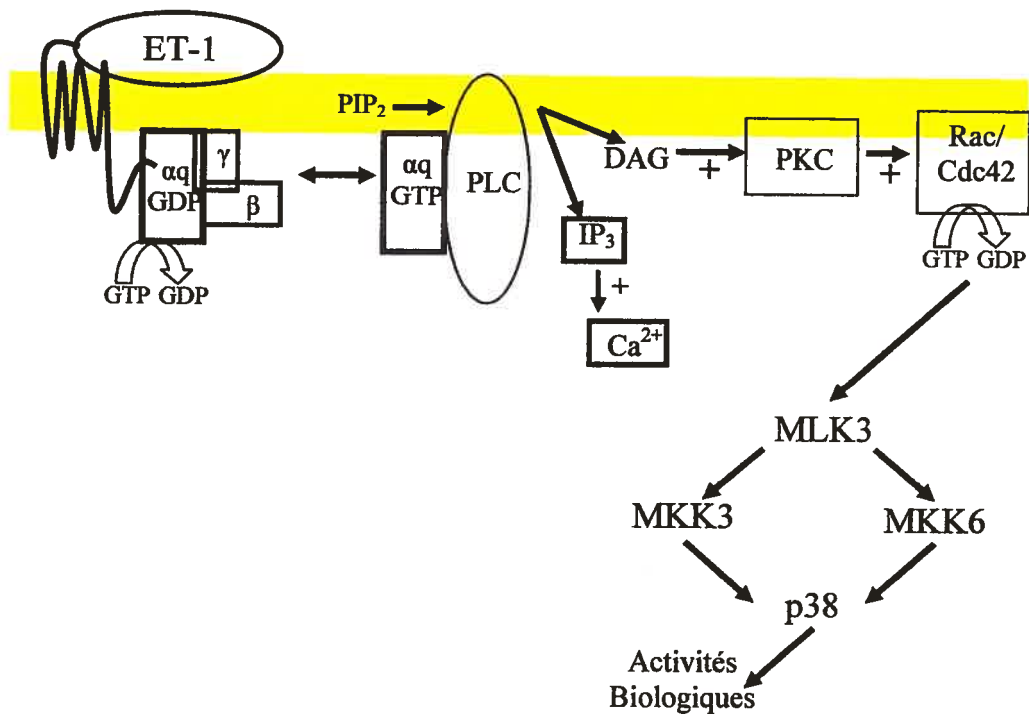


Figure 7 : La voie intracellulaire de p38

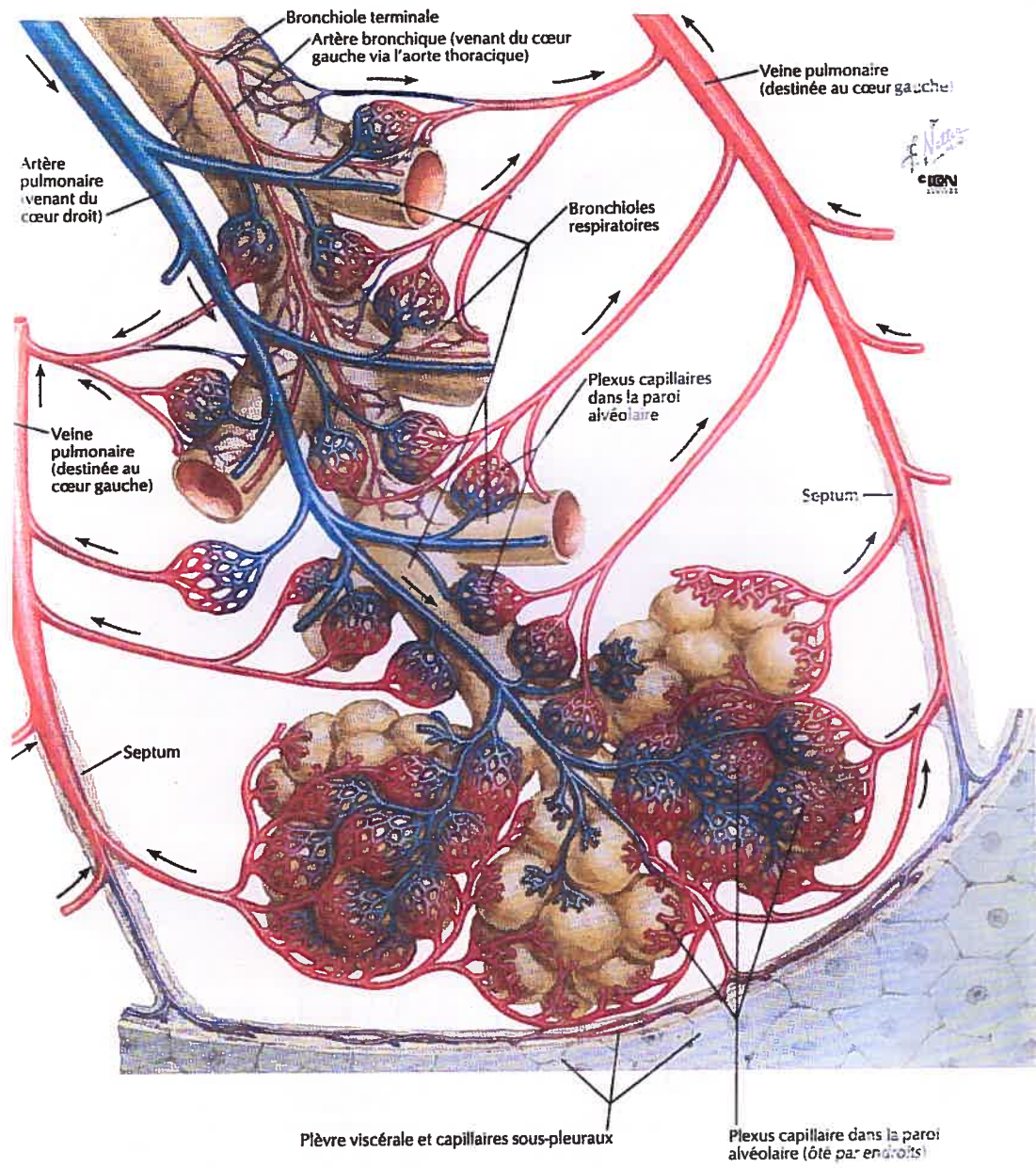


L'activation de la voie intracellulaire de PI3K par l'ET-1 peut promouvoir la survie cellulaire en inhibant l'apoptose. Elle est donc devenue une voie intracellulaire très intéressante et de plus en plus étudiée. La PI3K peut être activée par soit Gαq ou RAS. L'évènement initiateur de cette cascade est la phosphorylation de PtdInsP₂ en PtdInsP₃ par la PI3K. Comme le DAG, PtdInsP₃ reste au niveau membranaire où il active une protéine kinase PtdInsP₃-dépendante qui par la suite phosphoryle et active AKT. AKT est impliqué dans la stimulation du cycle cellulaire par une augmentation de cycline D et p21 et dans l'inhibition de l'apoptose par Bcl2 un membre de la famille de BAD (65, 66).

1.2 Circulation Pulmonaire

La circulation pulmonaire amène le sang veineux, pauvre en oxygène, au contact des alvéoles pulmonaires afin de le réoxygéner totalement et éliminer le gaz carbonique en excès. Elle s'effectue à partir du tronc pulmonaire qui naît du ventricule droit et se subdivise en artères pulmonaires droite et gauche et en un grand nombre de branches, se ramifiant elles-mêmes en une multitude de capillaires qui entourent les alvéoles. C'est là que l'échange d'oxygène et de gaz carbonique s'effectue entre le sang et l'aire alvéolaire. Après s'être réoxygéné, le sang regagne le cœur par des veinules, des veines, puis en quatre grosses veines pulmonaires qui se jettent dans l'oreillette gauche (Figure 8) (67).

Figure 8 : La circulation sanguine intra-pulmonaire (68)



La circulation pulmonaire est un système à basse pression et à haute compliance. Dans la circulation pulmonaire, le débit sanguin présente plus d'une particularité. Les artères et les artérioles pulmonaires ont une structure semblable à celle des veines et des veinules, c'est à dire qu'elles ont des parois minces et un

diamètre élevés. Comme elles opposent peu de résistance à l'écoulement, il faut moins de pression pour propulser le sang dans le système artériel pulmonaire. Par conséquent, la pression artérielle est beaucoup plus basse dans la circulation pulmonaire que dans la circulation systémique. En effet, la pression maximale dans l'artère pulmonaire ne dépasse pas normalement 25 millimètres de mercure (mm de Hg) comparativement à celle systémique qui est d'environ 120 mm de Hg.(56, 67)

De plus, le mécanisme autorégulateur est inversé dans la circulation pulmonaire, c'est-à-dire qu'une faible concentration d'oxygène cause la vasoconstriction des artérioles tandis qu'une forte concentration provoque une vasodilatation. Ce phénomène est parfaitement conforme à la fonction d'échange gazeux. Quand les sacs alvéolaires sont remplis d'air riche en oxygène, les capillaires pulmonaires se gorgent de sang et sont prêts à recevoir l'oxygène. Si les sacs alvéolaires sont affaissés ou obstrués par du mucus, la concentration d'oxygène baisse dans la région et le sang la contourne. La surface total d'échange gazeux entre les alvéoles et les capillaires est d'environ 50 à 70 m². Une couche très mince d'endothélium vasculaire et d'épithélium alvéolaire sépare le sang et les gaz alvéolaires : la barrière alvéolo-capillaire. La perméabilité de cette barrière dépend entre autre de la pression intra-vasculaire et de la pression intra-alvéolaire. Normalement, le système circulatoire permet l'échange d'eau et de nutriments à travers la parois des vaisseaux, grâce à un équilibre subtil entre les forces de la pression hydrostatique (tendant à faire sortir les liquides hors du vaisseau) et celles de la pression oncotique (liée aux protéines tendant à retenir les liquides à l'intérieur du vaisseau) : Loi de Starling. La loi de starling peut être expliqué par l'équation suivante

$$Q_f = K[(P_c + \pi_i) - (P_i + \pi_p)]$$

Q_f = mouvement des liquides à travers les capillaires
 K = Constante de filtration de la membrane capillaire
 P_c = Pression hydrostatique des capillaires
 π_i = Pression oncotique interstitiel
 P_i = Pression hydrostatique interstitiel
 π_p = Pression oncotique plasmatique

Lors de conditions pathologiques, comme par exemple lors d'insuffisance ventriculaire gauche, la pression hydrostatique des capillaires pulmonaires peut excéder la pression oncotique plasmatique. Afin de maintenir l'oxygénation normale du sang, un remodelage des parois alvéolaires peut être déclenché. Ce remodelage est caractérisé par un important épaissement des parois alvéolaires permettant de réduire le coefficient de perméabilité (K) et ainsi prévenir la sortie du plasma vers les alvéoles. Lorsque ce remodelage pulmonaire ne pourra plus compensé pour l'augmentation de la pression hydrostatique des capillaires, un oedème pulmonaire se crée, compromettant ainsi les échanges gazeux pulmonaires.(56, 67)

L'œdème pulmonaire est le plus souvent d'origine hémodynamique, lié à une augmentation des pressions hydrostatique capillaires pulmonaires et constitue un trouble respiratoire parfois grave représentant un motif fréquent d'hospitalisation chez les sujets atteints. Ceci peut être due à une cardiopathie, à une poussée d'hypertension artérielle systémique, ou encore à une surcharge volémique plasmatique. Plus rarement, l'œdème pulmonaire peut être due à une altération de la perméabilité des capillaires pulmonaires en relation avec des agents infectieux (virus de la grippe, certaines bactéries), toxiques ou par prématurité de développement pulmonaire. Cet oedème pulmonaire à haute perméabilité constitue le symptôme de détresse respiratoire adulte ou du nouveau né (67, 69).

1.3 L'ET-1 et pathologies cardiovasculaires

Lors de plusieurs pathologies cardiovasculaires il a été démontré que les niveaux circulants d'ET-1 sont augmentés, incluant l'insuffisance cardiaque, l'hypertension artérielle systémique et l'hypertension pulmonaire de toute étiologie. Un niveau élevé d'ET-1 peut contribuer à la formation excessive de fibrose, à une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la pression artérielle ainsi qu'à la prolifération et l'hypertrophie cellulaire. De plus, l'ET-1 jouerait aussi un rôle dans la fibrose pulmonaire idiopathique, l'asthme et la sclérodermie (70, 71). Différents modèles animaux, ont démontré l'efficacité d'un traitement avec différents antagonistes des récepteurs à l'ET-1 suggérant ainsi l'implication de l'ET-1 dans le développement et le maintien de ces pathologies.

1.3.1 Insuffisance Cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome chronique résultant de complications diverses. Elle peut toucher le ventricule droit, le gauche ou être bi-ventriculaire. L'IC peut entre autres être consécutive à une hypertension artérielle, à une valvulopathie, à une cardiopathie congénitale ou à une cardiopathie ischémique. Initialement, le cœur s'adapte morphologiquement par une dilatation du ventricule gauche excentrique par la sarcomogénèse en série. Cependant, lorsque ces mécanismes compensatoires sont dépassés, l'insuffisance cardiaque s'installe. L'IC gauche résulte fréquemment en une congestion sanguine pulmonaires pouvant induire un important remodelage pulmonaire pouvant conduisant ainsi à l'hypertension pulmonaire veineuse. L'IC gauche peut par la suite se compliquer à une insuffisance ventriculaire droite et ainsi créer une insuffisance cardiaque globale.

L'IC est aussi accompagnée d'une augmentation généralisée de la résistance vasculaire systémique résultant à l'activation de mécanismes neuro-hormonaux divers. Des études expérimentales ont démontré que différents facteurs comme les substances endogènes, l'angiotensine ou la norépinephrine peuvent stimuler le processus biologique associé au remodelage cardiaque. Ces neurohormones participent donc au remodelage cardiaque, à l'hypertrophie cellulaire, l'apoptose et l'altération de la matrice extracellulaire. De plus, leur rôle dans la progression de l'IC a été cliniquement démontré par l'efficacité d'agents pharmaceutiques tels que les vasodilatateurs, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antagonistes β -adrénergique et les antagonistes de l'aldostérone (72).

En général, deux évidences permettent de supporter le rôle pathophysiologique de l'activation de l'endothéline lors d'IC. Premièrement, de multiples études ont démontré une augmentation de l'expression des niveaux de l'ET-1 tissulaire et plasmatique tant dans les modèles animaux que chez des patients souffrant d'IC. Deuxièmement, plusieurs études pré-cliniques ont démontré le rôle bénéfique de l'administration de différents antagonistes des récepteurs à l'ET-1.

L'augmentation des niveaux circulants d'ET-1 a été rapportée pour la première fois dans le modèle canin d'IC par sur-stimulation électrique (73). Dans ce modèle d'IC induite par infarctus du myocarde chez le rat, l'expression de l'ARNm de préproET-1 est significativement augmentée tant dans le cœur que dans les poumons (74-77). Dans le poumon, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de préproET-1 a été observé au niveau de cellules inflammatoires et épithéliales des voies respiratoires (77). Des altérations dans l'expression des rET-1 ont aussi été rapportées. Dans les poumons de rats souffrant d'IC, une diminution de l'ARNm d'ET_B mais pas d'ET_A a été noté, suggérant ainsi que la réduction de la clairance de

l'ET-1 pourrait en partie contribuer à cette augmentation plasmatique de l'ET-1 lors d'IC.(78, 79)

Comme dans les études pré-cliniques, plusieurs investigateurs ont rapporté une augmentation du niveau plasmatique de l'ET-1 chez des patients souffrant d'IC (80-82). De plus, l'augmentation des niveaux circulants d'ET-1 corrèle avec la détérioration de la classe fonctionnelle de l'association du coeur de New York et l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire (83-85). L'activation du système de l'ET-1 lors d'IC contribue aussi à la constriction rénale et la rétention de sodium par les reins. Il y a maintenant plusieurs études supportant l'effet bénéfique sur les reins lors d'un traitement avec soit un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A ou soit avec un antagoniste pour l'ECE (86).

Les antagonistes de l'ET-1 ont été démontrés efficaces dans divers modèles animaux souffrant d'IC. Le groupe de Mulder a démontré que chez des rats souffrants d'IC, un traitement à long terme avec le bosentan, antagoniste non-sélectif des récepteurs à l'ET-1, réduisait la pression artérielle et le rythme cardiaque tout au long du traitement qui dura 9 mois. En plus, après 2 ou 9 mois de traitement, le bosentan avait réduit la pression télé-diastolique ventriculaire gauche, avait augmenté la contractilité ainsi que réduit l'hypertrophie et la fibrose de la section non infarctée du ventricule gauche et diminué la dilatation ventriculaire. Cette étude démontre donc qu'un traitement à long terme avec un antagoniste à l'ET-1 augmente considérablement la survie dans ce modèle de rat IC (87). Le groupe de recherche de Moe a étudié l'effet d'un antagoniste spécifique au récepteur ET_A, LU 135252, dans le modèle de chien avec sur-stimulation cardiaque. Ils ont rapporté que le blocage du récepteur ET_A atténuait significativement l'augmentation de la pression télé-diastolique ventriculaire gauche et la pression artérielle pulmonaire. Ce traitement a

aussi inhibé la baisse du débit cardiaque ainsi que l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire et systémique (88).

La reconnaissance de l'ET-1 comme étant une cible importante dans la pathogenèse de l'IC et les effets bénéfiques des antagonistes des rET-1 lors de modèles expérimentales a encouragé l'investigation rapide de ces agents chez des patients souffrants d'IC. Plusieurs études à court terme ont confirmé une amélioration des valeurs hémodynamiques des patients souffrant d'IC suivant l'administration d'antagonistes des rET-1 permettant ainsi l'élaboration d'essais à long terme (89-93). L'efficacité clinique de l'administration chronique d'antagonistes des rET-1 chez des patients souffrants d'IC a été investigué par quatre importantes études cliniques : REACH-1, ENCOR, ENABLE et EARTH (94-97). Cependant, les promesses suggérées par les essais pré-cliniques non pas été atteintes lors des études cliniques à long terme chez les patients souffrant d'IC. Cette disparité peut être expliquée par soit un mauvais dosage des différents antagonistes ou soit par le fait que ces études avaient ciblé une population trop large de patients souffrant d'IC. Néanmoins, il n'est toujours pas certains qu'une autre étude clinique sera réalisée dans le futur prochain chez des patients souffrant d'IC.

1.3.2 Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire (HTP) est définie comme étant une augmentation de la pression sanguine dans l'artère pulmonaire suite à différentes pathologies. La pression systolique artérielle pulmonaire est d'approximativement 25 mmHg. On définit une HTP légère lorsque la pression systolique pulmonaire se situe entre 26 et 35 mmHg, modérée lorsqu'elle se situe entre 36 et 45 mmHg et sévère lorsqu'elle se situe au dessus de 45 mmHg. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a classifié l'hypertension pulmonaire en 5 groupes selon l'étiopathologie (Tableau II).

Tableau II : Classification de l'hypertension pulmonaire par l'OMS(98)

Table 1. The Revised World Health Organization Classification of Pulmonary Hypertension.*
<p>Group I. Pulmonary arterial hypertension</p> <p>Idiopathic (primary)</p> <p>Familial</p> <p>Related conditions: collagen vascular disease, congenital systemic-to-pulmonary shunts, portal hypertension, HIV infection, drugs and toxins (e.g., anorexigens, rapeseed oil, L-tryptophan, methamphetamine, and cocaine); other conditions: thyroid disorders, glycogen storage disease, Gaucher's disease, hereditary hemorrhagic telangiectasia, hemoglobinopathies, myeloproliferative disorders, splenectomy</p> <p>Associated with significant venous or capillary involvement</p> <p>Pulmonary veno-occlusive disease</p> <p>Pulmonary-capillary hemangiomatosis</p> <p>Persistent pulmonary hypertension of the newborn</p> <p>Group II. Pulmonary venous hypertension</p> <p>Left-sided atrial or ventricular heart disease</p> <p>Left-sided valvular heart disease</p> <p>Group III. Pulmonary hypertension associated with hypoxemia</p> <p>Chronic obstructive pulmonary disease</p> <p>Interstitial lung disease</p> <p>Sleep-disordered breathing</p> <p>Alveolar hypoventilation disorders</p> <p>Chronic exposure to high altitude</p> <p>Developmental abnormalities</p> <p>Group IV. Pulmonary hypertension due to chronic thrombotic disease, embolic disease, or both</p> <p>Thromboembolic obstruction of proximal pulmonary arteries</p> <p>Thromboembolic obstruction of distal pulmonary arteries</p> <p>Pulmonary embolism (tumor, parasites, foreign material)</p> <p>Group V. Miscellaneous</p> <p>Sarcoidosis, pulmonary Langerhans'-cell histiocytosis, lymphangiomatosis, compression of pulmonary vessels (adenopathy, tumor, fibrosing mediastinitis)</p>

L'HTP veineuse, la forme d'hypertension pulmonaire la plus répandue, est consécutive à une autre anomalie d'origine cardiaque tel que l'IC. L'HTP cause plusieurs changements morphologiques tant au niveau de la circulation pulmonaire qu'au niveau des parois alvéolaires. Les principaux changements vasculaires lors d'HTP sont la vasoconstriction, la prolifération des cellules musculaires lisses et endothéliales et la thrombose (98). Des analyses de coupes de poumons par immunohistochimie et par microscopie à électron ont révélé la présence d'un important remodelage pulmonaire caractérisé par un épaississement des parois alvéolaires avec prolifération myofibroblastiques (péricytes) et déposition de collagène, élastine et de matrice extracellulaire (99, 100). Ces changements

contribueraient donc aux adaptations physiologiques du poumon permettant ainsi de prévenir la formation d'œdème pulmonaire : Loi de Starling. Cependant, l'épaississement des parois alvéolaires est aussi responsable de la réduction de la diffusion pulmonaire et des échanges gazeux au repos et lors d'exercices chez les patients souffrant d'IC (101, 102). Ces changements sont présent grâce à la perturbation de l'équilibre entre les agents vasodilatateurs, vasoconstricteurs, les inhibiteurs de croissance, les facteurs mitogéniques et les déterminants anti-thrombotique et pro-thrombotique (98).

