

Université de Montréal

**Implication des endothélines et de leurs récepteurs vasculaires
dans la circulation pulmonaire en condition contrôle et
pathophysiologique**

par

Stéphanie Sauvageau

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D
en physiologie

Octobre, 2008

© Stéphanie Sauvageau, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Implication des endothélines et de leurs récepteurs vasculaires dans la circulation
pulmonaire en condition contrôle et pathophysiologique

présentée par:
Stéphanie Sauvageau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Rémy Sauvé, président-rapporteur
Éric Thorin, directeur de recherche
Jocelyn Dupuis, co-directeur de recherche
Pierre Moreau, membre du jury
Pedro D'Orleans-Juste, examinateur externe
Un représentant du doyen de la FES

Résumé

Le système endothéline (ET) est activé en condition d'hypertension pulmonaire (HTP). L'efficacité des antagonistes des récepteurs à l'ET a clairement été démontrée et a menée à l'approbation clinique de tels antagonistes dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Toutefois, il existe présentement un important débat opposant l'utilisation d'un antagoniste sélectif des récepteur ET_A à l'utilisation d'un antagoniste double ET_A/ET_B dans le traitement de cette pathologie. Bien que nous sachions que le système ET est activé et contribue à l'HTAP, les modifications locales de ce système induites par la pathologie, particulièrement au niveau des artères de résistance pulmonaires, demeurent inconnues. De plus, l'impact de ces modifications sur la réponse pharmacologique aux divers antagonistes des récepteurs à l'ET (sélectifs versus double) est d'une importance capitale. Ainsi, le but de la première étude de cette thèse était d'évaluer les modifications potentielles de la pharmacologie du système ET au niveau des artères de résistance pulmonaires induites par l'HTAP. Dans cette étude, nous avons démontré qu'en condition contrôle l'antagoniste sélectif ET_A et l'antagoniste double n'ont eu aucun effet sur la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1. Toutefois, en condition d'HTAP, les antagonistes sélectif et double ont tous deux été en mesure de réduire la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1. Une diminution importante de l'expression génique du récepteur ET_B pourrait être à l'origine de cette modification du profil pharmacologique des antagonistes.

Une meilleure compréhension des rôles joués par les récepteurs ET_A et ET_B au niveau des artères de résistance pulmonaires pourrait permettre l'optimisation des traitements de l'HTAP. Ainsi, le but de la deuxième étude était d'évaluer les effets d'un traitement antisens *ex vivo* dirigé contre l'ARNm des récepteurs ET_A et ET_B dans la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-1. Dans cette étude, nous avons démontré dans un premier temps que les récepteurs ET_A et ET_B pouvaient former des dimères au niveau des artères de résistance pulmonaires. De plus, nous avons observé qu'une réduction de l'expression protéique du R- ET_A entraînait une

potentialisation de la vasoconstriction ET_B dépendante suggérant ainsi qu'en condition contrôle, le récepteur ET_A aurait un effet inhibiteur sur la vasoconstriction pulmonaire induite par la stimulation du récepteur ET_B .

Les effets délétères de l'ET-1 sur la circulation pulmonaire sont bien connus, toutefois seules quelques études ont porté leur attention sur l'implication de l'ET-3 dans l'HTAP. Ainsi, le but de la troisième étude était d'évaluer l'implication potentielle de l'ET-3 dans l'HTAP. Dans cette étude, nous avons démontré qu'il était nécessaire en condition contrôle de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin de réduire la réponse vasoconstrictrice pulmonaire à l'ET-3. En condition d'HTAP, nous avons observé une augmentation non-significative des concentrations plasmatiques d'ET-3 ainsi qu'une modification du profil pharmacologique des antagonistes des récepteurs à l'ET. En effet, l'utilisation de l'antagoniste sélectif ET_A ou de l'antagoniste double était dans les deux cas en mesure de réduire la vasoconstriction pulmonaire à l'ET-3.

Les résultats de ces trois études suggèrent qu'il est préférable d'utiliser un antagoniste double dans le traitement de l'HTAP. En effet, (1) en condition d'HTAP, l'utilisation d'un antagoniste double est aussi efficace que l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A ; (2) les récepteurs ET_A et ET_B peuvent former des dimères au niveau des artères de résistance pulmonaires et (3) le récepteur ET_B joue un rôle prédominant dans la vasoconstriction pulmonaire, il semble donc essentiel de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin d'inhiber la réponse vasoconstrictrice induite par l'ET.