La pathogenèse de l'HTP implique plusieurs évènements biologiques. La dysfonction endothéliale cause une augmentation de la transcription de facteurs vasoconstrictifs comme l'ET-1 et la thromboxane A2 et une diminution de l'activité de facteurs relaxants tels que le monoxyde d'azote et la prostacycline. Ce déséquilibre favorise donc la vasoconstriction, active l'hypertrophie des cellules musculaires lisses, inhibe l'apoptose, stimule la prolifération fibroblastique et la déposition de collagène ainsi que l'activation de cytokines pro-inflammatoire et l'angiogenèse. Plusieurs facteurs de croissances sont augmentés incluant le facteur de croissance endothéliale (VEGF) et l'angiopoïétine induisant aussi la prolifération cellulaire. Une défaillance dans la fonction des canaux potassique des cellules musculaires lisses pulmonaires provoque un influx de potassium et augmente la concentration intracellulaire de calcium favorisant aussi la vasoconstriction pulmonaire. L'activation plaquettaire provoque la relâche du facteur de croissance plaquettaire (PDGF) et de sérotonine dans la circulation. L'augmentation de la disponibilité de la thromboxane A2 crée un milieu pro-coagulant dans la circulation pulmonaire. En résumé, la combinaison de la vasoconstriction, la prolifération

cellulaire, la fibrose, l'angiogenèse et la thrombose contribuent à la progression du remodelage vasculaire pulmonaire et interstitiel (103).

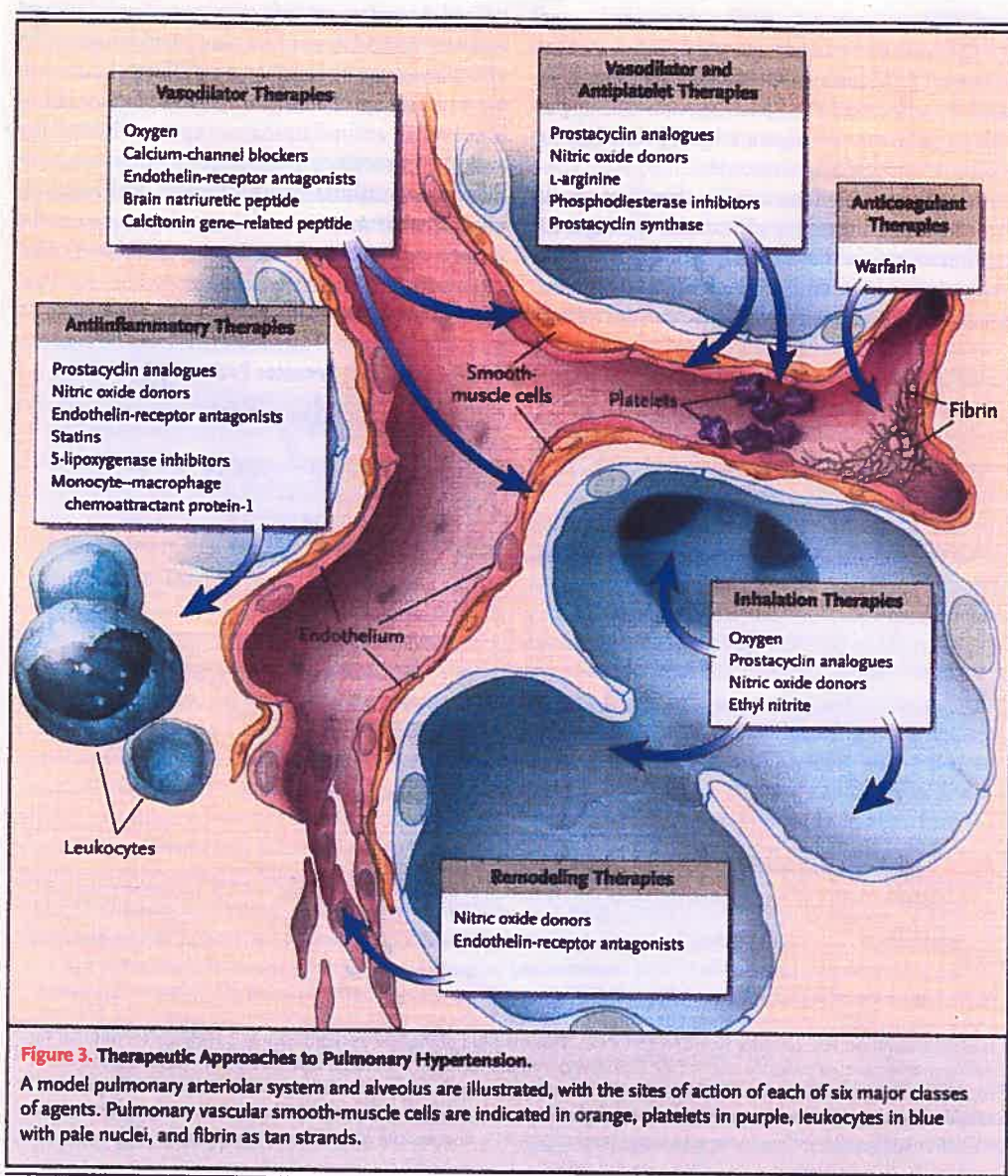
Plusieurs évidences substantielles provenant de différents laboratoires signalent l'importance du rôle de l'ET-1 dans l'HTP. Les niveaux plasmatiques de l'ET-1 sont augmentés dans l'HTP et les niveaux d'ET-1 sont inversement proportionnels au débit cardiaque (104, 105). En plus de son rôle dans la prolifération des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires, l'ET-1 peut aussi induire la chimiotactisme et la prolifération des myofibroblastes pulmonaires (10, 11, 106-108). De plus, dans des modèles d'animaux d'HTP, il y a évidence d'une augmentation de l'ARNm pour prepro-ET-1 et ET-1 dans le poumon et de ET_A et ET_B dans les artères pulmonaires et les homogénats de poumon (109-112). De plus, des preuves indirectes du rôle de l'ET-1 dans le remodelage vasculaire pulmonaire ont été démontré par des expériences avec des antagonistes pour les récepteurs de l'ET-1 et par des inhibiteurs de l'ECE chez des animaux souffrant d'HTP.

1.3.3 Traitements actuel de l'HTP

Il n'y a présentement aucune cure pour l'hypertension pulmonaire. Par contre, les traitements se sont grandement améliorés depuis la dernière décennie. Les approches présentement utilisées cibles les différentes conséquences de l'HTP : l'utilisation de vasodilatateurs, d'anticoagulants, d'agents anti-plaquettaires, de thérapies anti-inflammatoire et de thérapies pour le remodelage vasculaire. La plus part des agents les plus efficaces ont des effets multiples. Par exemple, le bosentan, un antagoniste des récepteurs de l'ET-1, est un agent vasodilatateur, anti-inflammatoire ainsi qu'anti-mitogéniques. Les différentes approches thérapeutiques utilisées pour le traitement de l'hypertension pulmonaire sont résumées dans la figure

9. De nouveaux agents feront d'ailleurs bientôt leur entrées en Amérique du Nord tel que le Sitaxsentan, antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A.

Figure 9 : Les différentes approches thérapeutiques pour le traitement de l'HTP (98)



1.3.4 Antagonistes sélectifs ou non sélectifs pour les récepteurs de l'ET-1 lors d'HTP artérielle

Le débat sur l'utilisation d'un antagoniste spécifique ou non spécifique des rET-1 pour le traitement de l'HTP artérielle est toujours en cours. Étant donné que les effets néfastes de la stimulation du récepteur ET_A lors d'HTP est sans équivoque acceptée, le débat est donc centré sur le rôle du récepteur ET_B chez les patients souffrant d'HTP artérielle. Les questions suivantes demeurent donc importantes à élucider. Premièrement, est-ce que le récepteur ET_B continue à exercer ces effets vasodilatateurs, vasoprotecteurs et de clairance lors d'HTP ? Deuxièmement, est-ce que les effets vasoconstricteurs et proliférateurs peuvent être attribués à une altération ou une modification du récepteur ET_B au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire lors d'HTP ? Quel est l'effet net d'une activation du récepteur ET_B chez les patients d'HTP artérielle, étant donné qu'ET_B ne possède pas seulement des effets vasodilatateurs mais également vasoconstricteurs et proliférateurs ? De plus, de récentes études ont démontré la présence d'hétérodimérisation entre le récepteur ET_A et ET_B et l'existence d'un «cross talk» entre les deux récepteurs tant au niveau in vivo qu'in vitro (50, 113-115). Néanmoins, il y a plusieurs études expérimentales et cliniques démontrant l'effet bénéfique de ses deux classes de médicaments (116-121). Afin d'obtenir une analyse plus définitive du traitement à préconiser, nous devons attendre la publication d'essais comparatif chez des patients souffrant d'HTP artérielle.

1.4 Myofibroblastes

Les myofibroblastes (MYF) ou péricytes, sont des cellules ubiquitaires possédant de long prolongement en forme d'étoile. Ils ont été décrits pour la première fois dans du tissu granuleux lors du processus de cicatrisation comme étant

des cellules possédant à la fois les caractéristiques des fibroblastes et des cellules musculaires lisses (122). Les marquages pour la vimentine, desmine et l'actine du muscle lisse sont les plus souvent utilisés pour l'identification des MYFs in vitro. Afin de différencier les cellules endothéliales des MYFs, le marquage pour le facteur VIII est préconisé. Dans le poumon normal, les myofibroblastes se retrouvent en nombre restreint dans les septa alvéolaires au niveau de la partie dense de la barrière air-sang. Contrairement aux autres cellules péri-vasculaires, les MYF se retrouvent au niveau de la lame basale du micro-vaisseau en contact directe avec la lame basale des cellules endothéliales (123). Des études de microscopie à balayage d'électron sur des micro-vaisseaux ont révélées la relation morphologique entre les MYF et les cellules endothéliales (CE). Le contact entre les CEs et les MYFs est fondé par un processus d'interdigitation du cytoplasme entre le MYF et la cellule endothéliale. Ce processus est connu sous le nom de jonction «peg and socket». Les MYF et les cellules endothéliales sont donc capables de transférer des nucléotides ou des informations entre eux permettant ainsi de coordonner ensemble des activités physiologiques. Les MYF possèdent plusieurs rôles physiologiques tels que (Tableau III) (124).

- la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules endothéliales
- la synthèse et la sécrétion d'une grande variété de facteurs de croissance, cytokines et de composantes de la matrice extracellulaire (Tableau IV)
- la régulation de la circulation sanguine dans les capillaires
- la phagocytose
- la régulation de la croissance des capillaires
- implication dans le processus de guérison

Tableau III : Fonctions des myofibroblastes (125)

Tissu ou Organe	Fonction
Peau	
Tissu granuleux	Croissance et différenciation des cellules épithéliales; cicatrisation
Péricyte	Angiogenèse; régulation du débit circulatoire local
Yeux	
Myofibroblastes rétinales	Angiogenèse et cicatrisation, formation de la matrice
Coeur et péricarde	Structure de la valve cardiaque; cicatrisation après infarctus du myocarde
Reins	
Cellules mésangiales	Croissance et différenciation glomérulaire, régulation du débit circulatoire des glomérules
Cellules interstitielles	Croissance et différenciation des tubules
Poumon	
Cellules interstitielles contractiles	Formation des alvéoles

Tableau IV : Résumé des facteurs de croissances, cytokines et médiateurs de l'inflammation sécrétés par les myofibroblastes (125)

Cytokines	Facteurs de croissances	Chémokines	Médiateurs inflammatoires
Il-1	TGF- β	IL-8	Phospholipase A ₂ activating protein
Il-6	CSF-1	MCP-1	PGE ₂
TNF- α	GM-CSF	GRO-1 α	Prostacyclin
IL-10	PDGF-AA	MIP-1 α	HETEs
	PDGF-BB	MIP-2	PAF
	bFGF	RANTES	NO
	IGF-I	ENA-78	CO
	IGF-II		H ₂ O ₂ , O ⁻
	NGF		
	KGF		
	HGF		
	SCF		

En plus de sécréter plusieurs substances et médiateurs, les MYFs expriment aussi de multiples récepteurs leur concédant ainsi une multitude de fonctions leur permettant de se proliférer (Tableau V).

Tableau V : Récepteurs exprimés par les myofibroblastes (125)

Cytokines	Facteurs de croissances	Médiateurs inflammatoires	Neurotransmetteurs et médiateurs paracrines	Protéines d'adhésion
IL-1	TGF- α /EGFR	Prostaglandine	Acétylcholine	ICAM-1
IL-1Ra	TGF- β R1 ET RII	HETEs	Histamine	VCAM-1
TNF- α	PDGF- α		Sérotonine	NCAM
IL-6R	PDGF- β		Bradykinine	MCP-1
IL-8R	c-kit		Endotheline	$\alpha_1\beta_1$ integrin
IL-4R	aFGF et bFGFR		Facteur natriurétique de l'oreillette	CD18
IL-11R	IGF-1R		Aldostérone ou Ang II	
	Récepteur de la thrombine FGFR-II			

Les myofibroblastes détiennent aussi un rôle dans la perméabilité vasculaire. Plus la perméabilité vasculaire est étanche, plus le nombre de myofibroblastes est élevé. Ainsi, les MYFs se retrouvent en ordre décroissant au niveau : de la rétine > poumon > muscle squelettique > muscle cardiaque > glande surrénale et ainsi de suite (126).

De plus, les myofibroblastes sont impliqués dans plusieurs pathologies et jouent souvent un rôle central dans les microvasculopathies. Lors d'hypertension pulmonaire, sclérodémie ou fibrose pulmonaire idiopathique, il a été démontré que les MYFs pulmonaires s'hypertrophient et prolifèrent formant ainsi une nouvelle couche à l'extérieur de la lame basale endothéliale (127-129). Cette hypertrophie et prolifération des myofibroblastes amènent l'épaississement des septa alvéolaires et ainsi induit le syndrome pulmonaire restrictif. Les rôles définitifs des MYFs lors de pathologies ne sont pas complètement établis, mais plusieurs recherches sont en

cours permettant sûrement d'élucider et de mieux comprendre les fonctions que les MYFs jouent lors de ces pathologies.

1.5 Justification de l'étude

L'IC secondaire à un infarctus du myocarde est associée à une augmentation chronique de la pression de remplissage ventriculaire gauche conduisant à l'HTP. L'HTP est associée à une diminution de la compliance et de la capacité de diffusion pulmonaire et provoque un important remodelage pulmonaire caractérisé par un épaississement des septa alvéolaires et d'une prolifération myofibroblastiques. De plus, le système de l'ET-1 est activé lors d'IC et pourrait donc contribuer à ce remodelage pulmonaire par son action mitogénique sur les myofibroblastes pulmonaires. Nous avons donc décidé d'élucider les rôles respectifs des récepteurs ET_A et ET_B sur la prolifération des myofibroblastes pulmonaires chez le rat normal et l'impact de l'activation du système de l'ET-1 sur les myofibroblastes pulmonaires chez le rat souffrant d'IC.

Dans un premier projet, nous avons exploré le rôle des récepteurs de l'ET-1 sur la prolifération myofibroblastique pulmonaires par l'entremise d'antagonistes spécifiques de ses récepteurs. Dans cette étude nous avons de plus évalué l'implication de deux cascades intracellulaires (PI3K et p38) sur la prolifération de ces MYFs (Article 1).

Dans un deuxième projet, nous avons étudié le système de l'ET-1 de myofibroblastes pulmonaires de rats souffrant d'IC. Nous avons évalué l'effet mitogénique de l'ET-1, l'expression de ses récepteurs et la synthèse d'ET-1 produite par les MYFs de rats IC (Article 2).

Nos recherches nous ont donc permis d'évaluer l'implication des récepteurs de l'ET-1 sur la prolifération myofibroblastiques et de mieux comprendre le rôle du système de l'ET-1 sur les MYFs pulmonaires lors d'IC.

2 Matériels et Méthodes

Toutes procédures expérimentales requérant l'utilisation d'animaux furent réalisées de concert avec les directives et règles d'éthique stipulées par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA), en plus d'avoir reçu l'approbation institutionnelle du Comité de Déontologie Animale (CDA) du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Les animaux furent manipulés une semaine suivant leurs arrivées à l'animalerie du centre de recherche afin qu'ils s'acclimatent à leur nouvel environnement.

2.1 Ligature de l'artère coronaire interventriculaire antérieure (LAD)

La ligature de l'artère coronaire interventriculaire antérieure fut effectuée sur des rats mâles Wistar (Charles River; St-Constant, Québec) pesant entre 200 à 250g. Le rat fut premièrement anesthésié à l'halothane 3% dilué dans de l'oxygène pur. Il fut par la suite intubé et maintenu ventilé à un rythme de 70 cycles par minute (Harvard Apparatus South Natick, MA) avec un volume tidal de 2 ml et une pression d'expiration de 2 cm d'H₂O. Après avoir rasé le thorax du rat, une incision de 1 cm à la base du sternum du côté gauche fut exécutée. La peau ainsi que les plans musculaires furent écartés et une incision de 5mm perpendiculaire au sternum au niveau du quatrième espace intercostal fut effectuée. Les côtes furent bien séparées à l'aide des écarteurs et le rat fut tourné sur le côté droit afin de mieux percevoir le ventricule gauche. La LAD se situe en dessous de l'oreillette et suit la veine qui a un aspect rouge vin. Le cœur fut pincé légèrement afin de le soulever et à l'aide d'une soie de 4.0 montée sur une aiguille atraumatique, la LAD fut ligaturée. À l'aide d'une soie 2.0 montée sur une aiguille tranchante externe, les côtes furent refermées

à l'aide de deux ligatures parallèles au sternum. Les muscles furent replacés et l'ouverture fut brochée. Au réveil, une injection sous-cutanée 0.01 à 0.02 cc de Bupranex fut réalisée. Le groupe Sham fut soumis aux mêmes manipulations à l'exception de la ligature de l'artère interventriculaire antérieure.

Lors du sacrifice, 3 semaines suivant la chirurgie, les rats furent anesthésiés avec un mélange de kétamine (Ketalean, 50 mg/kg; Bimeda-MTC, Cambridge, Ontario) et de xylazine (Rompun, 10 mg/kg; Bayer, Toronto, Ontario). Après la vérification de l'anesthésie par le réflexe lingual, 2000 U d'héparine (Hepalean; Organon Teknika, Toronto, Ontario) fut administré par une injection intrapéritonéale. La veine jugulaire droite fut isolée, incisée et canulée avec un cathéter Millar (2F courbé, 140 cm, Inter V medicals, Montréal, Canada) et la tension veineuse centrale (TVC) ainsi que la pression ventriculaire droite furent mesurées. Par la suite, l'artère carotidienne gauche fut isolée, incisée et canulée avec un cathéter Millar (2F courbé, 140 cm, Inter V medicals, Montréal, Canada) afin de mesurer la pression artérielle systémique et la pression ventriculaire gauche. Les mesures furent enregistrées par un polygraphe Gould TA11 (Gould Electronics, Valley View, Ohio).

2.2 Isolation des myofibroblastes pulmonaires

Par la suite, la trachée fut isolée et une thoracotomie médiane fut réalisée afin d'extraire les poumons. Le lobe inférieur droit fut gardé afin de mesurer le poids sec et humide des poumons. Les extrémités des autres lobes furent isolées et rincées deux fois dans un tampon phosphate pH 7.4 (PBS 1X) composé de 137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄. Sous une hotte biologique, les sections de poumons furent rincées dans du Hank's Balanced Salt Solution stérile (HBSS, Gibco, Grand Island, New York), découpées en petits morceaux d'environ 3

à 5 mm ainsi que rincées une deuxième fois dans du HBSS. Les morceaux de poumons furent digérés toute une nuit à 4°C sous agitation (Thermolyne, Maxi-Mix III Type 65800, St-Brooklyn, New York) dans une solution de Trypsin 1mg/ml (Gibco, Grand Island, New York) dilué dans du HBSS. Les poumons furent par la suite digérés, sous agitation, dans une solution à 37°C de collagénase II 1mg/ml (Gibco, Grand Island, New York) dilué dans du HBSS. Lorsque la solution fut trouble, elle fut transférée dans un tube conique stérile et centrifugée à 3000 g pendant 3 minutes à 4°C (Beckman GPR centrifuge, Ville Saint-Laurent, Québec). Le surnageant fut jeté et le culot fut rincé avec du HBSS et centrifugé à 3000 g pendant 3 minutes à 4°C. Le surnageant fut encore jeté et le culot fut dissout dans 120ml de Dulbecco's Modified Eagle's Medium stérile (DMEM) (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri) contenant 7,4% de Fœtal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Grand Island, New York), 2% de Pennicilline-Streptomycine (Gibco, Grand Island, New York) et 1% de Fungizone (Cambrex, Walkersville, Maryland), ceci étant le milieu de culture utilisé tout au long des expériences. Les cellules furent mises en culture dans un incubateur (Sanyo Scientific, Concord, Ontario) maintenue à 37°C et contenant 5% de CO₂. Les milieux (DMEM) furent changés tous les 2 jours jusqu'à confluence et les myofibroblastes furent par la suite passagés à l'aide d'une solution de Trypsin-EDTA 1X (Gibco, Grand Island, New York) et transférés dans des plaques de 24 et de 12 puits ainsi que dans des pétris de 100X20 mm (Sarstedt, St-Leonard, Québec).

2.3 Évaluation de la synthèse d'ADN et Protéique

Les myofibroblastes pulmonaires furent transférés à 25 000 cellules/puit dans les plaques de 24 puits. Le milieu de culture fut changé deux jours suivant leur

transfert pour du DMEM sans sérum contenant seulement 2% de Pennicilline-Streptomycine, 1% de Fungizone et 0.2% de Insulin-Transferrine-Selenium (ITS) (BD Biosciences, Bedford, MA). Après 24 heures dans l'incubateur, les myofibroblastes furent soit prétraités pendant 30 minutes avec soit

- un antagoniste spécifique au récepteur ET_A, BQ-123, 1 μ M (American Peptide, Sunnyvale, Californie)
- antagoniste spécifique pour le récepteur ET_B, BQ-788, 1 μ M (American Peptide, Sunnyvale, Californie)
- Combinaison des deux (BQ-123 et BQ-788)
- Inhibiteur spécifique pour la PI3K, LY-294002, 10 μ M
- Inhibiteur spécifique pour la p38 α et β , SB-203580 10 μ M

et par la suite stimulés avec de l'ET-1 10nM (American Peptide, Sunnyvale, Californie) ou soit simplement stimulé avec 10nM d'ET-1 pendant 24 heures. Le milieu de culture sans sérum fut utilisé comme valeur basale et du milieu de culture possédant 10 % de FBS fut utilisé comme contrôle positif. Afin de mesurer la synthèse protéique, de la L-Leucine-³H [4,5-³H] 10 μ M (MP Biomedicals, Irvine, Californie) fut ajoutée dans le milieu 24 heures avant l'arrêt de la stimulation. De la [methyl-³H] Thymidine 10 μ M (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey) fut ajoutée dans le milieu 4 heures avant l'arrêt de la stimulation afin d'évaluer la synthèse d'ADN. Après la stimulation, les puits furent lavés 2 fois avec du PBS 1X froid et les myofibroblastes furent ensuite incubés 1 heures à 4°C avec 1ml de 5% Acide Trichloroacétique (TCA) dilué dans de l'eau nano pure. Le TCA permet de bien fixer les cellules au fond du puits et provoque aussi l'éclatement des cellules, libérant ainsi la leucine-³H ou la thymidine-³H non incorporée aux protéines ou à l'ADN. Par la suite, les puits furent lavés 2 fois avec de l'H₂O et 0,5ml de NaOH

0,4N fut mis dans chaque puit. Le NaOH 0,4N permet de bien décoller les cellules et de récupérer la radioactivité introduite dans les protéines ou l'ADN. Après une incubation toute la nuit à 4°C, chaque puit fut gratté à l'aide d'une pipette et le liquide fut récupéré et transféré dans des tubes à scintillation. Suite à l'ajout de 5ml de liquide à scintillation (Universol, Irvine, CA), les échantillons furent analysés par le compteur bêta (Beckman LS 6500, Ville Saint-Laurent, Québec).

2.4 Isolation des protéines des myofibroblastes pulmonaires

Les myofibroblastes pulmonaires furent transférés à 1 000 000 cellules/puit dans des pétris de 100X20 mm. Les milieux furent changés tous les deux jours jusqu'à confluence. Deux pétris par conditions furent utilisés. Les pétris furent lavés deux fois avec 5 ml de PBS 1X froid et 500µl de tampon de lyse composé de 150mM NaCl, 10mM Tris pH 7.5, 1mM Acide ethylenedinitrilotetraacétique, EDTA, pH 7.0, 1mM Sel de tetrasodium, EGTA, pH 9.0, 50mM NaF, 1% Triton-X, 0.5% Igepal, 1mM Vanadate, 0,001mg/ml Leupeptin, 0,001mg/ml Aprotinin, 500µM phenylmethane sulfanyl, PMSF, fut ajouté. Après une incubation de 30 minutes sur la glace en présence du tampon de lyse. Chaque pétri fut gratté à l'aide d'une pipette et le liquide fut récupéré et centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant fut transféré dans un tube et les protéines furent conservées dans un congélateur à -80°C.

2.5 Immunobuvardage par western des récepteurs ET_A et ET_B

La concentration en protéine fut déterminée par la méthode de Bradford (Protein Assay Kit II; Bio Rad, Californie). Les protéines (50µg/puit) furent séparées sur un gel de SDS-Page 10% à un voltage constant de 150 volt et ensuite transférées pendant 90 minutes sur une membrane de PVDF pour ce qui est du récepteur ET_B et

sur une membrane de nitrocellulose pour le récepteur ET_A à un voltage constant de 100 volts. Les membranes furent incubées séquentiellement dans du PBS-T ou TBS-T (pH 7.3) contenant 5% de lait sec pendant deux heures, lavée 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS-T ou TBS-T et incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire contre le récepteur ET_A (abcam, Cambridge, MA ; 1/1000) ou ET_B (Alomone Laboratories; Jérusalem; Israël ; 1/200), dilué dans du TBS-T contenant 5% lait pour ET_A et dans du PBS-T contenant 5% BSA pour ET_B. Les membranes furent lavées 3 fois pour une période de 10 minutes avec du PBS-T ou TBS-T, incubées une heure à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin HRP de chèvre (1/10 000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove; Pennsylvanie) dilué dans du PBS-T ou TBS-T contenant 5% de lait sec et lavée à trois reprises pendant dix minutes avec du PBS-T ou TBS-T contenant. Les bandes furent visualisées dans les 20 minutes suivantes en utilisant le kit de détection ECL (PerkinElmer Life Sciences; Boston; Massachusetts). L'intensité des bandes fut évaluée par le programme Scion Image 1.63.

2.6 Immunofluorescence de coupe de poumon

Trois jours avant leurs sacrifices, les rats reçurent chaque jour une injection intra-péritonéale de Bromodeoxyuridine (BrdU) 50 mg/kg. Le lobe supérieur gauche fut cryocoupé en coupe de 14µm. Les coupes furent fixées dans une solution de PBS IX contenant 4% de paraformaldehyde pH 7.4 pendant 15 min. Elles furent par la suite lavées 3 fois avec du PBS, traitées pendant 60 min à 37°C avec 1N HCL et lavées 3 fois avec du tampon borate 0.1M et 3 fois avec du PBS. Les coupes furent par la suite bloquées dans une solution de PBS contenant 2% NDS 2% BSA et 0.5% Triton X-100 pendant 1h à la température de la pièce (TP). Par la suite, les lames

furent incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaire: vimentine (Chèvre 1:200) et BrdU (souris 1:200) dilués dans du PBS contenant 1% NDS, 1% BSA et 0.1% Triton X-100. Les lames furent lavées avec du PBS et incubées pendant 1h à TP dans le noir avec les anticorps secondaires appropriés: anti-chèvre faite chez l'âne conjugué à Alexa Fluor 488 nm (1:500) et anti-souris faite chez l'âne conjugué à Alexa Fluor 555 nm (1:500) (Molecular Probes, Eugene; OR) dilué dans PBS contenant 1% NDS, 1% BSA et 0.1% Triton X-100. Chaque expérience comprenait un contrôle d'anticorps secondaire afin de déterminer les liaisons non-spécifiques. Les coupes furent lavées 3 fois avec du PBS et monté sur des lamelles de verres en utilisant 75µl de milieu 0.1% DABCO/glycerol. Les coupes furent visualisées par microscopie confocal (Zeiss LSM 510, Iena, Germany).

Les Z-stacks furent déconvolués par le logiciel d'Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, SVI) version 2.6.5a. Les billes de fluorescence (170 nm de diamètre, Invitrogen) ont été utilise afin de construire une fonction de *point spread* (PSF) correspondant à chaque marqueur fluorescent. Le ratio de bruit de signal fut quantifié pour chaque marqueur et pour chaque Z stack. Les images déconvoluées furent par la suite sauvées en images en séries TIFF et une projection transparente (en utilisant toutes les coupes de l'image déconvolluées en respectant l'axe des Y) fut calculée en utilisant les instruments de projection du logiciel LSM 510 software (Zeiss).

2.7 Quantification d'ET-1 dans les milieux de culture cellulaire

La détermination de la quantité d'ET-1 libérée par les myofibroblastes pulmonaires dans les milieux de cultures fut quantifiée par la méthode d'ELISA

(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) à l'aide du kit d'Endothelin (1-21) de Biomedica (Medicorp, Montréal, Qc).

2.8 Immunofluorescence

Afin de procéder à l'immunofluorescence, les myofibroblastes furent laissés croître dans des plaques de 12 puits possédant chacune une lamelle ronde de grandeur 18 (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Lorsqu'elles furent confluentes, les myofibroblastes furent fixés avec de la paraformaldéhyde 2% pH 7.2 dilué dans du PBS 1X pendant 20 minutes. Par la suite, les lamelles furent lavés deux fois avec du PBS 1X et furent conservés dans une solution de glycérol-PBS 1X 1:1 à -20°C. Lors de l'immunofluorescence, chaque lamelle fut lavée 3 fois avec du PBS 1X, bloquée pendant 60min à température pièce avec 2% NDS et 0,2% Triton dilué dans du PBS et incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire respectif: actine du muscle lisse de souris 1/200 (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri), vimentine de chèvre 1/200 (Santa Cruz), récepteur ET_A de lapin 1/100 (Alomone Laboratories; Jérusalem; Israël) et le récepteur ET_B de lapin 1/200 (Alomone Laboratories) dilué dans du PBS contenant 1% NDS et 0.05% Triton. Les lamelles furent par la suite lavées 3 fois avec du PBS et incubées pendant 60 min à température pièce avec les anticorps secondaires respectifs: anti-Souris conjugué à Alexa Fluor 647 1/500, anti-Lapin conjugué à Alexa Fluor 555 1/500, anti-Chèvre conjugué à Alexa Fluor 488 1/500 (Molecular Probes, Eugene, OR) dilué dans du PBS contenant 1% NDS et 0.05% Triton X-100. À la suite de 3 lavages, les lames furent montées et examinées par microscopie confocale via un système d'imagerie LSM 510 (Zeiss; Iena; Allemagne). Des contrôles d'anticorps secondaires furent effectués afin de déterminer la présence de liaisons non spécifiques.

3 Articles

3.1 Article 1: Role of Endothelin Receptors on Basal and Stimulated Lung Myofibroblasts Proliferation

Annick Préfontaine, Angelino Calderone, Jocelyn Dupuis

American Journal of Cell and Molecular Biology
En soumission

Montreal Heart Institute, Department of Medicine, 5000 Belanger Street East,
Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada

ABSTRACT

Myofibroblasts (MYF) proliferation contributes to the pathophysiology of numerous lung disorders. Pulmonary endothelin-1 (ET-1) production is increased in various lung diseases and could directly contribute to deleterious lung remodelling. However, the respective roles of ET_A and ET_B receptors (ET_A-R, ET_B-R) and of endogenous ET-1 production by lung MYF on their proliferation remain uncertain. Rat lungs MYF were isolated and [³H]-thymidine and [³H]-leucine incorporation assays were completed. Immunofluorescence studies revealed abundant ET_A-R and ET_B-R expression on MYF. ET-1 (10nM) stimulated MYF proliferation and protein synthesis through PI 3Kinase and p38 pathways. Selective ET_A-R blockade (BQ-123 1μM) or selective ET_B-R blockade alone (BQ-788 1μM) did not inhibit proliferation or protein synthesis. However, their combination to achieve dual receptor blockade almost completely abolished ET-1 mitogenic effect. Surprisingly, basal MYF proliferation was increased by selective blockade of ET_A-R or of ET_B-R alone, but not by dual blockade. ET-1 levels in the culture media were not affected by the antagonists. Our findings indicate that both the ET_A-R and the ET_B-R regulate basal and stimulated lung MYF proliferation and suggest possible interactions between the receptors.

Key Words: Myofibroblasts, endothelin-1, cell culture, lung, receptors, remodelling

INTRODUCTION

Myofibroblasts (MYF) are described as stellate cells expressing morphological features from both smooth muscle cells and fibroblasts. They participate to numerous physiological events such as growth, development, and repair of normal tissue as well as to diseases affecting various organs.(125) In normal lung, MYF are scarce and rarely noted in peri-venular regions. In lung disorders associated with structural remodelling such as lung fibrotic disease and congestive heart failure, abundant MYF proliferation occurs with interstitial matrix deposition and thickening of the alveolar septa. (99, 100, 130) This proliferation contributes to functional deterioration and reduced alveolar gas diffusion capacity. (130, 131) Apart from its potent vasoconstrictor activity on smooth muscle cells, endothelin (ET-1) can stimulate MYF proliferation, chemotaxis and collagen synthesis.(10-12) In addition, the pulmonary endothelin system has also been known to be up-regulated in idiopathic pulmonary fibrosis and in congestive heart failure subjects.(127, 132-134) There is therefore growing evidence that the ET-1 system plays an important role in the pathogenesis of lung diseases by stimulating MYF proliferation and matrix deposition.

However, the role of ET-1 receptors (R), ET_A-R and ET_B-R, on basal and stimulated lung MYF proliferation remains uncertain. Studies established that the collagen production and matrix contraction by fibroblasts is dependent on the activation of both receptors.(41, 108, 128) On the other hand, other studies indicated that ET-1 induces collagen matrix contraction and lung fibroblasts proliferation through the ET_A-R solely. (10, 128, 135) To our knowledge, no studies have evaluated the role of ET-R on basal unstimulated MYF proliferation. In addition, recent data demonstrated that ET_A-R and ET_B-R could form constitutive

heterodimers and suggested the possibility of a crosstalk between them.(113, 136) Based on these contradictory results, the objective of this study was to better define the role of ET_A-R and ET_B-R on basal and stimulated proliferation of normal rat lung MYF.

MATERIALS AND METHODS

The study protocol was approved by the Animal Research and Ethics Committee of the Montreal Heart Institute and conducted according to Canadian guidelines for the care of laboratory animals.

Myofibroblasts isolation and culture.

Male Wistar rats (200-250 g) were anesthetized by a mixture of ketamine and xylazine administered intramuscularly. The subpleural (peripheral) portions of each lung lobe were dissected and washed twice with a Hank's Balanced Salt Solution, (HBSS, Gibco, Grand Island, New York). The portions were then cut in small pieces of 3 to 5 mm, washed twice with HBSS and digested overnight with 0.1% trypsin (Gibco, Grand Island, New York) with agitation. Cells were recovered by repeated digestions of the tissue in 10 ml of 0.1% collagenase in HBSS and the supernatants collected from each digestion were centrifuged at 3000g for 5 min at 4°C. The pellets were re-suspended in cold HBSS and centrifuged at 3000g for 5 min at 4°C. The cells were then re-suspended in 120 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri) containing 7.4% of Foetal Bovine Serum (Gibco, Grand Island, New York), 2% of Penicilline-Streptomycine (Gibco, Grand Island, New York) and 1% of Fungizone (Cambrex, Walkersville, Maryland). The MYF were pre-plated in T75 culture flasks and placed in an incubator (Sanyo

Scientific, Concord, Ontario) maintained at 37°C with 5% CO₂. The media was changed every 2 days until confluence and the MYF were then passaged in a Trypsin-EDTA 1X solution (Gibco, Grand Island, New York) and transferred into 24-wells plates at a density of 50cells/mm² for [³H]-leucine and [³H]-thymidine uptake, and into 12-wells plates containing a microscope cover glass for confocal microscopy.

Immunofluorescence studies.

After 48 hours (h), the cells were fixed in PBS containing 2% paraformaldehyde pH 7.4 for 20 min. They were then washed thrice with PBS and blocked in a PBS solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄ pH 7.4) containing 2% Normal Donkey Serum (NDS) and 0.2% Triton X-100 for 1h at room temperature. Afterwards the cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody: vimentin (Goat 1:200, Santa Cruz, Santa Cruz, California), smooth-muscle alpha-actin (mouse 1:200, Sigma, Saint-Louis; Missouri), ET_A-R or ET_B-R (Rabbit 1:200, Alomone Laboratories, Jérusalem; Israël) diluted in PBS containing 1% NDS and 0.05% Triton X-100. The coverslips were then washed with PBS, drained, and incubated for 1h at room temperature in the dark with the appropriate secondary antibody: anti-rabbit goat conjugated to Alexa Fluor 555 nm (1:500), anti-mouse donkey conjugated to Alexa Fluor 647 nm (1:500) and anti-Goat rabbit conjugated to Alexa Fluor 488 nm (1:500) (Molecular Probes, Eugene; Oregon) diluted in PBS containing 1% NDS and 0.05% Triton X-100. Each experiment included a control secondary antibody to determine non-specific binding. The coverslips were then washed with PBS and mounted on glass slides

using 10 μ L of 0.1% DABCO/glycerol medium. The coverslips were fixed and visualised by confocal microscopy (Zeiss LSM 510, Jena, Germany).

Z-stacks were deconvolved with the Huygens Professional software (Scientific Volume Imaging, SVI) version 2.6.5a. Fluorescent beads (170 nm in diameter, Invitrogen) were used to construct a point spread function (PSF) corresponding for each fluorescent marker. Signal-to-noise ratios were quantified for each labelling and for each Z stack. Deconvolved Z stacks were then saved in tiff images series and transparent projections (using all the slices from the deconvolved Z stacks, with respect with the Y axis) were calculated using the projection tool of the LSM 510 software (Zeiss).

[³H]-leucine and [³H]-thymidine uptake.

After 24h, the media was changed to a serum free media containing 2% Penicilline-Streptomycin, 1% Fungizone and 0.2% Insulin-Transferrine-Selenium (BD Biosciences, Bedford, MA). After 24h, the MYF were either pre-treated with a selective antagonist for the ET_A-R (BQ-123, 1 μ M) or for the ET_B-R (BQ-788, 1 μ M) (American Peptide, Sunnyvale, CA), the combination of both or with specific inhibitor for the PI3 Kinase (LY-294002 10 μ M) and of the p38 kinase pathways (SB-203580 10 μ M). After 30 min of pre-treatment, the MYF were stimulated with 10 nM of ET-1 (American Peptide, Sunnyvale, California) for 24h. The media without serum was used as a basal value and media containing 10 % FBS was used as a positive control. To study protein synthesis, 1 μ Ci/ml of [³H]-Leucine (MP Biomedicals, Irvine, California) was added immediately to the wells. As for DNA synthesis, 1 μ Ci/ml of [³H]-Thymidine (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey) was added 4h before the end of the stimulation. The cells were washed with

PBS and 1 ml/well of cold 5% Trichloroacetic acid was added for 1 h. Afterwards the wells were washed with H₂O and incubated overnight at 4°C in a solution of 0.4M NaOH (0.5 ml/wells). Following the addition of 5 ml of scintillation liquid (Universol, Irvine, CA), the samples were analysed in a scintillation counter (Beckman LS 6500).