Mots-clés: endothéline-1, endothéline-3, artère de résistance pulmonaire, récepteur vasculaire, antagoniste des récepteurs à l'ET, dimérisation, phosphorothioate, hypertension artérielle pulmonaire

Abstract

The endothelin (ET) system is activated in pulmonary arterial hypertension (PAH); indeed, increased plasma levels of ET-1 were detected in patients with various forms of PAH and in various experimental models. The therapeutic value of pharmacological blockade of ET receptors has been demonstrated in various animal models and led to the current approval and continued development of these drugs for the therapy of human PAH. Whether the net effect of either selective ET_A receptor blockade or combined ET_A/ET_B receptor blockade provides greater therapeutic benefit remains a subject of debate. Although the ET system contributes to PAH, we currently incompletely comprehend which local modifications of this system occur as a consequence of PAH, particularly in small resistance arteries, and how this could affect the pharmacological response to ET receptor antagonists. The purpose of the first study was therefore to evaluate potential modifications of the pharmacology of the ET system in rat pulmonary resistance arteries from monocrotaline-induced PAH. Our results reveal striking changes in pulmonary vasculature sensitivity to ET receptor antagonism in PAH that may be related to a reduction in ET_B receptor expression.

A better understanding of the exact role played by both ET_A and ET_B receptors on pulmonary resistance arteries might contribute to optimization of PAH treatments. Therefore the aim of the second study was to clarify the role played by both ET_A and ET_B receptors in ET-1 induced pulmonary vasoconstriction using an antisense (AS) oligonucleotide *ex vivo* treatment. In this study we have demonstrated that ET_A and ET_B receptors can form heterodimers in pulmonary resistance arteries. Furthermore, suppression of ET_A receptors potentiated the response to ET-1 suggesting that in control condition the ET_A receptor has an inhibitory action on the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction induced by the stimulation of the ET_B receptor.

Although the deleterious effects of ET-1 on the pulmonary circulation are well established, only a few studies have focused on ET-3 in PAH. Therefore, the purpose of the last study was to evaluate the potential implication of ET-3 in MCT-induced PAH and

evaluate the roles of ET_A and ET_B receptors on ET-3-induced pulmonary vascular reactivity. In control condition, the use of a combination of both ET_A and ET_B receptor antagonists is necessary to reduce the ET-3 induced pulmonary vasoconstriction. In PAH, we found an increased ET-3 plasma levels and a modification of the pharmacological profile of ET receptor antagonists. Indeed, the use of either the ET_A receptor antagonist or the dual antagonist was able to reduce the ET-3 response.

The results from these three studies suggest that it is preferable to use a dual antagonist in the treatment of PAH. Indeed, (1) in PAH the use of a dual antagonist is as effective as the use of a selective ET_A receptor antagonist (2) ET_A and ET_B receptors can form heterodimers in pulmonary resistance arteries and (3) ET_B receptor plays an important role in the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction, suggesting that it is necessary to block both receptors to reduce the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction.

Keywords: endothelin-1, endothelin-3, pulmonary resistance artery, receptor, endothelin receptor antagonist, dimerisation, phosphorothioate pulmonary arterial hypertension

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
<i>Table des matières</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xiii</i>
<i>Liste des Abréviations</i>	<i>xv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xxii</i>
1 Introduction	1
1.1 Circulation pulmonaire	1
1.1.1 Anatomie.....	2
1.1.2 Endothélium vasculaire pulmonaire.....	4
1.1.2.1 Agents vasodilatateurs.....	5
1.1.2.1.1 Monoxyde d'azote	6
1.1.2.1.1.1 Interaction entre le monoxyde d'azote et l'endothéline-1	9
1.1.2.1.2 Prostacycline.....	10
1.1.2.1.3 Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium	12
1.1.2.2 Agents vasoconstricteurs.....	14
1.1.2.2.1 Thromboxane A ₂	15
1.1.3 Les pressions pulmonaires	17
1.2 Hypertension pulmonaire	18
1.2.1 Classification.....	19
1.2.1.1 Hypertension artérielle pulmonaire	20
1.2.1.1.1 Contribution génétique et environnementale.....	21
1.2.1.1.2 Pathogénèse	23
1.2.1.1.2.1 NO	25
1.2.1.1.2.2 PGI ₂	26
1.2.1.1.2.3 TxA ₂	27