Quantification of ET-1 in culture media

To quantify ET-1 production from the pulmonary MYF, the culture media was analysed by a sandwich ELISA kit using Endothelin (1-21) from Biomedica (Medicorp, Montréal, Qc).

Statistics

The effect of ET-R antagonists were compared to their respective controls (ET-1 stimulation or vehicle) using unpaired two-sided *t* tests. A *p* value of <0.05 was considered significant. All values are reported as mean ± SEM.

RESULTS

Expression of ET-R by lung myofibroblasts

Phenotypic confirmation of the cultured MYF is demonstrated by the immunofluorescence expression of both smooth muscle alpha-actin and vimentin (figure 1). Both the ET_A-R and the ET_B-R were abundantly expressed in lung MYF. The ET_A-R was distributed predominantly on the cytoplasmic membrane and in the cytoplasm, while the ET_B receptor was present in the nuclear, the peri-nuclear regions and in the cytoplasm (Figure 1).

Effect of ET-R antagonists on ET-1 induced proliferation of lung myofibroblasts

We observed that ET-1 stimulated lung MYF protein synthesis and proliferation as measured by the incorporation of [³H]-Leucine (19.2% ± 5.4) and [³H]-thymidine (22.0% ± 4.4) (figure 2). Selective ET_A-R blockade alone using BQ-123 and selective ET_B-R blockade alone using BQ-788 had no significant effect. However, their combination to achieve dual ET-R blockade significantly inhibited the incorporation of [³H]-leucine and [³H]-thymidine caused by ET-1 stimulation (3.4% ± 0.7 and 1.1% ± 2.9, p<0.05).

Effect of intracellular inhibitors, LY-294002 and SB-203580, on the proliferation of lung myofibroblasts induced by ET-1

To verify the role of PI 3Kinase and p38 on the proliferation of lung MYF induced by ET-1, we used selective inhibitors for these pathways. LY-294002 was used to inhibit the PI 3-Kinase and SB-203580 was used to inhibit the p38 mitogen activated protein MAP kinase. Both intracellular inhibitors completely blocked the proliferation of MYF induced by ET-1 stimulation (Figure 3).

Effect of ET-R antagonists on basal unstimulated myofibroblasts proliferation

In basal conditions, the incubation of lung MYF with the selective ET-R antagonists alone, BQ-123 or BQ-788, induced a significant increased incorporation of [³H]-leucine (10.1% ± 2.0 and 7.8% ± 2.5, p<0.05) and [³H]-thymidine (11.4% ± 3.4 and 10.2% ± 2.3, p<0.05) (figure 4). The combination of both ET-R antagonists to achieve dual ET-R blockade however resulted in no significant modification of [³H]-leucine (3.4% ± 0.7) or [³H]-thymidine (0.3% ± 1.6) incorporation compared to vehicle.

Endogenous production of ET-1 by lung myofibroblasts

There was basal production of ET-1 by lung MYF as evidenced by levels of 33.7 ± 13.2 fmol/ml in the culture media (figure 5). This level was not significantly affected by ET-R antagonists alone or in combination.

DISCUSSION

In the present study, we explored the roles of ET_A-R and ET_B-R on basal and stimulated lung MYF proliferation. Immunofluorescence studies revealed that lung MYF abundantly express both the ET_A-R and the ET_B-R. ET-1 stimulated proliferation by the activation of the PI 3Kinase and the p38 intracellular pathways. Selective ET_A-R blockade alone and selective ET_B-R blockade alone did not affect proliferation while their combination, achieving dual ET-R blockade, blocked the proliferation induced by exogenous ET-1. However in basal conditions, in the absence of exogenous stimulation, we interestingly found that the selective antagonists for the ET-R (BQ-123 and BQ-788) both independently caused an increase in MYF proliferation evidenced by a significant increase in [³H]-leucine and [³H]-thymidine incorporation. Our data has therefore revealed the following conundrum:

1. In the presence of exogenous ET-1 stimulation, selective ET_A-R blockade or selective ET_B-R blockade alone do not reduce lung MYF proliferation
2. In the basal state, in the absence of exogenous stimulation, selective ET_A-R blockade or selective ET_B-R blockade alone stimulate lung MYF proliferation

There is mounting evidence that activation of G-protein-coupled receptors (GPCRs), such as the ET-Rs, may not result in a classical linear and sequential activation of

signalling pathways. Recent studies have revealed a much greater complexity in the biology of ET-Rs that may, in part, contribute to the apparent paradox observed in this study and the apparently discordant results reported between laboratories. First, ET-Rs can form heterodimers that can functionally modify the effects of agonists and antagonists.(113, 136, 137) Second, there exists a structural diversity in ET-Rs as evidenced by numerous post-translational modifications of both the ET_A and ET_B receptors.(138) In isolated human lung fibroblasts, further structural modifications of the receptors are induced by exogenous ET-1 stimulation and it has been suggested that this could form the basis for parallel stimulation of different signaling pathways.(138) Third and finally, there is evidence that stimulation of lung fibroblasts results in activation of a wide variety of signalling pathways resulting in the increased expression of a variety of matrix-associated genes.(139, 140)

Based on these premises demonstrating the complexity of ET-Rs biology, it becomes impossible to offer a specific explanation for our findings. We may however propose the possible general hypothesis that proliferation of lung MYF through the ET-Rs is a redundant system:

1. In the stimulated state when exogenous ET-1 is added to the cells, maximal ET-1-induced proliferation can be obtained by stimulation of either the ET_A-R or the ET_B-R. Stimulation of the other “redundant” receptor does not significantly add to proliferation and its blockade therefore has no effect.
2. In the basal state, when endogenous lower ET-1 concentration is present, ET-1-induced proliferation is “recruitable” and can be increased by further stimulation of either receptor. Selective blockade of one receptor leads to

greater stimulation of the other unblocked receptor leading to greater proliferation.

3. This hypothesis is viable if both receptors mediate their proliferative effects through redundant signalling pathways or, alternatively, if the presence of ET-R heterodimers as demonstrated by previous investigators would support potential interactions (cross-talk) between the receptors and their transduction mechanisms.

It is currently unknown if the complex biology of ET-Rs may vary according to experimental conditions and pathologic states. The present results, obtained in isolated lung MYF from normal rats, are accordingly not generalizable to other cell types, other species or to pathologic conditions.

CONCLUSION

Our findings indicate that both the ET_A-R and the ET_B-R regulate basal and stimulated lung MYF proliferation and suggest possible interactions between the receptors.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

1. Powell, D. W., R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A. B. West. 1999. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1):C1-9.
2. Jasmin, J. F., A. Calderone, T. K. Leung, L. Villeneuve, and J. Dupuis. 2003. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 58(3):621-31.
3. Kingsbury, M. P., W. Huang, J. L. Donnelly, E. Jackson, E. Needham, M. A. Turner, and D. J. Sheridan. 2003. Structural remodelling of lungs in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98(5):295-303.
4. Gross, T. J., and G. W. Hunninghake. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345(7):517-25.
5. Puri, S., B. L. Baker, D. P. Dutka, C. M. Oakley, J. M. Hughes, and J. G. Cleland. 1995. Reduced alveolar-capillary membrane diffusing capacity in chronic heart failure. Its pathophysiological relevance and relationship to exercise performance. *Circulation* 91(11):2769-74.
6. Shi-Wen, X., C. P. Denton, M. R. Dashwood, A. M. Holmes, G. Bou-Gharios, J. D. Pearson, C. M. Black, and D. J. Abraham. 2001. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 116(3):417-25.
7. Gallelli, L., G. Pelaia, B. D'Agostino, G. Cuda, A. Vatrella, D. Fratto, V. Gioffre, U. Galderisi, M. De Nardo, C. Mastruzzo, E. T. Salinaro, M. Maniscalco, M. Sofia, N. Crimi, F. Rossi, M. Caputi, F. S. Costanzo, R. Maselli, S. A. Marsico, and C. Vancheri. 2005. Endothelin-1 induces proliferation of human lung fibroblasts and

- IL-11 secretion through an ET(A) receptor-dependent activation of MAP kinases. *J Cell Biochem* 96(4):858-68.
8. Peacock, A. J., K. E. Dawes, A. Shock, A. J. Gray, J. T. Reeves, and G. J. Laurent. 1992. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7(5):492-9.
 9. Uguccioni, M., L. Pulsatelli, B. Grigolo, A. Facchini, L. Fasano, C. Cinti, M. Fabbri, G. Gasbarrini, and R. Meliconi. 1995. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 48(4):330-4.
 10. Moe, G. W., J. L. Rouleau, Q. T. Nguyen, P. Cernacek, and D. J. Stewart. 2003. Role of endothelins in congestive heart failure. *Can J Physiol Pharmacol* 81(6):588-97.
 11. Ergul, A., A. L. Grubbs, Y. Zhang, C. Joffs, J. A. Sample, M. K. King, and F. G. Spinale. 2001. Expression and activity of pulmonary endothelin converting enzyme in heart failure: relation to endothelin biosynthesis and receptor distribution. *J Card Fail* 7(1):84-91.
 12. Saleh, D., K. Furukawa, M. S. Tsao, A. Maghazachi, B. Corrin, M. Yanagisawa, P. J. Barnes, and A. Giaid. 1997. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(2):187-93.
 13. Xu, S., C. P. Denton, A. Holmes, M. R. Dashwood, D. J. Abraham, and C. M. Black. 1998. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S360-3.
 14. Davie, N., S. J. Haleen, P. D. Upton, J. M. Polak, M. H. Yacoub, N. W. Morrell, and J. Wharton. 2002. ET(A) and ET(B) receptors modulate the

proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 165(3):398-405.

15. Kernochan, L. E., B. N. Tran, P. Tangkijvanich, A. C. Melton, S. P. Tam, and H. F. Yee, Jr. 2002. Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. *Gut* 50(1):65-70.

16. Shi-Wen, X., Y. Chen, C. P. Denton, M. Eastwood, E. A. Renzoni, G. Bou-Gharios, J. D. Pearson, M. Dashwood, R. M. du Bois, C. M. Black, A. Leask, and D. J. Abraham. 2004. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15(6):2707-19.

17. Gregan, B., J. Jurgensen, G. Papsdorf, J. Furkert, M. Schaefer, M. Beyermann, W. Rosenthal, and A. Oksche. 2004. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 279(26):27679-87.

18. Mickley, E. J., G. A. Gray, and D. J. Webb. 1997. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 120(7):1376-82.

19. Sauvageau, S., E. Thorin, A. Caron, and J. Dupuis. 2006. Evaluation of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction following myocardial infarction. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(6):840-6.

20. Stannard, C., P. Lehenkari, and J. Godovac-Zimmermann. 2003. Functional diversity of endothelin pathways in human lung fibroblasts may be based on structural diversity of the endothelin receptors. *Biochemistry* 42(47):13909-18.

FIGURE LEGEND

- Figure 1** Immunofluorescent study of isolated lung myofibroblasts. The cells express SMA, vimentin, ET_A receptor and ET_B receptor. Bar = 10 μm.
- Figure 2** The effect of BQ-123 and BQ-788 on protein synthesis and proliferation of lung myofibroblasts stimulated with ET-1. (*n* = 3-19). * = *P* < 0.05 versus ET-1
- Figure 3** Lung myofibroblasts proliferation with a pre-treatment with intracellular pathway inhibitor. PI 3-Kinase inhibitor, LY-294002 and p38 inhibitor, SB-203580. * = *P* < 0.05 ** = *P* < 0.01 versus ET-1 (*n* = 3-5)
- Figure 4** The effect of BQ-123 and BQ-788 on the proliferation and protein synthesis of lung myofibroblasts. * = *P* < 0.05 ** = *P* < 0.01 versus vehicle (*n* = 4-19)
- Figure 5** Quantification of ET-1 in culture media by a sandwich ELISA.

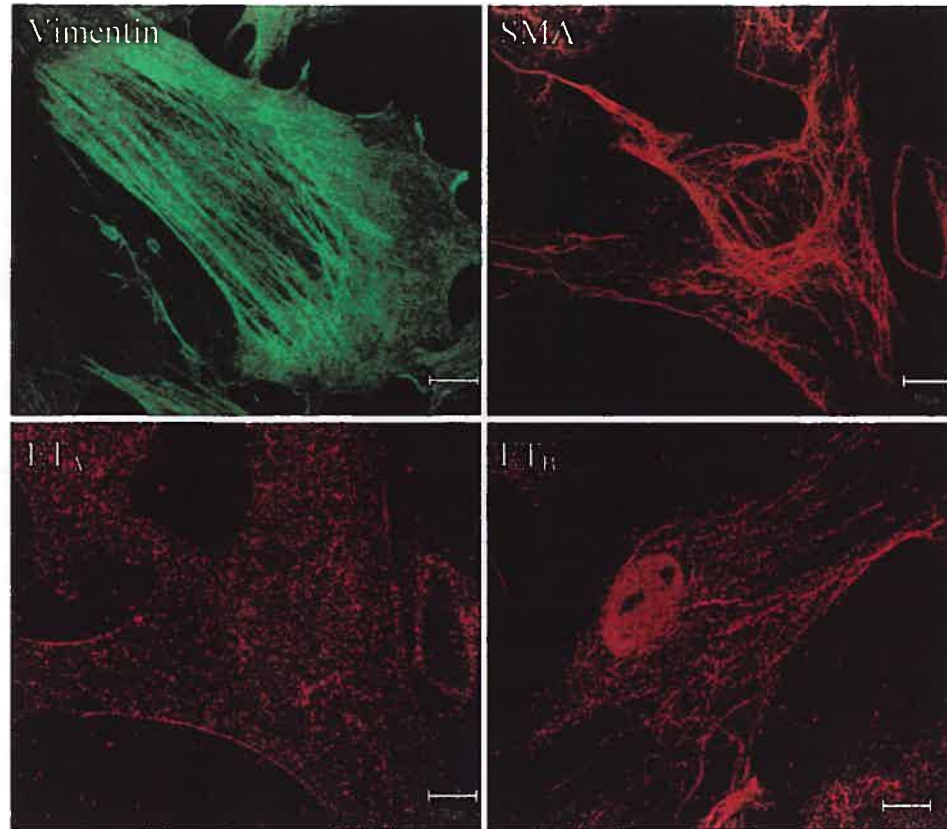
Figure 1

Figure 2

ET-1 Stimulation and ET-Rs antagonists

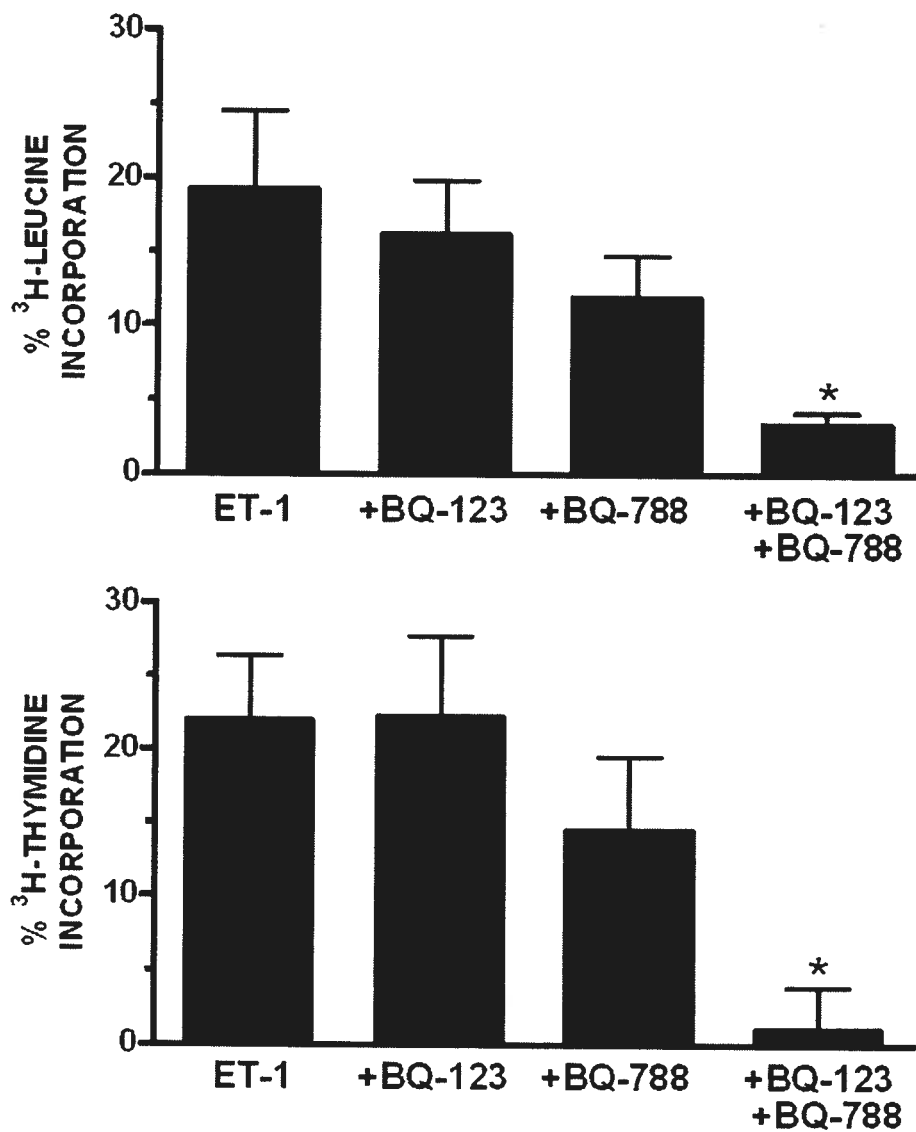


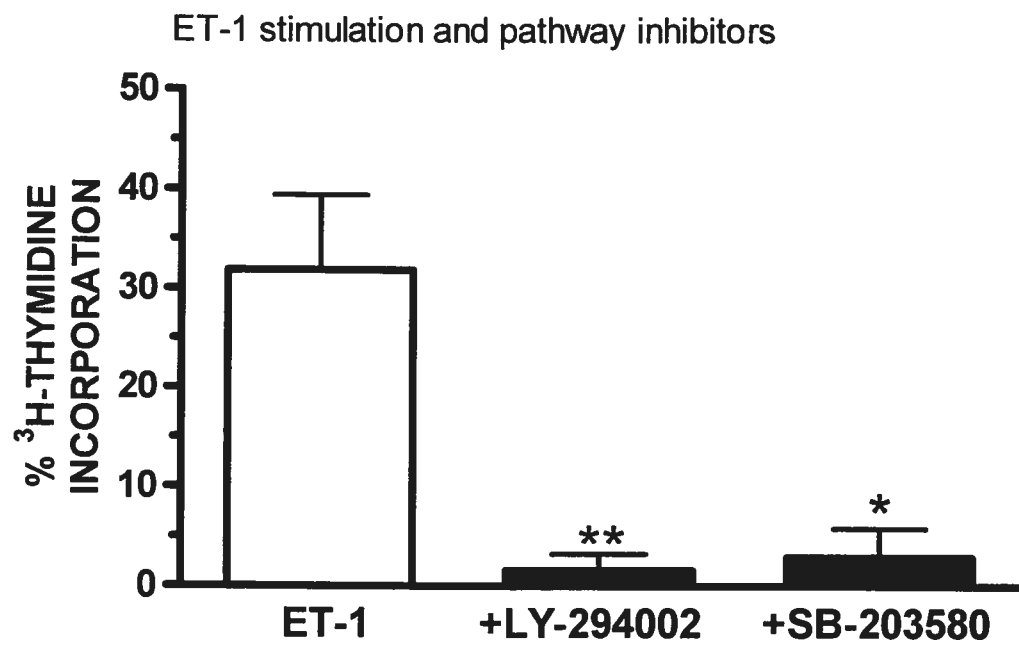
Figure 3

Figure 4

Basal proliferation and ET-Rs antagonists

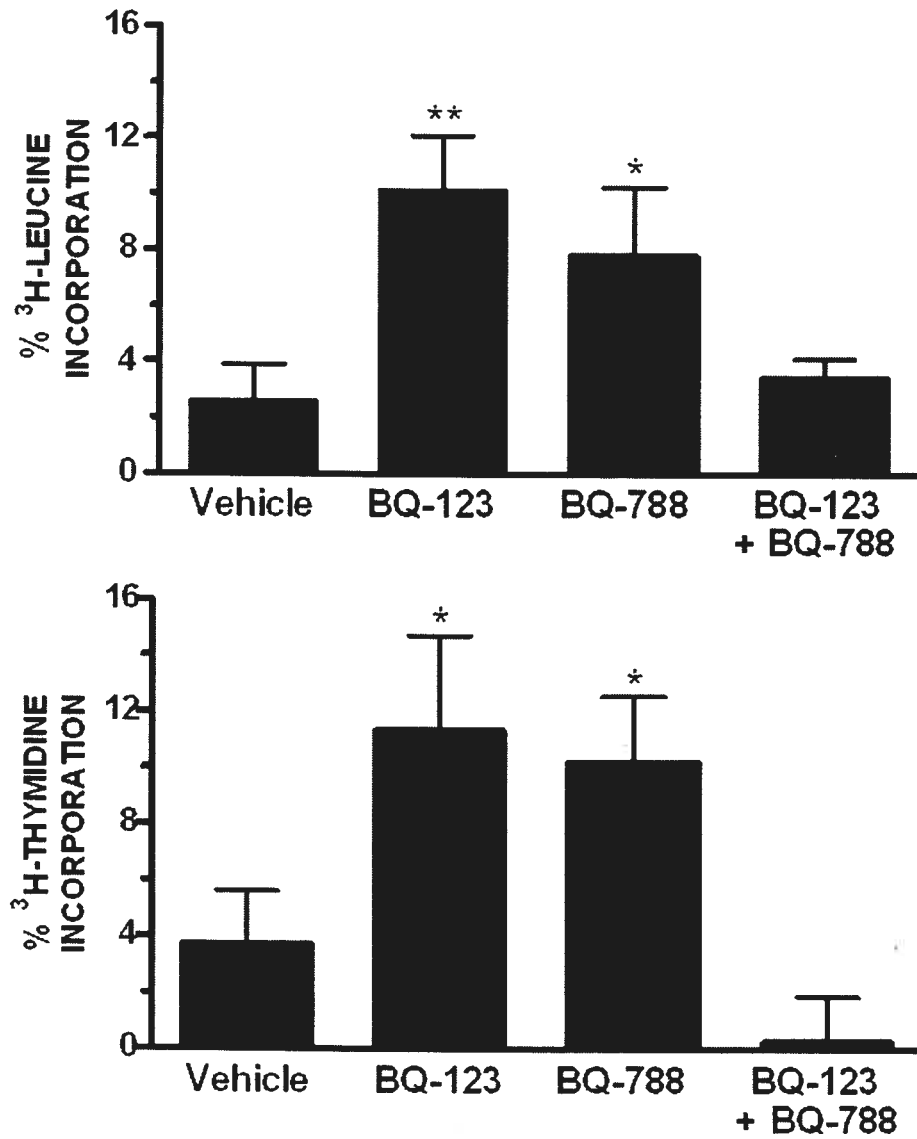
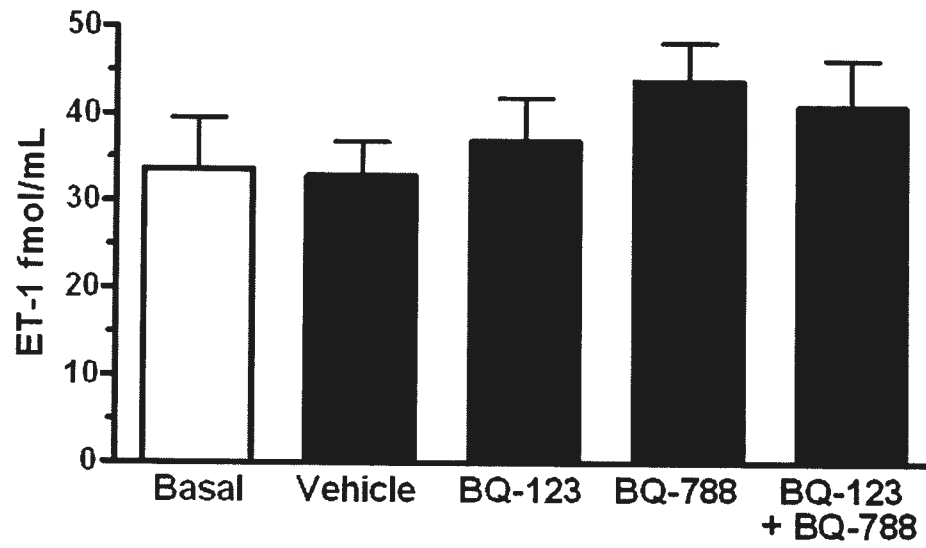


Figure 5

ET-1 levels and ET-Rs antagonists



3.2 Article 2: Down-regulation of the ET-1 system in CHF lung myofibroblasts

Annick Préfontaine, Angelino Calderone, Jocelyn Dupuis

Cardiovascular Research

Montreal Heart Institute, Department of Medicine, 5000 Belanger Street East,
Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada

Down-regulation of the Endothelin System of Lung Myofibroblasts in Congestive Heart Failure

Annick Préfontaine,¹ Angelino Calderone,^{1,3} Jocelyn Dupuis^{1,2}

Short title: ET system of lung myofibroblasts in CHF

Word count: 4,234

From the Research Center and Departments of Medicine (A.P., A.C., J.D.) and Physiology (A.C.) Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, and Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

Correspondence to Jocelyn Dupuis, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada. Tel.: 514-376-3330; Fax: 514-376-1355; E-Mail: [REDACTED]

Abstract

Background—Congestive heart failure (CHF) causes lung remodelling characterized by thickening of the alveolar septa with abundant proliferation of myofibroblasts (MYF). Endothelin-1 (ET-1) production is increased in CHF and may contribute to this process.

Methods and results—CHF was induced in rats by myocardial infarction and three weeks later lung MYF were isolated and cultured. CHF injected with 5'-bromodeoxyuridine (BrdU) intraperitoneally demonstrated lung remodelling with thickening of alveolar septa and significant increases uptake and vimentin expression ($p < 0.05$). The mitogenic and protein synthesis response of MYF to ET-1 (10nM) were assessed by ^3H -thymidine and ^3H -leucine incorporation respectively. ET-1 level in culture supernatants was measured by ELISA. ET_A and ET_B receptors expression was examined by western immunoblotting. The mitogenic response to ET-1 in CHF ($19.0 \pm 3.0\%$, mean \pm SEM) was significantly less than for sham rats ($35 \pm 5.4\%$, $p < 0.05$). This effect was associated with a significantly lower production of ET-1 by CHF MYF (15.15 ± 5.67 fmol/ml) compared to sham MYF (33.66 ± 13.22 fmol/ml; $p < 0.05$). Additionally, expression of both ET_A receptors (0.36 ± 0.038 AU) and ET_B receptors (0.24 ± 0.075 AU) were reduced in CHF compared to shams (0.65 ± 0.086 AU and 0.81 ± 0.21 AU respectively; $p < 0.05$).

Conclusion—There is a down-regulation of the ET-1 system of lung MYF in CHF. This downregulation of the ET-1 axis in lung MYF may represent a protective adaptation in response to chronic exposure to high levels of ET-1.

Keywords: remodelling; cardiomyopathy; vasoactive peptides; receptors, cell culture

1. Introduction

Congestive heart failure (CHF) is associated with elevated left ventricular filling pressure that can lead to pulmonary venous hypertension. CHF is the most frequent cause of pulmonary hypertension and is associated with pulmonary function abnormalities in the form of reduced lung compliance and diffusing capacity [1]. Accordingly, CHF causes significant morphological changes of both the pulmonary circulation and the alveolar walls. These modifications are characterized by thickening of the capillary endothelial and alveolar epithelial cell basement membranes with abundant proliferation of myofibroblasts (MYF) and excess collagen with reticulin deposition [2-4]. Although these changes may initially protect against the formation of pulmonary oedema by reducing lung capillary permeability, their longer term effects become detrimental by creating a restrictive physiology with impaired lung diffusion capacity at rest and during exercise [5,6].

Substantial evidence demonstrates activation of the ET system in CHF that correlates with disease severity and prognosis [7]. Interestingly, there are some suggestions that increased ET-1 levels in CHF may originate from the lungs, possibly in relation with congestion [8,9]. Previous studies have indeed shown an up-regulation of ET-1 gene expression and an increased production of ET-1 in the CHF lungs [9-11].

Apart from its potent vasoconstrictor activity on smooth muscle cells, ET-1 can stimulate MYF proliferation, chemotaxis and collagen synthesis [12-14]. Through these actions on lung MYF, activation of the ET-1 system in CHF could significantly contribute to lung remodelling and the pulmonary manifestations of left heart disease. To test this hypothesis, we evaluated the effect of ET-1 on lung MYF proliferation as well as modifications of the ET system in lung MYF from CHF rats.

2. Materials and methods

The study protocol was approved by the Animal Research and Ethics Committee of the Montreal Heart Institute and conducted according to Canadian guidelines for the care of laboratory animals.

2.1. *Surgical procedures and in vivo hemodynamics measurements*

Myocardial infarctions (MIs) were induced into male Wistar rats (Charles Rivers) weighing between 200 to 250 g as previously described in detail [15]. The sham group was subjected to the same procedure except for the ligation of the coronary artery. Only rats with congestive heart failure and significant pulmonary venous hypertension were kept for study as defined by a left ventricular end diastolic pressure > 10 mmHg and a right ventricular systolic pressure > 30 mmHg. Rats that did not meet these criteria were excluded and sacrificed.

Three weeks following the surgical procedure, animals were anesthetised by a mixture of ketamine and xylazine administered intramuscularly. The right jugular vein and carotid artery were then isolated, incised and a pressure tipped millar catheter was advanced in the right and left ventricles where pressures were measured and recorded using a polygraph (Gould TA 4000). The trachea was then isolated and connected to a syringe. After a midline sternotomy the heart and lungs were exposed and the pulmonary artery was cannulated and perfused with a PBS solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄ pH 7.4). The lungs were then rapidly removed and the left superior lobe was perfused with an optical cutting temperature (OCT) compound solution diluted in PBS 2:1. The left superior lung lobe was then snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for immunofluorescence study. The right inferior lobe was set aside for determination of

wet and dry weight. Subpleural (peripheral) portions of the other lobes were isolated for cell culture.

2.2. *Myofibroblasts isolation and culture*

The subpleural (peripheral) portions of each lung lobe were washed twice with a Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). The portions were then cut in small pieces of 3 to 5 mm, washed twice with HBSS and digested overnight with 0.1% trypsin solution diluted in HBSS with agitation. Cells were recovered by repeated digestions of the tissue in 10 ml of 0.1% collagenase in HBSS and the supernatants collected from each digestion were centrifuged at 10 000 rpm for 5 min at 4°C. The pellets were re-suspended in cold HBSS and centrifuged at 10 000 rpm for 5 min at 4°C. The cells were then re-suspended in 120 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 7.4% of Foetal Bovine Serum, 2% of Penicilline-Streptomycine and 1% of Fungizone. The MYF were pre-plated in T75 culture flasks and placed in an incubator maintained at 37°C with 5% CO₂. The media was changed every 2 days until confluence and the MYF were then passaged in a Trypsin-EDTA 1X solution and transferred into 24-wells plates at a density of 50cells/mm² for [³H]-leucine and [³H]-thymidine uptake experiments and into P100 flask disk for protein isolation.

2.3. *Immunofluorescence studies*

Rats were injected intraperitoneally with bromodeoxyuridine (BrdU) (50 mg/kg) at daily intervals starting 3 days before they were sacrificed. The superior left lobe was cryocut into 14µm slides. The slides were fixed in PBS solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄ pH 7.4) containing 4%

paraformaldehyde pH 7.4 for 15 min. They were then washed thrice with PBS, treated for 60 min at 37°C with 1N HCL and washed three times with 0.1M borate followed by three wash in PBS. The slides were then blocked in a PBS solution containing 2% normal donkey serum (NDS) 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.5% Triton X-100 for 1h at room temperature. Afterwards the cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody: vimentin (Goat 1:200) and BrdU (mouse 1:200) diluted in PBS containing 1% NDS, 1% BSA and 0.1% Triton X-100. The slides were then washed with PBS, drained, and incubated for 1h at room temperature in the dark with the appropriate secondary antibody: anti-goat from a donkey conjugated to Alexa Fluor 488 nm (1:500) and anti-mouse from a donkey conjugated to Alexa Fluor 555 nm (1:500) (Molecular Probes, Eugene; Oregon) diluted in PBS containing 1% NDS, 1% BSA and 0.1% Triton X-100. Each experiment included a control secondary antibody in order to determine non-specific binding. The slides were then washed with PBS and mounted on glass slides using 75 μ L of 0.1% DABCO/glycerol medium. The slides were fixed and visualised by confocal microscopy (Zeiss LSM 510, Iena, Germany).

Z-stacks were deconvolved with the Huygens Professional software (Scientific Volume Imaging, SVI) version 2.6.5a. Fluorescent beads (170 nm in diameter, Invitrogen) were used to construct a point spread function (PSF) corresponding for each fluorescent marker. Signal-to-noise ratios were quantified for each labelling and for each Z stack. Deconvolved Z stacks were then saved in tiff images series and transparent projections (using all the slices from the deconvolved Z stacks, with respect with the Y axis) were calculated using the projection tool of the LSM 510 software (Zeiss).

2.4. *[³H]-leucine and [³H]-thymidine uptake*

After 24h, the media was changed to a serum free media containing 2% penicillin-streptomycin, 1% fungizone and 0.2% insulin-transferrine-selenium. After 24 h, the MYF were stimulated with 10 nM of ET-1 for 24h. The media without serum was used as a basal value and media containing 10 % FBS was used as a positive control. To study protein synthesis, 1 μ Ci/ml of [³H]-Leucine was added immediately to the wells. As for DNA synthesis, 1 μ Ci/ml of [³H]-Thymidine was added 4h before the end of the stimulation. The cells were washed with PBS and 1 ml/well of cold 5% trichloroacetic acid was added for 1 h. Afterwards the wells were washed with H₂O and incubated overnight at 4°C in a solution of 0.4M NaOH (0.5 ml/wells). Following the addition of 5 ml of scintillation liquid, the samples were analysed in a scintillation counter (Beckman LS 6500).

2.5. *Quantification of ET-1 in culture media*

To quantify ET-1 production by MYF, samples of the culture media were analysed by a sandwich ELISA kit, Endothelin [1-21] from Biomedica (Medicorp, Montréal, Qc) according to manufacturer's instructions.

2.6. *Western immunoblots for ET_A-R and ET_B-R*

Proteins from lung MYF were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred at 100 V and 4°C for 90 min onto a nitrocellulose membrane for ET_A-R and PVDF membrane for ET_B-R in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM Glycine and 5% methanol. Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% skimmed milk powder in 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5 (TBS) and 0.05% tween 20 (TBST) for ET_A-R and PBST for ET_B-R. Membranes were

incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-ET_A (Abcam) and rabbit polyclonal anti-ET_B (Alomone). They antibodies were diluted 1:1000 for ET_A-R with 5% milk in TBST and 1:500 for ET_B-R with 5% BSA. The membranes were then washed with their proper buffer (3 X 10 min) and re-blocked for 10 min with 5% milk diluted in the proper buffer. Membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Laboratories) diluted 1:10 000 in 5% milk. Following 3 washes, immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Renaissance Plus, Perkin Elmer Life Sciences) according to the manufacturer's instructions using Bio-Max MR film. GAPDH 1:50 000 was used as the loading control.

2.7. Statistics

The differences between sham and CHF myofibroblasts were compared using unpaired two-sided *t* tests. A *p* value of <0.05 was considered significant. All values are reported as mean ± SEM.

3. Results

3.1. Myocardial infarction

Hemodynamic and morphometric parameters are presented in Table 1. Three weeks after MI, rats developed CHF with marked increase of LV end-diastolic pressure associated with a reduction in indices of LV contractility and relaxation. Infarcted animals also developed severe pulmonary hypertension with elevation of RV systolic pressure (25 ± 1 vs 57 ± 7 mmHg; *p* < 0.001). The CHF group also demonstrated RV hypertrophy with an important increase of RV/LV+septum weight from 0.28 ± 0.01 to 0.40 ± 0.04 (*p* < 0.01). Wet lung weight also increased in CHF (0.73 ± 0.09g) compared to sham's (0.45 ± 0.01 g; *p* < 0.05). As we previously

demonstrated in this model, dry lung weight also significantly increased in the CHF group from 0.096 ± 0.002 g to 0.144 ± 0.016 g ($p < 0.05$). However, the ratio of dry/wet lung weight remained similar, thus supporting the absence of significant pulmonary oedema in the observed weight gain.

3.2. *Expression of BrdU and vimentin in lungs of sham and CHF rats*

In a previous study we have identified that proliferating cells in the lung of this CHF model were MYF by using immunohistochemistry and electron microscopy [3]. We confirmed and extended this observation by demonstrating active DNA synthesis in the alveolar septa evidenced by a significant increase of BrdU positive cells with abundant vimentin expression (Fig. 1).

3.4. *CHF myofibroblast show reduced mitogenic response to ET-1*

In isolated lung MYF, ET-1 (10 nM) stimulated proliferation as evidenced by a marked increase of ^3H -thymidine ($35 \pm 5\%$) and ^3H -leucine incorporation ($31 \pm 4\%$). This effect was however almost reduced by half in CHF MYF for both ^3H -thymidine ($19 \pm 3\%$) and ^3H -leucine up-take ($16 \pm 4\%$, $p < 0.05$) (Fig. 2).

3.5. *CHF myofibroblasts secrete significantly less ET-1 in culture media*

There was basal production of ET-1 by lung MYF as evidenced by a level of 34 ± 13 fmol/ml in the culture media (Fig. 3). This was reduced significantly by half in CHF (15 ± 6 fmol/ml, $p < 0.05$).

3.6. *ET receptors are expressed differently in control and CHF myofibroblasts*

Total protein was extracted from normal ($n = 3$) and CHF myofibroblasts ($n=5$). ET_A receptors and ET_B receptors protein expression was significantly lower

by more than one half in CHF (0.36 ± 0.038 and 0.24 ± 0.075 AU respectively; $p < 0.05$) compared sham (0.65 ± 0.086 and 0.81 ± 0.21 AU respectively).

4. Discussion

We evaluated the ET-1 system of lung MYF in CHF. We found that ET-1 stimulates MYF proliferation however, there is a clear down-regulation of this system in CHF with approximately 50% reduction in proliferation, ET-1 production, and ET receptors expression.

CHF leads to elevated left ventricular filling pressure, pulmonary congestion and eventually to pulmonary venous hypertension. When acute, the process can lead to the development of pulmonary interstitial and alveolar oedema due to increased lung capillary hydrostatic pressure. It is however now well demonstrated that chronic CHF leads to pathophysiologic changes in the lung parenchyma, possibly in an attempt to protect against the development of pulmonary oedema. Lung remodelling is characterized by alveolar septa thickening and the deposition of collagen and, importantly, by evidence of MYF proliferation [3, 4, 16]. This initially protective mechanism evidently becomes maladaptive as patients with CHF develop a restrictive lung physiology with reduced gas diffusion capacity contributing to the functional limitation of these subjects [17,18]. We have previously demonstrated, using immunohistochemistry and electron microscopy, that MYF importantly contribute to lung structural remodelling in the MI model of CHF [3]. In the present study we extend these observations and demonstrate active proliferation of cells in the lung of CHF animals that abundantly express both BrdU and vimentin.

Although recent pilot clinical trials of ET receptor antagonists in CHF have been deceiving, there is unequivocal evidence of activation of the endothelin in CHF

[19]. Numerous studies have demonstrated elevated plasma level of ET-1 in CHF with suggestion that levels correlate with prognosis [7,20]. Of direct relevance to the current study, elevation of plasma ET-1 levels correlate especially well with the severity of pulmonary hypertension in CHF [21] and studies have argued that the increase in ET-1 levels may in fact come from the lungs in relation with pulmonary venous congestion [8,9]. In the same model of CHF, others have previously demonstrated increased production of ET-1 in the lungs evidenced by higher prepro-ET-1 and ET-1 levels [10]. Activation of the ET system may therefore be of particular importance in the lung structural modifications associated with CHF.