1.2.1.1.2.4	ET-1	27
1.2.1.1.2.5	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	28
1.2.1.1.2.6	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	28
1.3	Système endothéline	29
1.3.1	Endothéline-1	29
1.3.1.1	Biosynthèse et Biochimie	31
1.3.1.1.1	Structure des membres du système ET	31
1.3.1.1.2	Biosynthèse	32
1.3.1.1.2.1	Enzymes impliquées dans la biosynthèse	32
1.3.1.2	Sécrétion de l'ET-1	34
1.3.1.3	Clairance de l'ET-1	35
1.3.1.4	Récepteurs vasculaires à l'ET-1	36
1.3.1.4.1	Distribution des récepteurs ET _A et ET _B	37
1.3.1.4.2	Voies de signalisation intracellulaire	38
1.3.1.4.3	Implication des récepteur ET _B dans les effets délétères induits par l'ET-1	40
1.3.1.4.3.1	Profil d'expression du récepteur ET _B en condition pathologique	42
1.3.1.4.4	Régulation croisée entre les récepteurs ET _A et ET _B	44
1.3.1.4.5	Antagonisme sélectif versus antagonisme double	45
1.3.1.5	Rôles physiologiques	46
1.3.1.5.1	Développement embryonnaire et néonatal	46
1.3.1.5.2	Maintien du tonus vasculaire	47
1.3.1.5.3	Homéostasie rénale	48
1.3.1.6	Rôles pathophysiologiques	49
1.3.1.6.1	Défaillance cardiaque et insuffisance cardiaque chronique	49
1.3.1.6.1.1	Antagonistes des récepteurs à l'ET-1	52
1.3.1.6.2	Hypertension artérielle systémique	53
1.3.1.6.2.1	Antagonistes des récepteurs à l'ET-1	55
1.3.1.6.3	Hypertension pulmonaire	56
1.3.1.6.3.1	Modèles animaux expérimentaux	57
1.3.1.6.3.1.1	Modèle hypoxique	58
1.3.1.6.3.1.1.1	Implication du système ET	59
1.3.1.6.3.1.2	Modèle monocrotaline	60
1.3.1.6.3.1.2.1	Implication du système ET	60
1.3.2	Endothéline-3	61
1.3.2.1	Rôles physiologiques	63

1.3.2.1.1	Rôles vasodilatateur et vasoconstricteur de l'ET-3	63
1.3.2.1.2	Développement du système nerveux entérique et des mélanocytes	64
1.3.2.2	Rôles pathophysiologiques	65
1.3.2.2.1	Maladie de Hirschsprung	65
1.3.2.2.2	Hypertension pulmonaire	66
1.4	Récepteurs couplés aux protéines G	67
1.4.1	Dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G	68
1.4.1.1	Dimérisation, réticulum endoplasmique et expression à la surface cellulaire	69
1.4.1.2	Régulation de la dimérisation	70
1.4.1.3	Dimérisation et signalisation intracellulaire	71
1.4.1.4	Dimérisation et pertinence physiologique	72
1.4.2	Dimérisation des récepteurs ET _A et ET _B	73
1.4.3	Techniques utilisées pour la détection des dimères	74
1.4.3.1	Études de Co-immunoprécipitation	75
1.4.3.2	Études de FRET et de BRET	75
1.4.4	Techniques utilisées pour la répression des récepteurs à l'ET	76
1.4.4.1	Oligonucléotides antisens	76
1.4.4.1.1	Phosphorothioate	77
1.5	Traitements de l'hypertension artérielle pulmonaire	79
1.5.1	Inhibiteurs des canaux calciques	79
1.5.2	Voie de la PGI ₂	80
1.5.3	Voie du NO	82
1.5.4	Voie de l'ET	83
1.5.4.1	Bosentan	83
1.5.4.2	Sitaxsentan	84
1.5.4.3	Ambrisentan	86
2	<i>Justification de l'étude</i>	88
2.1	Objectif général de l'étude	89
2.2	Les stratégies expérimentales	90
3	<i>Méthodologie</i>	91
3.1	Modèle animal	91
3.1.1	Modèle monocrotaline	91