In that context, our salient finding of markedly down-regulated ET-1 system in lung MYF with reductions by about one half of ET-1 production, ET receptors expression and MYF proliferation is striking. Others investigated the effect of ET-1 on normal and systemic sclerosis dermal fibroblasts (SSc). In agreement with our findings, they demonstrated that SSc fibroblasts show a reduced growth response to ET-1 and that this diminished response was associated with an altered ratio of ET_A:ET_B receptor expression [22]. This response could therefore be the end-result of the activation of a negative feed-back loop in lung MYF. Because of the pro-proliferative action of ET-1 on lung MYF, chronic exposure to high level of ET-1 could therefore produce reflex protective down-regulation of the ET-1 system in CHF. This desensitization phenomenon could be partly adaptive by protecting the lung from excessive proliferation of MYF and the ensuing deposition of collagen and interstitial matrix components. In support of this notion, the beta adrenergic system has been known for his auto-protective response when constantly exposed to agonists. A chronic exposure to agonists generates beta-receptor desensitization phenomenon which include down-regulation [23], receptor uncoupling [24], and

increased activity of the G_i [25]. Despite this down-regulation, beta-blockade is still beneficial in protecting the heart against chronically increased adrenergic stimulation and is recognized as a mainstay of CHF therapy [26]. Therefore and by analogy to the beta-adrenergic system, a down-regulated ET system in CHF lung MYF may not indicate a lack of importance in MYF proliferation but in fact, may even highlight and attest the significance of the endothelin system in CHF.

In the myocardial infarction model of CHF, ET receptor antagonists have yielded mixed results on their effect on left ventricular function. They have however consistently improved the severity of pulmonary hypertension [27]. Our findings would suggest that the effectiveness of these drugs for the specific therapy of lung remodelling in CHF should be revisited.

5. Conclusion

ET-1 stimulates lung MYF proliferation. There is a down-regulation of the ET-1 system of lung MYF in CHF. This may represent a protective adaptation in response to chronic exposure to high levels of ET-1 and suggests a significant role of ET-1 in lung MYF proliferation in this pathologic condition.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of health Research and the Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Dr Dupuis is a national researcher from the "Fonds de la recherche en santé Québec". Dr Angelino Calderone is a senior scholar from the "Fonds de la recherche en santé Québec".

References

- [1] Gehlbach BK, Geppert E. The pulmonary manifestations of left heart failure. *Chest* 2004;125:669-82.
- [2] Huang W, Kingsbury MP, Turner MA, Donnelly JL, Flores NA, Sheridan DJ. Capillary filtration is reduced in lungs adapted to chronic heart failure: morphological and haemodynamic correlates. *Cardiovasc Res* 2001;49:207-17.
- [3] 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* 2003;58:621-31.
- [4] Kingsbury MP, Huang W, Donnelly JL, Jackson E, Needham E, Turner MA, Sheridan DJ. Structural remodelling of lungs in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 2003;98:295-303.
- [5] Guazzi M, Pontone G, Brambilla R, Agostoni P, Reina G. Alveolar-capillary membrane gas conductance: a novel prognostic indicator in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2002;23:467-76.
- [6] Puri S, Baker BL, Dutka DP, Oakley CM, Hughes JM, Cleland JG. Reduced alveolar-capillary membrane diffusing capacity in chronic heart failure. Its pathophysiological relevance and relationship to exercise performance. *Circulation* 1995;91:2769-74.
- [7] Pousset FR, Isnard P, Lechat H, Kalotka A, Carayon G, Maistre S, et al. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997;18:254-8.
- [8] Dupuis J. Increased endothelin levels in congestive heart failure: does it come from the lungs? Does it matter? *Cardiovasc Res* 2004;63:5-7.

- [9] von Lueder TG, Kjekshus H, Edvardsen T, Urheim OIES, Vinge LE, Ahmed MS, et al. Mechanisms of elevated plasma endothelin-1 in CHF: congestion increases pulmonary synthesis and secretion of endothelin-1. *Cardiovasc Res* 2004;63:41-50.
- [10] Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Philippe M, Louedec L, Henry J, Mulder P, et al. Pulmonary endothelinergic system in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2001;49:330-9.
- [11] Giaid AM, Yanagisawa D, Langleben RP, Michel R, Levy H, Shennib S, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993;328:1732-9.
- [12] Gallelli L, Pelaia G, D'Agostino B, Cuda G, Vatrella A, Fratto D, et al. Endothelin-1 induces proliferation of human lung fibroblasts and IL-11 secretion through an ET(A) receptor-dependent activation of MAP kinases. *J Cell Biochem* 2005;96:858-68.
- [13] Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, et al. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 2001;116:417-25.
- [14] Peacock AJ, Dawes KE, Shoc A, Gray AJ, Reeves JT, Laurent GJ. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:492-9.
- [15] Nguyen QT, Colombo F, Rouleau JL, Dupuis J, Calderone A. LU135252, an endothelin(A) receptor antagonist did not prevent pulmonary vascular remodelling or lung fibrosis in a rat model of myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 2000;130:1525-30.

- [16] Kapanci YS, Burgan G, Pietra G, Conne B, Gabbiani G. Modulation of actin isoform expression in alveolar myofibroblasts (contractile interstitial cells) during pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1990;36:881-9.
- [17] Agostoni P, Bussotti M, Cattadori G, Margutti E, Contini M, Muratori M, et al. Gas diffusion and alveolar-capillary unit in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2006;27:2538-43.
- [18] Guazzi M, Reina G, Tumminello G, Guazzi MD. Alveolar-capillary membrane conductance is the best pulmonary function correlate of exercise ventilation efficiency in heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2005;7:1017-22.
- [19] Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:1349-55.
- [20] Galatius-Jensen S, Wroblewski H, Emmeluth C, Bie P, Haunso S, Kastrup J. Plasma endothelin in congestive heart failure: a predictor of cardiac death? *J Card Fail* 1996;2:71-6.
- [21] 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. *Circulation* 1992;85:504-9.
- [22] Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;(31 Suppl 1):S360-3.
- [23] Linden J, Patel A, Spanier AM, Weglicki WB. Rapid agonist-induced decrease of 125I-pindolol binding to beta-adrenergic receptors. Relationship

to desensitization of cyclic AMP accumulation in intact heart cells. *J Biol Chem* 1984;259:15115-22.

- [24] Bobik A, Campbell JH, Carson V, Campbell GR. Mechanism of isoprenaline-induced refractoriness of the beta-adrenoceptor--adenylate cyclase system in chick embryo cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1981;3:541-53.
- [25] Reithmann C, Werdan K. Homologous vs. heterologous desensitization of the adenylyate cyclase system in heart cells. *Eur J Pharmacol* 1988;54:99-104.
- [26] Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005;112:e154-235.
- [27] Moe GW, Rouleau JL, Nguyen QT, Cernacek P, Stewart DJ. Role of endothelins in congestive heart failure. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:588-97.

Table 1. Hemodynamic and morphometric parameters

Hemodynamic parameters	Sham (n = 10)	CHF (n = 12)
HR (bpm)	253 ± 8	263 ± 9
MAP (mmHg)	97 ± 4	92 ± 4
LVEDP (mmHg)	2 ± 1	16 ± 2***
RVSP (mmHg)	25 ± 1	57 ± 7***
RVEDP (mmHg)	3 ± 1	4 ± 1
CVP (mmHg)	2 ± 0.4	2 ± 0.5
RV(+) dP/dt (mmHg/ s)	1845 ± 114	3189 ± 386**
RV(-) dP/dt (mmHg/ s)	1460 ± 81	2814 ± 402**
LV(+) dP/dt (mmHg/ s)	8600 ± 289	7340 ± 408**
LV(-) dP/dt (mmHg/ s)	7250 ± 279	5850 ± 317**
Morphometric parameters		
Body weight (g)	384 ± 10	385 ± 20
RV/LV + septum weight	0.28 ± 0.01	0.40 ± 0.04**
Wet lung (g)	0.45 ± 0.01	0.73 ± 0.09*
Dry lung (g)	0.096 ± 0.002	0.144 ± 0.016*
Dry lung/ Wet lung weight	0.21 ± 0.004	0.20 ± 0.006
Scar weight (g)	N/A	0.184 ± 0.02
Scar surface (mm ²)	N/A	137 ± 8

CVP: central venous pressure; HR: heart rate ; LV: left ventricle; LVEDP: left ventricle end diastolic pressure; MAP: mean arterial pressure; MI: myocardial infarction; RV: right ventricle; RVEDP: right ventricular end diastolic pressure; RVSP: right ventricular systolic pressure.

Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. Lung weights were measured with the right inferior lobe

FIGURE LEGENDS

- Figure 1 Immunofluorescence expression and quantification of BrdU (left panel) and vimentin (middle panel) in isolated lung from sham and CHF rats. ($n = 8$) * = $p < 0.05$
- Figure 2 Protein synthesis and proliferation of sham and CHF lung myofibroblasts induced by ET-1 10nM. ($n = 10$) * = $p < 0.05$ versus ET-1
- Figure 3 Quantification of ET-1 secretion in culture media from sham and CHF lung MYF by a sandwich ELISA. ($n = 6$) * = $p < 0.05$
- Figure 4 Expression of ET_A and ET_B receptors by Western blot in sham ($n = 3$) and in CHF rats induced by MI ($n = 5$). * = $p < 0.05$

Figure 1 Immunofluorescence expression of BrdU positive cells in isolated lung from control and CHF rats.

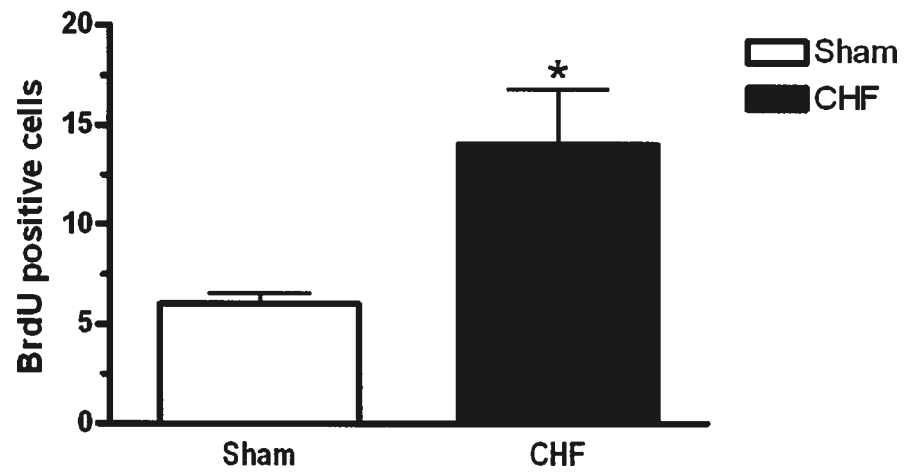
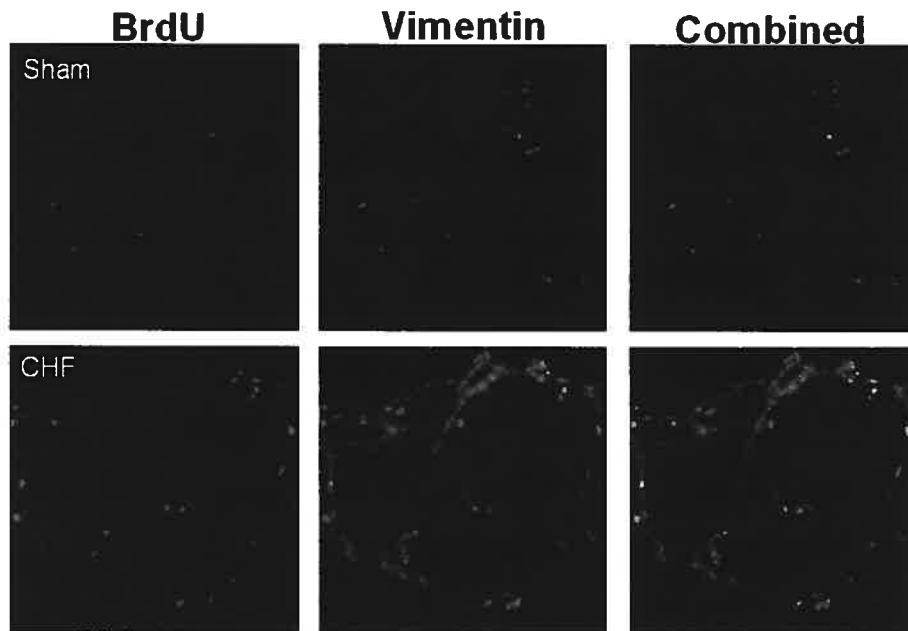


Figure 2

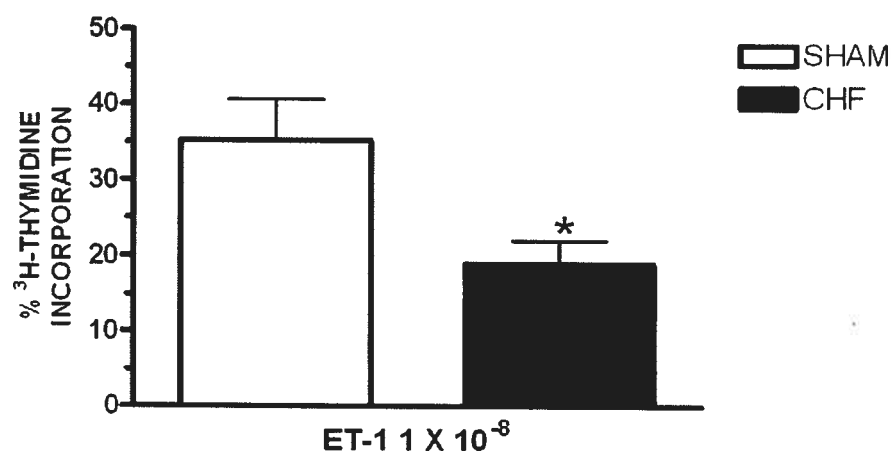
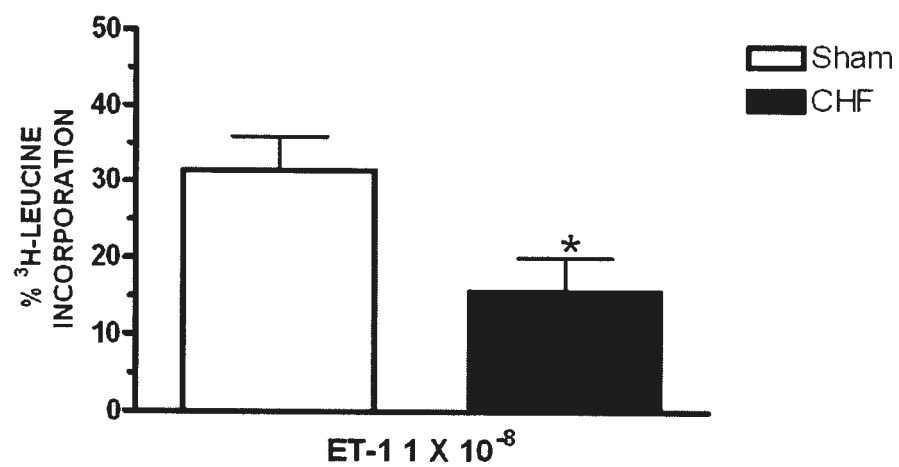


Figure 3

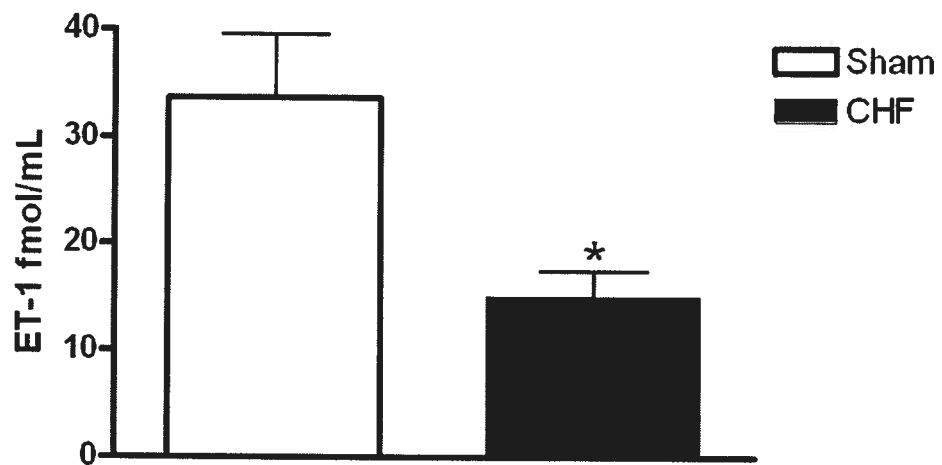
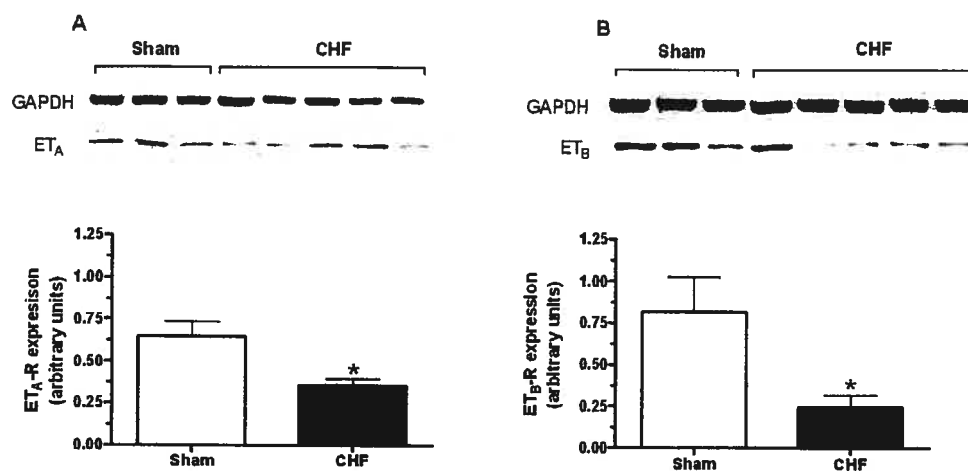


Figure 4

Expression of ET_A and ET_B receptors in lung myfibroblasts by western blot in sham rats (n = 3) and in animal with CHF induced by MI (n = 5). * P < 0.05



4 Discussion

4.1 Rôles des récepteurs de l'ET-1 sur la prolifération des myofibroblastes pulmonaires

Les rôles respectifs des récepteurs à l'ET-1, ET_A et ET_B, demeurent encore incertains et génèrent un grand débat scientifique sur le traitement optimal de certaines pathologies à l'aide d'antagoniste sélectif versus non sélectif. Certaines études révèlent l'importance d'un blocage double en démontrant que les deux récepteurs induisent la prolifération cellulaire tandis que d'autres études démontrent que l'ET-1 induit la prolifération et la contraction fibroblastiques par l'entremise du récepteur ET_A seulement (10, 41, 108, 128, 135).

Afin d'éclairer le débat, nous avons décidé d'explorer les rôles des récepteurs ET_A et ET_B sur la prolifération myofibroblastique à l'état basal et lors d'une stimulation à l'ET-1. À l'aide de la microscopie confocale, nous avons confirmé que les MYFs expriment abondamment les récepteurs ET_A et ET_B. Nous avons également démontré que les MYFs sécrètent environ 33 fmol/ml d'ET-1 dans le milieu de culture et que l'ET-1 stimulait la prolifération des MYFs par l'activation des deux voies intracellulaires, PI3K et p38. Une de nos plus grande découverte est que le blocage double des récepteurs à l'ET-1 est nécessaire afin d'inhiber la prolifération des MYFs induite par l'ET-1. Étonnamment nous avons remarqué que dans les conditions basales, en absence d'une stimulation exogène par l'ajout d'ET-1, l'administration de BQ-123 ou de BQ-788 dans le milieu induisait une augmentation de l'incorporation de ³H-Leucine et de ³H-Thymidine. En résumé, nos résultats ont donc révélé que :

1. Lors d'une stimulation exogène par l'ET-1, le blocage sélectif du récepteur ET_A ou ET_B ne permet pas d'inhiber la prolifération myofibroblastique.
2. À l'état basal, en absence d'une stimulation exogène, le blocage sélectif du récepteur ET_A ou ET_B stimule la prolifération des MYFs pulmonaires.

Nos résultats démontrent qu'il est nécessaire de bloquer les deux récepteurs afin d'inhiber la prolifération induite par l'ET-1. Ceci est donc contradictoire avec d'autres études expérimentales démontrant que la prolifération de fibroblastes dépend de l'activation du récepteur ET_A seulement. Cependant, nos résultats concordent avec une étude récemment publiée par notre groupe de recherche, démontrant que l'utilisation simultanée des antagonistes ET_A et ET_B procure une inhibition supérieure de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 chez des artères de résistances pulmonaires isolées (137).