3.2	Prise des mesures hémodynamiques.....	91
3.3	Dosage des endothélines par ELISA.....	92
3.3.1	Homogénéisation tissulaire pulmonaire.....	92
3.3.2	Purification des échantillons par colonne Sep-Pak C ₁₈	93
3.3.2.1	ET-1.....	93
3.3.2.2	ET-3.....	93
3.3.3	Protocole expérimental.....	94
3.4	Études de réactivité vasculaire.....	94
3.4.1	Isolation et préparation des artères pulmonaires.....	94
3.4.2	Protocole expérimental.....	95
3.5	Études d'expression génique par qPCR.....	95
3.5.1	Extraction d'ARN total.....	96
3.5.2	Protocole expérimental.....	96
3.5.2.1	Conceptualisation des amorces spécifiques.....	96
3.5.2.2	ADN complémentaire.....	97
3.5.2.3	qPCR.....	98
3.6	Immunobuvardage de type Western Blot.....	98
3.6.1	Protocole expérimental.....	99
3.7	Études d'Immunofluorescence confocale.....	100
3.7.1	Prélèvement et préparation des tissus.....	100
3.7.2	Protocole expérimental.....	100
3.8	Dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B.....	101
3.8.1	Études de co-immunoprécipitation.....	101
3.9	Traitement aux oligonucléotides antisens.....	102
3.9.1	Conceptualisation des séquences antisens.....	103
3.9.2	Exposition des artères de résistance pulmonaires aux antisens.....	103
3.9.2.1	Récepteur ET _A	104
3.9.2.2	Récepteur ET _B	104
3.9.3	Vérification de l'efficacité des séquences antisens utilisées.....	104
3.9.4	Études de réactivité vasculaire.....	105
3.10	Composés utilisés.....	105

3.11	Évaluations statistiques.....	105
3.11.1	Modèle logistique à 5 paramètres.....	106
3.12	Éthique de recherche	107
4	Articles.....	108
4.1	Étude #1.....	108
4.2	Étude #2.....	142
4.3	Étude #3.....	169
5	Discussion	200
5.1	Antagoniste sélectif ET_A ou double ET_A/ET_B?	200
5.1.1	Est-ce que les hétérodimères ET _A /ET _B existent?	201
5.1.1.1	Concept de dimérisation et utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'ET	204
5.1.2	Rôle prédominant du récepteur ET _B dans la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1	208
5.1.3	Endothéline-3 et hypertension artérielle pulmonaire	212
6	Limites des études	214
7	Perspectives futures	215
8	Conclusion.....	216
9	Bibliographie.....	217

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Modèles animaux expérimentaux d'HTP (Marsboom et al., 2004).....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 2. Séquences des amorces spécifiques</i>	<i>97</i>
<i>Tableau 3. Séquences des antisens et scrambled utilisés</i>	<i>103</i>

Liste des figures

<i>Figure 1. Représentation schématique des circulations systémique et pulmonaire (http://academic.kellogg.cc.mi.us)</i>	1
<i>Figure 2. Anatomie de la circulation pulmonaire (www.images.google.ca)</i>	3
<i>Figure 3. Quelques-uns des médiateurs hormonaux entraînant la relâche d'EDRF via l'activation de récepteurs spécifiques à l'endothélium (Vanhoutte., 2003)</i>	5
<i>Figure 4. Sécrétion et mécanismes d'action des substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium (Vanhoutte., 2003)</i>	6
<i>Figure 5. Les différents agonistes et les différentes voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la relâche de NO par la cellule endothéliale (Vanhoutte, 2003)</i>	9
<i>Figure 6. Synthèse de NO et de PGI₂ par les cellules endothéliales (Mitchell et al., 2008)</i>	12
<i>Figure 7. Les multiples mécanismes pouvant entraîner une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (Vanhoutte., 2003)</i>	14
<i>Figure 8. Quelques-uns des médiateurs hormonaux entraînant la relâche d'EDCF et d'EDFR via l'activation de récepteurs spécifiques à l'endothélium (http://www.scielo.br)</i>	15
<i>Figure 9. Structure du TxA₂ (Ogletree., 1987)</i>	16
<i>Figure 10. Classification de l'HTP (Venise 2003) (Puri et al., 2007)</i>	20
<i>Figure 11. Rôle joué par le BMPR-II dans la circulation pulmonaire (Morrell et al., 2001)</i>	22
<i>Figure 12. Vasoconstricteurs et vasodilatateurs de la circulation pulmonaire en condition contrôle et en condition d'HTP (Morrell et al., 2001)</i>	24
<i>Figure 13. Remodelage vasculaire des artères pulmonaires en condition d'HTAP (Morrell et al., 2001)</i>	25
<i>Figure 14. Les agents qui régulent la libération de l'ET-1 (Remuzzi et al., 2002)</i>	30
<i>Figure 15. Structure des membres de la famille ET (Barnes., 1994)</i>	31
<i>Figure 16. Signalisation intracellulaire responsable de la vasoconstriction et du remodelage vasculaire induit par l'ET-1. (Motte et al., 2006)</i>	40

<i>Figure 17. Mode d'action des récepteurs couplés aux protéines G (www.images.google.ca)</i>	68
<i>Figure 18. Liste succincte des RCPG pouvant former des hétérodimères (Prinster et al., 2005)</i>	69
<i>Figure 19. Mécanisme d'action des PTO (Kurreck., 2003)</i>	78
<i>Figure 20. Les cibles thérapeutiques de l'HTAP (Humbert et al., 2004c)</i>	80
<i>Figure 21. Schématisation des concepts de régulation croisée et de dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B</i>	201
<i>Figure 22. Schématisation de l'hypothèse expliquant l'inefficacité du bosentan en condition contrôle et son efficacité en condition d'HTAP</i>	207
<i>Figure 23 Schématisation de la modulation de l'état dimérique des récepteurs ET_A et ET_B en présence d'un antagoniste ou d'un antisens</i>	211

Liste des Abréviations

6MWD	Test de la distance de marche sur 6 minutes
A-147627	Antagoniste sélectif ET _A
A-192621	Antagoniste sélectif ET _B
AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPC	3'5' adénosine monophosphate cyclique
ANGII	Angiotensine II
AR	Récepteur adrénergique
ARIES	<i>Ambrisentan in PAH-a phase III, randomised, double blind, placebo controlled, multicenter, efficacy study of ambrisentan in subjects with pulmonary arterial hypertension</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique d'interférence
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AS	Antisens
BK	Bradykinine
BH ₄	5,6,7,8-tetra-hydrobioptérine réduite
Big ET	Big endothéline
BMPR-II	<i>Bone protein morphogenic receptor</i>
BMS-152874	Antagoniste sélectif ET _A
BQ-123	Antagoniste sélectif ET _A
BQ-788	Antagoniste sélectif ET _B
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
BREATHE	<i>Bosentan randomized Trial of Endothelin Antagonist THERapy</i>

BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
BSF-420627	Antagoniste double des récepteurs à l'ET
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CCB	Bloqueur des canaux calciques
CFP	<i>Cyant Fluorescent Protein</i>
Cl-	Chlore
CML	Cellule musculaire lisse
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX	Cyclooxygénase
DAG	Diacylglycérol
DMCT	Dihydromonocrotaline
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
dNTP	Acide désoxyribonucléique triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EARLY	<i>Endothelin antagonist trial in mildly symptomatic PAH patients</i>
EARTH	<i>Endothelin A receptor antagonist trial in heart failure</i>
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDCF	Facteur vasoconstricteur dérivé de l'endothélium
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF	Facteur vasodilatateur dérivé de l'endothélium
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tetraacétique
ENABLE	<i>Endothelin antagonist bosentan for lowering cardiac Events in heart failure</i>
ENCOR	<i>Enrasentan cooperative randomized evaluation</i>
eNOS	Synthétase endothéliale de monoxyde d'azote
ET	Endothéline
ET _A -AS	Séquence antisens dirigée contre le récepteur A de l'endothéline