La démonstration que les antagonistes spécifiques au récepteurs ET_A ou ET_B, BQ-123 et BQ-788, peuvent induire à eux seul la prolifération myofibroblastique est plus difficilement explicable. Grâce à l'évolution des techniques de recherches, les dernières années nous ont démontré à quel point la biologie des récepteurs de l'ET-1 est beaucoup plus complexe que nous le pensions.

D'abord, il y a de plus en plus d'évidence démontrant que l'activation des récepteurs couplés aux protéines-G, comme les récepteurs à l'ET-1, ne résulte pas en une activation de voies intracellulaires de manière linéaire et séquentielle, mais plutôt à l'activation de multiples voies intracellulaires inter-reliées. De plus, il a été démontré que la stimulation de fibroblastes active plusieurs voies intracellulaires

résultant en une augmentation de l'expression d'une grande variété de gènes associé à la matrice extra-cellulaire et à l'activation de d'autres protéines-G (139, 140). Ceci pourrait donc en partie expliquer le paradoxe observé dans cette étude et les résultats contradictoires entre les différents groupes de recherches.

De plus, il a été récemment démontré que les récepteurs à l'ET-1 peuvent former des dimères ou encore des oligomères. La formation d'hétérodimères peut altérer la fonction du récepteur en modifiant l'effet fonctionnel des agonistes et des antagonistes(113, 136, 137). Les récepteurs opioïdes (μ , δ et κ) sont un exemple de récepteur faisant partie de la famille des protéines G possédant la capacité de s'associer entre eux afin de former des dimères ou des oligomères. Le groupe de recherche de Gomes a démontré que l'effet de la morphine (opioïde), par l'activation du récepteur μ , était potentialisé par la présence d'un antagoniste du récepteur δ (141). Pris dans l'ensemble, la présence d'un antagoniste sélectif comme BQ-123 ou BQ-788 pourrait induire le récepteur activé à compenser et conséquemment élever positivement l'action de l'agoniste sur ce récepteur causant ainsi cette augmentation de la prolifération à l'état basal. Plusieurs autres recherches seront requises afin de savoir si la présence d'hétérodimères dans les myofibroblastes pulmonaires pourrait être responsable de cette augmentation de la prolifération à l'état basal.

Finalement, d'autres recherches ont démontrées que les récepteurs à l'ET-1 détiennent aussi des différences structurelles démontrées par plusieurs modifications post-transcriptionnelles des récepteurs ET_A et ET_B (138). Dans des fibroblastes pulmonaires humains, des modifications structurelles se produisent lors d'une

stimulation exogène à l'ET-1. Il a été suggéré que ces changements pourraient être à la base de l'activation parallèle de différentes voies intracellulaires (138).

Basé sur ces études démontrant la complexité de la biologie des récepteurs à l'ET-1, il devient impossible d'offrir une explication spécifique à nos résultats. Nous pouvons par contre, poser cette hypothèse générale : la prolifération des myofibroblastes pulmonaires par les récepteurs de l'ET-1 est un système redondant.

1. Lors d'une stimulation exogène, la prolifération maximale induite par l'ET-1 peut être obtenue par l'activation du récepteur ET_A ou ET_B seulement. La stimulation de l'autre récepteur n'augmente donc pas significativement la prolifération myofibroblastique et son blocage est sans effet notable.
2. À l'état basal, lorsqu'une concentration endogène plus faible d'ET-1 est présente, l'induction de la prolifération par l'ET-1 peut être recrutée et ainsi induire une augmentation de la stimulation de l'un des récepteurs. Le blocage sélectif de l'un des récepteurs amène donc la potentialisation du récepteur activé provoquant ainsi une élévation de la prolifération par ce récepteur.
3. Cette hypothèse est valable seulement si les deux récepteurs activent des voies intracellulaires redondantes ou si il y a présence d'hétérodimères dans les myofibroblastes pulmonaires.

Nous ne savons toujours pas si la complexité de la biologie des récepteurs à l'ET-1 varie selon les conditions des expériences ou selon l'état de la pathologie. Cependant, il est clair que les résultats obtenus chez les myofibroblastes pulmonaires *in vitro* ne peuvent pas être généralisés à tous les types cellulaires, toutes les espèces et à toutes les conditions pathologiques.

4.2 Modification du système de l'ET-1 dans les myofibroblastes pulmonaires de rats IC

Les myofibroblastes pulmonaires sont normalement présents en petite quantité dans les septa alvéolaires des poumons sains. Nous avons récemment démontré que lors d'insuffisance cardiaque secondaire à un infarctus du myocarde (2 semaines) chez le rat, il y a apparition d'un remodelage pulmonaire caractérisé par une prolifération myofibroblastique prédominante. Cette prolifération participe à la détérioration fonctionnelle en réduisant la capacité de diffusion gazeuse alvéolaire et en contribuant au syndrome respiratoire restrictif de l'IC. Cette même étude a également démontrée que l'irbesartan, un antagoniste du récepteur AT1, empêche le développement d'hypertension pulmonaire (HTP) et inhibe la prolifération des MYFs chez les rats IC. Étant donné son activation lors d'IC et son potentiel mitogénique, l'ET-1 pourrait être l'un des médiateurs important de la prolifération des MYFs pulmonaires lors d'IC. Le deuxième objectif de notre recherche était donc d'évaluer l'implication du système de l'ET-1 sur la prolifération des myofibroblastes pulmonaires en culture provenant de rats normaux et de rats souffrant d'insuffisance cardiaque.

Trois semaines suivant la chirurgie, les rats avaient développé une insuffisance cardiaque gauche conduisant par la suite à de l'hypertension pulmonaire. Afin de maximiser la comparaison entre les MYFs pulmonaires de rats normaux et de rats souffrant d'HTP, seulement les rats possédant de gros infarctus ont été inclus dans cette étude. La présence d'un gros infarctus conduisant au développement d'HTP a été établie lorsque la pression systolique du ventricule droit était supérieure à 30 mmHg et que la pression télé-diastolique du ventricule gauche était supérieure à

10 mmHg. Plusieurs autres évidences morphologiques des poumons et du cœur ainsi que plusieurs données hémodynamiques illustraient aussi la présence de la pathologie. Les MYFs pulmonaires provenant de rats normaux et souffrant d'IC ont donc été mis en culture afin de procéder à notre étude.

Nous avons premièrement voulu certifier la présence de ce remodelage pulmonaire dans notre modèle d'IC de 3 semaines. Nous avons donc procédé à la technique d'incorporation de BrdU afin de démontrer une augmentation de la synthèse d'ADN dans les poumons suite à un infarctus du myocarde. Nous avons donc confirmé l'importante synthèse d'ADN dans les septa alvéolaires suite à un infarctus du myocarde grâce à l'augmentation significative de BrdU notée dans les poumons de rats souffrant d'HTP.

Nous avons par la suite étudié la réponse mitogénique in vitro à l'ET-1 de MYFs de rats normaux et IC par incorporation de ^3H -leucine et ^3H -thymidine. L'ET-1 a stimulé la prolifération de MYFs pulmonaires tant chez les rats normaux que chez les rats souffrant d'IC. Cependant, la réponse mitogénique des MYFs d'IC était significativement plus basse que celle des MYFs normaux. Nous avons aussi noté par immunobuvardage de type Western une diminution significative de l'expression des récepteurs de l'ET-1, ET_A et ET_B , dans les MYFs d'IC. De plus, nous avons mesuré une diminution significative de la production d'ET-1 dans le milieu de culture par les MYFs d'IC. Cependant, dans le poumons de rats IC nous retrouvons beaucoup plus de MYFs ce qui laisse présumer que la quantité d'ET-1 sécrétée par les MYFs pulmonaire in vivo pourrait malgré tout être plus élevée que chez les MYFs de rats témoins.

Il est clair que le système ET-1 est activé dans la pathogenèse de l'IC. Une étude a démontré que les niveaux d'ET-1 plasmatique augmentait dès les premières heures suivant un infarctus du myocarde (142). Plusieurs autres études, pré-cliniques et cliniques, ont démontré des niveaux plasmatique et pulmonaire élevés d'ET-1 lors d'IC. De plus, un niveau élevé d'ET-1 plasmatique est maintenant considéré comme étant un examen pronostique de survie (83, 104, 143) et plusieurs recherches pré-cliniques démontrent les conséquences bénéfiques de bloquer le système de l'ET-1 lors d'insuffisance cardiaque (88, 144, 145). Étant donné que nous avons récemment prouvé la présence d'une importante prolifération myofibroblastiques pulmonaires lors d'IC et que l'ET-1 possède aussi des effets mitogéniques sur les myofibroblastes, notre hypothèse de départ était que le système de l'ET-1 serait régulé à la hausse chez les MYFs pulmonaires de rats IC. Cependant, il est évident que le système de l'ET-1 est plutôt régulé à la baisse lors d'IC dans les MYFs pulmonaires.

Notre surprenante trouvaille corrèle néanmoins avec une autre étude investiguant l'effet de l'ET-1 chez des fibroblastes normaux et sclérodermiques (SSc) de la peau. Ce groupe de recherche a démontré que les fibroblastes SSc exprimaient une réponse mitogénique réduite à l'ET-1 et que cette réponse diminuée était associée à une altération du ratio de l'expression des récepteurs $ET_A : ET_B : ET_A$ significativement diminué chez les fibroblastes SSc, tandis qu' ET_B a demeuré inchangé (128). La régulation à la baisse du système de l'ET-1 chez les MYFs pulmonaires IC pourrait donc être expliqué par l'activation d'une réponse rétroactive négative «feed-back loop». Une exposition chronique à des niveaux élevés d'ET-1

pourrait induire une inhibition du système de l'ET-1 dans les MYFs pulmonaires. Ceci suggère donc que ce phénomène de désensibilisation serait adaptatif, permettant au poumon de se protéger d'une prolifération excessive des myofibroblastes et ainsi atténuerait les effets délétères d'une élévation chronique des niveaux plasmatique et pulmonaire de l'ET-1.

Par analogie cette réponse serait comparable à celle du système β -adrénergique connu pour sa réponse auto-protective lorsque chroniquement activé par ses agonistes. Une exposition continue aux β agonistes provoque un phénomène de désensibilisation qui inclue la régulation à la baisse du système, le découplage des récepteurs, la désensibilisation de ses récepteurs et une augmentation de l'activité de la protéine G inhibitrice. Même si la capacité fonctionnelle du cœur insuffisant est déjà exposée à cette désensibilisation des récepteurs β -adrénergique, les β -bloqueurs protègent quand même le cœur contre la stimulation chronique du système adrénergique et demeurent un traitement de base préconisé dans l'IC. Ainsi, une régulation à la baisse du système de l'ET-1 chez les MYFs pulmonaires d'IC n'indique pas nécessairement que ce système ne joue pas un rôle important dans la prolifération myofibroblastiques. En fait, ceci pourrait même souligner l'implication délétère importante du système de l'ET-1 pulmonaire lors d'IC.

Plusieurs autres études sont requises afin de confirmer la désensibilisation du système de l'ET-1 lors d'IC. Premièrement, il serait intéressant de vérifier si la régulation à la baisse du système de l'ET-1 est accompagnée d'une diminution de l'activation des cascades intracellulaires. De plus, il serait important d'aller confirmer chez des myofibroblastes normaux qu'une exposition chronique à l'ET-1 induit une régulation à la baisse similaire à celle observé lors d'IC. Finalement, il

serait encore plus intéressant d'aller étudier l'influence d'un traitement à long terme avec des antagonistes du système de l'ET-1 sur les MYFs pulmonaires de rats IC et vérifier si le traitement chronique renverse la régulation à la baisse du système de l'ET-1 dans ces cellules.

4.3 Limites de l'étude

La limite majeure de notre étude est la technique de culture cellulaire utilisée. Cette technique *in vitro*, peut induire des changements rapides du phénotype cellulaire isolé. Afin de limiter ces effets, nous avons utilisés dans cette étude des MYFs de premier passage seulement. De plus, nous avons également fait des expériences d'immunofluorescence afin de vérifier la présence de changements dans l'expression des marqueurs des MYFs et de l'expression des récepteurs de l'ET-1 entre des MYFs fraîchement isolées et de premier passage (résultats non inclus dans ce mémoire). Il est important de mentionner que nous avons noté aucune différence dans les niveaux d'expression des marqueurs des MYFs (α -actine de muscle lisse, vimentine, desmine et facteur IIX) ainsi que dans la localisation et la densité des récepteurs de l'ET-1. Cependant nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les MYFs se comportent différemment (contractilité, prolifération) *in vivo* qu'*in vitro*.

5 Conclusion

Ces études nous ont permis de démontrer que les MYFs pulmonaires expriment abondamment les récepteurs à l'ET-1 et que l'ET-1 stimule la synthèse d'ADN et protéique. Lors de notre première étude, nous avons illustré qu'il était nécessaire de bloquer les deux récepteurs ET_A et ET_B (BQ-123 et BQ-788) afin d'inhiber significativement la prolifération myofibroblastique induite par l'ET-1. Au cours de cette même étude, nous avons également noté que l'ajout, dans le milieu de culture, de seulement l'un des deux antagonistes spécifiques pour les récepteurs à l'ET-1 induisait, par un processus encore incertain, la prolifération cellulaire. Ceci démontre que les deux récepteurs de l'ET-1 sont impliqués dans la prolifération myofibroblastique et suggère une interaction probable entre les deux récepteurs. Notre deuxième étude, a démontré une régulation à la baisse du système de l'ET-1 dans les MYFs pulmonaires de rats souffrant d'IC par la réponse mitogénique réduite de ces MYFs à l'ET-1, par la diminution de l'expression des récepteurs ET_A et ET_B et par la réduction de la sécrétion d'ET-1 chez les MYFs IC. Ces résultats soulèvent donc la possibilité d'une désensibilisation du système de l'ET-1 dans les myofibroblastes pulmonaires lors d'IC.

6 Bibliographies

1. Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, K. Goto, and T. Masaki. 1988. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl* 6(4):S188-91.
2. Hunley, T. E., and V. Kon. 2001. Update on endothelins - biology and clinical implications. *Pediatr Nephrol* 16(9):752-62.
3. Yoshizumi, M., H. Kurihara, T. Sugiyama, F. Takaku, M. Yanagisawa, T. Masaki, and Y. Yazaki. 1989. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161(2):859-64.
4. Imai, T., Y. Hirata, T. Emori, M. Yanagisawa, T. Masaki, and F. Marumo. 1992. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 19(6 Pt 2):753-7.
5. Kramer, B. K., M. Ackermann, S. M. Kohler, and G. A. Riegger. 1994. Role of endothelin in hypertension. *Clin Investig* 72(2):88-93.
6. Giannessi, D., S. Del Ry, and R. L. Vitale. 2001. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 43(2):111-26.
7. Haynes, W. G., C. E. Ferro, and D. J. Webb. 1995. Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3:S183-5.
8. Marsen, T. A., H. Schramek, and M. J. Dunn. 1994. Renal actions of endothelin: linking cellular signaling pathways to kidney disease. *Kidney Int* 45(2):336-44.

9. Lin, H., M. Sangmal, M. J. Smith, Jr., and D. B. Young. 1993. Effect of endothelin-1 on glomerular hydraulic pressure and renin release in dogs. *Hypertension* 21(6 Pt 1):845-51.
10. Shi-Wen, X., C. P. Denton, M. R. Dashwood, A. M. Holmes, G. Bou-Gharios, J. D. Pearson, C. M. Black, and D. J. Abraham. 2001. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 116(3):417-25.
11. Gallelli, L., G. Pelaia, B. D'Agostino, G. Cuda, A. Vatrella, D. Fratto, V. Gioffre, U. Galderisi, M. De Nardo, C. Mastruzzo, E. T. Salinaro, M. Maniscalco, M. Sofia, N. Crimi, F. Rossi, M. Caputi, F. S. Costanzo, R. Maselli, S. A. Marsico, and C. Vancheri. 2005. Endothelin-1 induces proliferation of human lung fibroblasts and IL-11 secretion through an ET(A) receptor-dependent activation of MAP kinases. *J Cell Biochem* 96(4):858-68.
12. Peacock, A. J., K. E. Dawes, A. Shock, A. J. Gray, J. T. Reeves, and G. J. Laurent. 1992. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7(5):492-9.
13. Salani, D., G. Taraboletti, L. Rosano, V. Di Castro, P. Borsotti, R. Giavazzi, and A. Bagnato. 2000. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 157(5):1703-11.
14. Hirata, Y., Y. Takagi, Y. Fukuda, and F. Marumo. 1989. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78(2-3):225-8.
15. Baynash, A. G., K. Hosoda, A. Giaid, J. A. Richardson, N. Emoto, R. E. Hammer, and M. Yanagisawa. 1994. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B

- receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79(7):1277-85.
16. Takagi, H., P. S. Reinach, N. Yoshimura, and Y. Honda. 1994. Endothelin-1 promotes corneal epithelial wound healing in rabbits. *Curr Eye Res* 13(8):625-8.
 17. Goraca, A. 2002. New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul* 36(4):161-7.
 18. Webb, D. J., J. C. Monge, T. J. Rabelink, and M. Yanagisawa. 1998. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol Sci* 19(1):5-8.
 19. Goto, K., H. Hama, and Y. Kasuya. 1996. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol* 72(4):261-90.
 20. Russell, F. D., and A. P. Davenport. 1999. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* 126(2):391-8.
 21. Turner, A. J., and K. Tanzawa. 1997. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J* 11(5):355-64.
 22. Valdenaire, O., J. G. Richards, R. L. Faull, and A. Schweizer. 1999. XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 64(2):211-21.
 23. Valdenaire, O., D. Lepailleur-Enouf, G. Egidy, A. Thouard, A. Barret, R. Vranckx, C. Tougard, and J. B. Michel. 1999. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 264(2):341-9.
 24. Barnes, K., C. Brown, and A. J. Turner. 1998. Endothelin-converting enzyme: ultrastructural localization and its recycling from the cell surface. *Hypertension* 31(1):3-9.

25. Emoto, N., and M. Yanagisawa. 1995. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270(25):15262-8.
26. Hasegawa, H., K. Hiki, T. Sawamura, T. Aoyama, Y. Okamoto, S. Miwa, S. Shimohama, J. Kimura, and T. Masaki. 1998. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 428(3):304-8.
27. Deng, Y., L. L. Martin, D. DelGrande, and A. Y. Jeng. 1992. A soluble protease identified from rat kidney degrades endothelin-1 but not proendothelin-1. *J Biochem (Tokyo)* 112(1):168-72.
28. Vijayaraghavan, J., A. G. Scicli, O. A. Carretero, C. Slaughter, C. Moomaw, and L. B. Hersh. 1990. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 265(24):14150-5.
29. Fukuroda, T., T. Fujikawa, S. Ozaki, K. Ishikawa, M. Yano, and M. Nishikibe. 1994. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 199(3):1461-5.
30. Dupuis, J., C. A. Goresky, and A. Fournier. 1996. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 81(4):1510-5.
31. Wagner, O. F., G. Christ, J. Wojta, H. Vierhapper, S. Parzer, P. J. Nowotny, B. Schneider, W. Waldhausl, and B. R. Binder. 1992. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 267(23):16066-8.
32. Kelly, R. B. 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230(4721):25-32.
33. Tooze, S. A., and W. B. Huttner. 1990. Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways. *Cell* 60(5):837-47.

34. Orci, L., M. Ravazzola, M. Amherdt, A. Perrelet, S. K. Powell, D. L. Quinn, and H. P. Moore. 1987. The trans-most cisternae of the Golgi complex: a compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins. *Cell* 51(6):1039-51.
35. Haynes, W. G., and D. J. Webb. 1994. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 344(8926):852-4.
36. Harrison, V. J., K. Barnes, A. J. Turner, E. Wood, R. Corder, and J. R. Vane. 1995. Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6344-8.
37. Arai, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo, and S. Nakanishi. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348(6303):730-2.
38. Iwasaki, S., T. Homma, and V. Kon. 1994. Site specific regulation in the kidney of endothelin and its receptor subtypes by cyclosporine. *Kidney Int* 45(2):592-7.
39. Takeda, M., M. D. Breyer, T. D. Noland, T. Homma, R. L. Hoover, T. Inagami, and V. Kon. 1992. Endothelin-1 receptor antagonist: effects on endothelin- and cyclosporine-treated mesangial cells. *Kidney Int* 41(6):1713-9.
40. Molenaar, P., G. O'Reilly, A. Sharkey, R. E. Kuc, D. P. Harding, C. Plumpton, G. A. Gresham, and A. P. Davenport. 1993. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 72(3):526-38.
41. Davie, N., S. J. Haleen, P. D. Upton, J. M. Polak, M. H. Yacoub, N. W. Morrell, and J. Wharton. 2002. ET(A) and ET(B) receptors modulate the

proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 165(3):398-405.