ET _B -AS	Séquence antisens dirigée contre le récepteur B de l'endothéline
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FMN	Flavine mononucléotide
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GABA	Récepteurs métabotropiques gamma amino butyrique
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMPc	3'5'-guanoside monophosphate cyclique
GCs	Guanylate cyclase soluble
HOCL	Acide hypochloridrique
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
HTA	Hypertension artérielle systémique
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HTAPI	Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique
HTP	Hypertension pulmonaire
IC	Insuffisance cardiaque
ICC	Insuffisance cardiaque chronique
IK _{Ca2+}	Canal potassique à conductance intermédiaire
iNOS	Synthétase inductible de monoxyde d'azote
IP	Récepteur I ₂ des prostaglandines
IP ₃	Inositol triphosphate
IRL-1620	Agoniste sélectif du récepteur ET _B
J-105859	Antagoniste sélectif ET _A
K ⁺	Ions potassiques
KCl	Chlorure de potassium
kDa	KiloDalton
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium
K _{IR}	Canal potassique à rectification entrante

L-NMMA	NG-monométhyl-L-arginine
LU135252	Antagoniste sélectif ET _A
MCT	Monocrotaline
Mg ²⁺	Ions magnésium
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MH	Maladie de Hirschprung
mM	Milimolaire
MMP-2	Métalloprotéase matricielle de type-2
N ₂	Azote
Na ⁺	Ions sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
Na ₂ HPO ₄	Phosphate de sodium
Na ₃ VO ₄	Sodium de vanadate
NEP	24.11 endopeptidase neutre
nM	Nanomolaire
nNOS	Synthétase neuronale de monoxyde d'azote
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Synthétase de monoxyde d'azote
NSCC	Canaux cationiques non-sélectifs
NYHA	<i>New york heart association</i>
O ₂	Oxygène
ON	Oligonucléotide
PBS	Tampon phosphate
PD	Phosphodiester
PD145065	Antagoniste sélectif ET _A
PD156707	Antagoniste sélectif ET _A
PDE-5	Phosphodiesterase de type 5

PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGF- α	Récepteur α du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGF- β	Récepteur β du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PIP ₂	Phosphoinositol biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
preproET	Prépro endothéline
PSS	Solution saline physiologique
PTO	Phosphorothioate
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RCS	Substance constrictrice de l'aorte de lapin
RE	Réticulum endoplasmique
REACH	<i>Research on endothelin antagonists in chronic heart failure</i>
R-ET _A	Récepteur A de l'endothéline
R-ET _B	Récepteur B de l'endothéline
ROC	Canaux calciques activés par un récepteur
ROS	Espèces oxygénées radicalaires
RS	Réticulum sarcoplasmique
RVP	Résistance vasculaire pulmonaire
S6	Sarafotoxine
S6c	Agoniste sélectif ET _B
Sc-ET _A	Séquence <i>scrambled</i> dirigée contre le récepteur A de l'endothéline
Sc-ET _B	Séquence <i>scrambled</i> dirigée contre le récepteur B de l'endothéline
SERCA	Pompe calcique du réticulum sarcoplasmique

SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SK _{ca2+}	Canal potassique à petite conductance
SNE	Système nerveux entérique
SOCC	<i>Store operated calcium channel</i>
STRIDE	<i>Siatxsentan to relieve impaired exercise</i>
T1R	Récepteur du goût
TAK-044	Antagoniste double des récepteur à l'ET
TCW	<i>Time to clinical worsening</i>
TFA	Acide trifluoroacétique
TGF- β	Facteur de croissance β
TP	Récepteurs du thromboxane
TP α	Récepteur alpha du thromboxane
TP β	Récepteur bêta du thromboxane
TxA ₂	Thromboxane A ₂
μ M	Micromolaire
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR-2	Récepteur de type 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIC	<i>vasoactive intestinal contractor</i>
VOCC	Canaux calciques activés par le voltage
WHO	<i>World health organisation</i>
WP	<i>Wedge pressure</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

*Cette thèse est dédiée à mon amoureux
Stéphane sans qui je ne serais pas où j'en
suis aujourd'hui*

Remerciements

Je désire tout d'abord remercier mon amoureux *Stéphane Krummen* sans qui cette expérience aurait été très différente. Il représente pour moi un homme exceptionnel, un scientifique remarquable et un meilleur ami indispensable. Lors des moments difficiles, il m'a redonné confiance en moi, m'a obligé à persévérer et m'a toujours poussé à me surpasser afin d'en arriver où j'en suis aujourd'hui. Il a contribué en grande partie à la femme et à la scientifique que je suis devenue suite à ces cinq années d'études supérieures. C'est la fin d'un doctorat mais le début d'une toute nouvelle vie. Avec sa présence à mes côtés, je suis prête à affronter l'avenir.

Un merci tout spécial à *Lorraine* et *Normand Sauvageau*, ma mère et mon père, qui m'ont donné leur soutien tout au long de mes études graduées. Ils m'ont inculqué des valeurs essentielles telles que la persévérance et la confiance en soi qui font de moi la femme que je suis aujourd'hui.

Je remercie également *Michèle Carsuzaa* pour sa grande écoute et ses nombreux encouragements.

Je voudrais remercier le *président rapporteur* ainsi que les *membres de jury* pour leur collaboration à l'évaluation de cette thèse de doctorat ainsi que pour leur participation à la soutenance.

Je voudrais remercier mes deux directeurs de recherche soit le *Dr Jocelyn Dupuis* et le *Dr Éric Thorin*:

Je remercie le *Dr Jocelyn Dupuis* qui m'a accueilli dans son laboratoire de recherche il y a déjà maintenant cinq ans. Il a été pour moi, tout au long de mes études

supérieures, une ressource scientifique inépuisable. Il m'a transmis non seulement sa passion pour la recherche mais aussi pour le système endothéline et la circulation pulmonaire. Il est un scientifique accompli, un homme intègre et juste pour qui j'ai beaucoup d'admiration.

Je remercie également le *Dr Éric Thorin*, un homme qui selon moi possède un esprit scientifique vif et aiguisé. Malgré nos différentes personnalités j'ai beaucoup appris de cet homme autant d'un point de vue scientifique que personnel.

Le *Dre Nathalie Trescasse* a été longtemps pour moi une personne timide et réservée. Pourtant, j'ai découvert que nous avons bien des points en commun. Elle a été d'un grand soutien et d'une grande écoute durant la dernière année de mes études de doctorat et je crois sincèrement qu'elle est une femme et une scientifique remarquable.

Je voudrais aussi remercier mes collègues de laboratoire:

Marie-Ève Gendron a été mon amie, ma confidente ainsi que ma compagne de tous les jours. Nous avons passé de bons moments ensemble durant ces cinq dernières années. Nous avons eu des conversations de tout genre et très certainement des fous rires que nous seules pouvions comprendre. Je ne m'inquiète guère pour elle puisqu'elle sait faire sa place.

Je remercie *Annick Préfontaine* qui a été une amie et une confidente tout au long de mes études des cycles supérieures. Elle est une personne avec qui il a été facile de discuter et travailler et bien sûr rigoler. J'espère sincèrement que nous pourrons conserver notre amitié au fil du temps.

Emma Dedelis s'est jointe à l'équipe du Dr Dupuis au courant de ma dernière année de doctorat. Toujours joviale et énergique, elle est une personne agréable avec laquelle il a été facile de discuter et travailler.

Bao Jiuang est une stagiaire post-doctorale qui s'est jointe au laboratoire du Dr Dupuis il y aura bientôt deux ans. Elle est une personne timide et réservée tout en étant sympathique et extrêmement travaillante.

Guillaume Voghel est la personne que je connais depuis le plus longtemps dans le laboratoire puisque nous avons effectué la majorité de nos études supérieures ensemble. Il demeure pour moi une personne mystérieuse que j'aurais aimé mieux connaître. Une chose est certaine, il est à sa place dans le domaine de la recherche puisqu'il possède une passion évidente pour celle-ci.

Annick Drouin est une personne loyale et dévouée. Au cours des dernières années, j'ai pu observer son épanouissement tant sur le plan scientifique que personnel. Elle a pris confiance en elle et a su faire sa place et j'en suis très fière.

Nada Farhat est une personne serviable et aimable sur qui nous pouvions toujours compter pour des conseils techniques. Elle débute son doctorat et c'est sans aucun doute que j'affirme qu'elle saura trouver sa place dans le domaine de la recherche.

Je voudrais également remercier *Louis Villeneuve* et *Maya Mamarbachi* pour leur participation à l'obtention et à l'analyse de certains des résultats présentés dans cette thèse de doctorat

Un merci particulier à *Jocelyn Avon*, technicien en informatique, sans qui la majorité de mes ordinateurs n'auraient pas survécu jusqu'à la fin de mes cycles supérieurs.

Je voudrais enfin remercier la *Fondation des Maladies du Cœur du Canada* pour le soutien financier accordé à ce projet de thèse.