42. D'Orleans-Juste, P., A. Claing, S. Telemaque, M. C. Maurice, M. Yano, and J. P. Gratton. 1994. 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. *Br J Pharmacol* 113(4):1257-62.

43. LaDouceur, D. M., M. A. Flynn, J. A. Keiser, E. Reynolds, and S. J. Haleen. 1993. ETA and ETB receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 196(1):209-15.

44. Moreland, S., D. McMullen, B. Abboa-Offei, and A. Seymour. 1994. Evidence for a differential location of vasoconstrictor endothelin receptors in the vasculature. *Br J Pharmacol* 112(2):704-8.

45. Goldie, R. G., P. G. Knott, M. J. Carr, D. W. Hay, and P. J. Henry. 1996. The endothelins in the pulmonary system. *Pulm Pharmacol* 9(2):69-93.

46. Haller, H., T. Schaberg, C. Lindschau, H. Lode, and A. Distler. 1991. Endothelin increases [Ca²⁺]_i, protein phosphorylation, and O₂⁻ production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 261(6 Pt 1):L478-84.

47. Chanez, P., A. M. Vignola, B. Albat, D. R. Springall, J. M. Polak, P. Godard, and J. Bousquet. 1996. Involvement of endothelin in mononuclear phagocyte inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 98(2):412-20.

48. Panettieri, R. A., Jr., R. G. Goldie, P. J. Rigby, A. J. Eszterhas, and D. W. Hay. 1996. Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon. *Br J Pharmacol* 118(1):191-7.

49. Goldie, R. G., P. J. Henry, P. G. Knott, G. J. Self, M. A. Luttmann, and D. W. Hay. 1995. Endothelin-1 receptor density, distribution, and function in human isolated asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 152(5 Pt 1):1653-8.
50. Fukuroda, T., S. Ozaki, M. Ihara, K. Ishikawa, M. Yano, T. Miyauchi, S. Ishikawa, M. Onizuka, K. Goto, and M. Nishikibe. 1996. Necessity of dual blockade of endothelin ETA and ETB receptor subtypes for antagonism of endothelin-1-induced contraction in human bronchi. *Br J Pharmacol* 117(6):995-9.
51. Takahashi, T., P. J. Barnes, I. Kawikova, M. H. Yacoub, T. D. Warner, and M. G. Belvisi. 1997. Contraction of human airway smooth muscle by endothelin-1 and IRL 1620: effect of bosentan. *Eur J Pharmacol* 324(2-3):219-22.
52. Takimoto, M., K. Oda, Y. Sasaki, and T. Okada. 1996. Endothelin-A receptor-mediated prostanoid secretion via autocrine and deoxyribonucleic acid synthesis via paracrine signaling in human bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 137(11):4542-50.
53. Marini, M., S. Carpi, A. Bellini, F. Patalano, and S. Mattoli. 1996. Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 220(3):896-9.
54. Lodish, B., Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell. 2000. *Biologie Moléculaire de la cellule*, 3e édition ed. DeBoeck Université, Italie.
55. Carl-Henrik, H. 1996. *Signal Transduction*, Chapman and Hall ed.
56. Hall, G. e. 2003. *Précis de Physiologie Médicale*, 10th édition ed. Piccin Nuova Libreria, Padoue.
57. Iwamuro, Y., S. Miwa, X. F. Zhang, T. Minowa, T. Enoki, Y. Okamoto, H. Hasegawa, H. Furutani, M. Okazawa, M. Ishikawa, N. Hashimoto, and T. Masaki. 1999. Activation of three types of voltage-independent Ca²⁺ channel in A7r5 cells

by endothelin-1 as revealed by a novel Ca²⁺ channel blocker LOE 908. *Br J Pharmacol* 126(5):1107-14.

58. Masaki, T., S. Miwa, T. Sawamura, H. Ninomiya, and Y. Okamoto. 1999. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol* 375(1-3):133-8.

59. Bogoyevitch, M. A., P. E. Glennon, M. B. Andersson, A. Clerk, A. Lazou, C. J. Marshall, P. J. Parker, and P. H. Sugden. 1994. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 269(2):1110-9.

60. Clerk, A., F. H. Pham, S. J. Fuller, E. Sahai, K. Aktories, R. Marais, C. Marshall, and P. H. Sugden. 2001. Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. *Mol Cell Biol* 21(4):1173-84.

61. Vojtek, A. B., and C. J. Der. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 273(32):19925-8.

62. Bogoyevitch, M. A., C. J. Marshall, and P. H. Sugden. 1995. Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 270(44):26303-10.

63. Kyriakis, J. M., and J. Avruch. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2):807-69.

64. Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240):1326-31.

65. Vanhaesebroeck, B., and D. R. Alessi. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3:561-76.
66. Lawlor, M. A., and D. R. Alessi. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114(Pt 16):2903-10.
67. al, M. Y. e. 2002. Larousse Médical, deuxième ed. Larousse, Paris.
68. Frank H. Netter, M. D. 1997. Atlas d'anatomie humaine, 2e Édition ed. Icon learning systems.
69. Marieb, E. N. 1993. Anatomie et physiologie humaines, deuxième ed. Éditions du renouveau Pédagogique, Saint-Laurent.
70. Barnes, P. J. 1994. Endothelins and pulmonary diseases. *J Appl Physiol* 77(3):1051-9.
71. 2003. The endothelin system in cardiopulmonary diseases. Actelion Pharmaceuticals Ltd, Allschwill.
72. Mann, D. L. 1999. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation* 100(9):999-1008.
73. Margulies, K. B., F. L. Hildebrand, Jr., A. Lerman, M. A. Perrella, and J. C. Burnett, Jr. 1990. Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation* 82(6):2226-30.
74. Kobayashi, T., T. Miyauchi, S. Sakai, M. Kobayashi, I. Yamaguchi, K. Goto, and Y. Sugishita. 1999. Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2):H1197-206.
75. Picard, P., P. J. Smith, J. C. Monge, J. L. Rouleau, Q. T. Nguyen, A. Calderone, and D. J. Stewart. 1998. Coordinated upregulation of the cardiac

endothelin system in a rat model of heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S294-7.

76. Sakai, S., T. Miyauchi, T. Sakurai, I. Yamaguchi, M. Kobayashi, K. Goto, and Y. Sugishita. 1996. 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(6):1580-8.

77. Tonnessen, T., P. K. Lunde, A. Giaid, O. M. Sejersted, and G. Christensen. 1998. 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(3):633-43.

78. Dupuis, J., G. W. Moe, and P. Cernacek. 1998. Reduced pulmonary metabolism of endothelin-1 in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 39(3):609-16.

79. Kobayashi, T., T. Miyauchi, S. Sakai, S. Maeda, I. Yamaguchi, K. Goto, and Y. Sugishita. 1998. Down-regulation of ET(B) receptor, but not ET(A) receptor, in congestive lung secondary to heart failure. Are marked increases in circulating endothelin-1 partly attributable to decreases in lung ET(B) receptor-mediated clearance of endothelin-1? *Life Sci* 62(2):185-93.

80. Lerman, A., S. H. Kubo, L. K. Tschumperlin, and J. C. Burnett, Jr. 1992. Plasma endothelin concentrations in humans with end-stage heart failure and after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 20(4):849-53.

81. McMurray, J. J., S. G. Ray, I. Abdullah, H. J. Dargie, and J. J. Morton. 1992. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 85(4):1374-9.

82. Stewart, D. J., P. Cernacek, K. B. Costello, and J. L. Rouleau. 1992. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 85(2):510-7.
83. Galatius-Jensen, S., H. Wroblewski, C. Emmeluth, P. Bie, S. Haunso, and J. Kastrup. 1996. Plasma endothelin in congestive heart failure: a predictor of cardiac death? *J Card Fail* 2(2):71-6.
84. Cody, R. J., G. J. Haas, P. F. Binkley, Q. Capers, and R. Kelley. 1992. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 85(2):504-9.
85. Rodeheffer, R. J., and C. G. McGregor. 1992. The development of cardiac transplantation. *Mayo Clin Proc* 67(5):480-4.
86. Wada, A., T. Tsutamoto, M. Ohnishi, M. Sawaki, D. Fukai, Y. Maeda, and M. Kinoshita. 1999. Effects of a specific endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiac, renal, and neurohumoral functions in congestive heart failure: comparison of effects with those of endothelin A receptor antagonism. *Circulation* 99(4):570-7.
87. Mulder, P., V. Richard, G. Derumeaux, M. Hogie, J. P. Henry, F. Lallemand, P. Compagnon, B. Mace, E. Comoy, B. Letac, and C. Thuillez. 1997. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 96(6):1976-82.
88. Moe, G. W., A. Albernaz, G. O. Naik, M. Kirchengast, and D. J. Stewart. 1998. Beneficial effects of long-term selective endothelin type A receptor blockade in canine experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 39(3):571-9.
89. Love, M. P., W. G. Haynes, G. A. Gray, D. J. Webb, and J. J. McMurray. 1996. Vasodilator effects of endothelin-converting enzyme inhibition and endothelin

ETA receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors. *Circulation* 94(9):2131-7.

90. Cowburn, P. J., J. G. Cleland, J. D. McArthur, M. R. MacLean, J. J. McMurray, and H. J. Dargie. 1998. Short-term haemodynamic effects of BQ-123, a selective endothelin ET(A)-receptor antagonist, in chronic heart failure. *Lancet* 352(9123):201-2.

91. Kiowski, W., G. Sutsch, P. Hunziker, P. Muller, J. Kim, E. Oechslin, R. Schmitt, R. Jones, and O. Bertel. 1995. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 346(8977):732-6.

92. Sutsch, G., O. Bertel, and W. Kiowski. 1997. Acute and short-term effects of the nonpeptide endothelin-1 receptor antagonist bosentan in humans. *Cardiovasc Drugs Ther* 10(6):717-25.

93. Roux, S., V. Breu, S. I. Ertel, and M. Clozel. 1999. Endothelin antagonism with bosentan: a review of potential applications. *J Mol Med* 77(4):364-76.

94. Mylona, P., and J. G. Cleland. 1999. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. Cardio.net Editorial Team. *Eur J Heart Fail* 1(2):197-200.

95. WT, A. 2001. Late breaking clinical trials. Effects of enrasentan, a non-selective endothelin receptor antagonist in class II-III heart failure: results of the ENCOR trial. American College of Cardiology 50th Annual Scientific Session. American College of Cardiology, Orlando Fl.

96. Teerlink, J. R. 2002. Recent heart failure trials of neurohormonal modulation (OVERTURE and ENABLE): approaching the asymptote of efficacy? *J Card Fail* 8(3):124-7.

97. Coletta, A. P., A. A. Louis, A. L. Clark, N. Nikitin, and J. G. Cleland. 2002. Clinical trials update from the European Society of Cardiology: CARMEN, EARTH, OPTIMAAL, ACE, TEN-HMS, MAGIC, SOLVD-X and PATH-CHF II. *Eur J Heart Fail* 4(5):661-6.
98. Farber, H. W., and J. Loscalzo. 2004. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 351(16):1655-65.
99. Jasmin, J. F., A. Calderone, T. K. Leung, L. Villeneuve, and J. Dupuis. 2003. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 58(3):621-31.
100. Kingsbury, M. P., W. Huang, J. L. Donnelly, E. Jackson, E. Needham, M. A. Turner, and D. J. Sheridan. 2003. Structural remodelling of lungs in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98(5):295-303.
101. Huang, W., M. P. Kingsbury, M. A. Turner, J. L. Donnelly, N. A. Flores, and D. J. Sheridan. 2001. Capillary filtration is reduced in lungs adapted to chronic heart failure: morphological and haemodynamic correlates. *Cardiovasc Res* 49(1):207-17.
102. Guazzi, M., G. Pontone, R. Brambilla, P. Agostoni, and G. Reina. 2002. Alveolar--capillary membrane gas conductance: a novel prognostic indicator in chronic heart failure. *Eur Heart J* 23(6):467-76.
103. Murali, S. 2006. Pulmonary arterial hypertension. *Curr Opin Crit Care* 12(3):228-34.
104. Giaid, A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R. P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W. P. Duguid, and D. J. Stewart. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328(24):1732-9.

105. Vincent, J. A., R. D. Ross, J. Kassab, J. M. Hsu, and W. W. Pinsky. 1993. Relation of elevated plasma endothelin in congenital heart disease to increased pulmonary blood flow. *Am J Cardiol* 71(13):1204-7.
106. Hassoun, P. M., V. Thappa, M. J. Landman, and B. L. Fanburg. 1992. Endothelin 1: mitogenic activity on pulmonary artery smooth muscle cells and release from hypoxic endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 199(2):165-70.
107. Stelzner, T. J., R. F. O'Brien, M. Yanagisawa, T. Sakurai, K. Sato, S. Webb, M. Zamora, I. F. McMurtry, and J. H. Fisher. 1992. Increased lung endothelin-1 production in rats with idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 262(5 Pt 1):L614-20.
108. Kernochan, L. E., B. N. Tran, P. Tangkijvanich, A. C. Melton, S. P. Tam, and H. F. Yee, Jr. 2002. Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. *Gut* 50(1):65-70.
109. Li, H., S. J. Chen, Y. F. Chen, Q. C. Meng, J. Durand, S. Oparil, and T. S. Elton. 1994. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 77(3):1451-9.
110. Soma, S., H. Takahashi, M. Muramatsu, M. Oka, and Y. Fukuchi. 1999. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(4):620-30.
111. Nakanishi, K., F. Tajima, Y. Nakata, H. Osada, S. Tachibana, T. Kawai, C. Torikata, T. Suga, K. Takishima, T. Aurues, and T. Ikeda. 1999. Expression of endothelin-1 in rats developing hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Lab Invest* 79(11):1347-57.

112. Ivy, D. D., T. A. Parker, J. W. Ziegler, H. L. Galan, J. P. Kinsella, R. M. Tuder, and S. H. Abman. 1997. Prolonged endothelin A receptor blockade attenuates chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *J Clin Invest* 99(6):1179-86.
113. Gregan, B., J. Jurgensen, G. Papsdorf, J. Furkert, M. Schaefer, M. Beyermann, W. Rosenthal, and A. Oksche. 2004. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 279(26):27679-87.
114. Clozel, M., and G. A. Gray. 1995. Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3:S262-4.
115. Sato, K., M. Oka, K. Hasunuma, M. Ohnishi, K. Sato, and S. Kira. 1995. Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am J Physiol* 269(5 Pt 1):L668-72.
116. Channick, R. N., G. Simonneau, O. Sitbon, I. M. Robbins, A. Frost, V. F. Tapson, D. B. Badesch, S. Roux, M. Rainisio, F. Bodin, and L. J. Rubin. 2001. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358(9288):1119-23.
117. Rubin, L. J., D. B. Badesch, R. J. Barst, N. Galie, C. M. Black, A. Keogh, T. Pulido, A. Frost, S. Roux, I. Leconte, M. Landzberg, and G. Simonneau. 2002. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346(12):896-903.
118. McLaughlin, V. V., O. Sitbon, D. B. Badesch, R. J. Barst, C. Black, N. Galie, M. Rainisio, G. Simonneau, and L. J. Rubin. 2005. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 25(2):244-9.

119. Langleben, D., A. M. Hirsch, E. Shalit, L. Lesenko, and R. J. Barst. 2004. Sustained symptomatic, functional, and hemodynamic benefit with the selective endothelin-A receptor antagonist, sitaxsentan, in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest* 126(4):1377-81.
120. Galie, N., D. Badesch, R. Oudiz, G. Simonneau, M. D. McGoon, A. M. Keogh, A. E. Frost, D. Zwicke, R. Naeije, S. Shapiro, H. Olschewski, and L. J. Rubin. 2005. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 46(3):529-35.
121. Barst, R. J., D. Langleben, D. Badesch, A. Frost, E. C. Lawrence, S. Shapiro, R. Naeije, and N. Galie. 2006. Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan. *J Am Coll Cardiol* 47(10):2049-56.
122. Gabbiani, G., G. B. Ryan, and G. Majne. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27(5):549-50.
123. Weibel, E. R. 1974. On pericytes, particularly their existence on lung capillaries. *Microvasc Res* 8(2):218-35.
124. Hirschi, K. K., and P. A. D'Amore. 1996. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32(4):687-98.
125. Powell, D. W., R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A. B. West. 1999. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1):C1-9.
126. Shepro, D., and N. M. Morel. 1993. Pericyte physiology. *Faseb J* 7(11):1031-8.

127. Uguccioni, M., L. Pulsatelli, B. Grigolo, A. Facchini, L. Fasano, C. Cinti, M. Fabbri, G. Gasbarrini, and R. Meliconi. 1995. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 48(4):330-4.
128. Xu, S., C. P. Denton, A. Holmes, M. R. Dashwood, D. J. Abraham, and C. M. Black. 1998. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S360-3.
129. Davies, P., B. T. Smith, F. B. Maddalo, D. Langleben, D. Tobias, K. Fujiwara, and L. Reid. 1987. Characteristics of lung pericytes in culture including their growth inhibition by endothelial substrate. *Microvasc Res* 33(3):300-14.
130. Gross, T. J., and G. W. Hunninghake. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345(7):517-25.
131. Puri, S., B. L. Baker, D. P. Dutka, C. M. Oakley, J. M. Hughes, and J. G. Cleland. 1995. Reduced alveolar-capillary membrane diffusing capacity in chronic heart failure. Its pathophysiological relevance and relationship to exercise performance. *Circulation* 91(11):2769-74.
132. Moe, G. W., J. L. Rouleau, Q. T. Nguyen, P. Cernacek, and D. J. Stewart. 2003. Role of endothelins in congestive heart failure. *Can J Physiol Pharmacol* 81(6):588-97.
133. Ergul, A., A. L. Grubbs, Y. Zhang, C. Joffs, J. A. Sample, M. K. King, and F. G. Spinale. 2001. Expression and activity of pulmonary endothelin converting enzyme in heart failure: relation to endothelin biosynthesis and receptor distribution. *J Card Fail* 7(1):84-91.
134. Saleh, D., K. Furukawa, M. S. Tsao, A. Maghazachi, B. Corrin, M. Yanagisawa, P. J. Barnes, and A. Giaid. 1997. Elevated expression of endothelin-1

- and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(2):187-93.
135. Shi-Wen, X., Y. Chen, C. P. Denton, M. Eastwood, E. A. Renzoni, G. Bou-Gharios, J. D. Pearson, M. Dashwood, R. M. du Bois, C. M. Black, A. Leask, and D. J. Abraham. 2004. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15(6):2707-19.
136. Mickley, E. J., G. A. Gray, and D. J. Webb. 1997. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 120(7):1376-82.
137. Sauvageau, S., E. Thorin, A. Caron, and J. Dupuis. 2006. Evaluation of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction following myocardial infarction. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(6):840-6.
138. Stannard, C., P. Lehenkari, and J. Godovac-Zimmermann. 2003. Functional diversity of endothelin pathways in human lung fibroblasts may be based on structural diversity of the endothelin receptors. *Biochemistry* 42(47):13909-18.
139. Stannard, C., V. Soskic, and J. Godovac-Zimmermann. 2003. Rapid changes in the phosphoproteome show diverse cellular responses following stimulation of human lung fibroblasts with endothelin-1. *Biochemistry* 42(47):13919-28.
140. Xu, S. W., S. L. Howat, E. A. Renzoni, A. Holmes, J. D. Pearson, M. R. Dashwood, G. Bou-Gharios, C. P. Denton, R. M. du Bois, C. M. Black, A. Leask, and D. J. Abraham. 2004. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK. *J Biol Chem* 279(22):23098-103.

141. Gomes, I., A. Gupta, J. Filipovska, H. H. Szeto, J. E. Pintar, and L. A. Devi. 2004. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):5135-9.
142. Stewart, D. J., G. Kubac, K. B. Costello, and P. Cernacek. 1991. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 18(1):38-43.
143. Lepailleur-Enouf, D., G. Egidy, M. Philippe, L. Louedec, J. Henry, P. Mulder, and J. Michel. 2001. Pulmonary endothelinergic system in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 49(2):330-9.
144. Fraccarollo, D., J. Bauersachs, M. Kellner, P. Galuppo, and G. Ertl. 2002. Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy. *Cardiovasc Res* 54(1):85-94.
145. Bauersachs, J., D. Fraccarollo, P. Galuppo, J. Widder, and G. Ertl. 2000. Endothelin-receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 47(1):142-9.