1 Introduction

1.1 Circulation pulmonaire

Jusqu'au XVI^e siècle, on croyait que le sang circulait d'un côté à l'autre du cœur en s'écoulant par des pores de sa paroi médiane, le septum auriculo-ventriculaire. Nous savons aujourd'hui que les passages du cœur ne sont pas horizontaux mais bien verticaux. En fait, le cœur est composé de deux pompes adjacentes qui desservent chacune un circuit distinct (Figure 1). Les vaisseaux responsables du transport du sang entrant et sortant des poumons forment la circulation pulmonaire.

La circulation pulmonaire est une circulation à haut débit et à basse pression tout en étant un système à haute compliance. Elle permet au sang d'entrer en contact avec les alvéoles des poumons de manière à permettre les échanges gazeux.

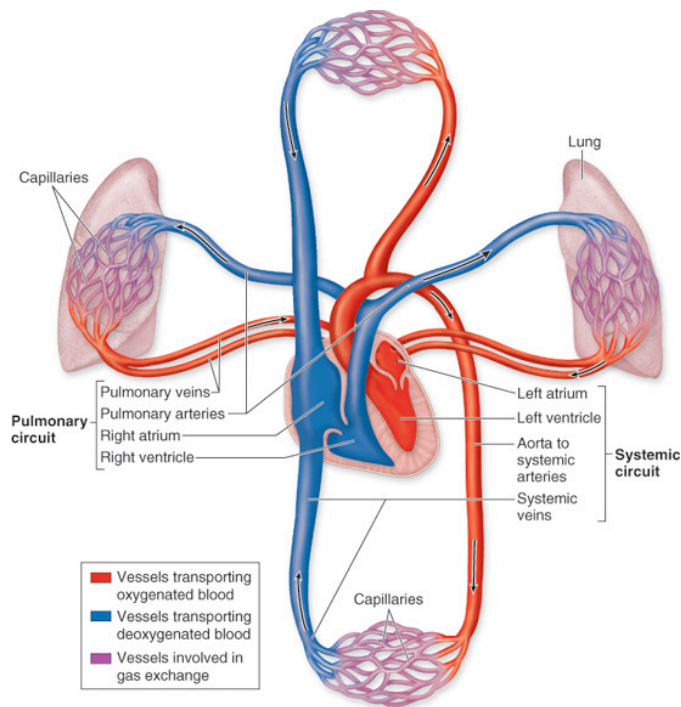


Figure 1. Représentation schématisée des circulations systémique et pulmonaire (<http://academic.kellogg.cc.mi.us>)

La circulation pulmonaire possède plus d'une particularité. En effet, la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) représente le 1/10 de la résistance vasculaire retrouvée dans la circulation systémique. Ainsi, sa faible résistance permet à cette circulation de protéger la barrière capillo-alvéolaire des hautes pressions intra-vasculaires qui autrement favoriseraient la formation d'œdèmes alvéolaires. De plus, contrairement à la circulation systémique, la circulation pulmonaire est dilatée de façon maximale en condition basale. Par ailleurs, le mécanisme autorégulateur est inversé dans la circulation pulmonaire car une faible concentration d'oxygène (O_2) y cause une vasoconstriction des artérioles alors qu'une forte concentration d' O_2 y provoque plutôt une vasodilatation. Ce phénomène est parfaitement adapté puisque lorsque les sacs alvéolaires sont remplis d'air riche en O_2 , les capillaires pulmonaires se gorgent de sang et sont prêts à recevoir l' O_2 . Par contre, si les sacs alvéolaires sont affaissés ou obstrués par du mucus, la concentration d' O_2 baisse dans la région et le sang la contourne.

L'information présentée dans les sous-sections subséquentes (anatomie et pression pulmonaire) a été tirée du *Guyton et Hall* (10^{ième} édition, 2000).

1.1.1 Anatomie

Vaisseaux pulmonaires

Au niveau du ventricule droit, l'artère pulmonaire se divise en deux troncs principaux soit la branche droite et la branche gauche qui permettent l'apport de sang aux deux poumons (Figure 2). Dans les poumons, les deux artères se scindent en plusieurs branches qui desservent les lobes pulmonaires. Après avoir longé les bronches principales, ces branches se ramifient en de nombreuses artérioles pour finalement produire les réseaux denses de capillaires qui entourent les alvéoles. Les lits capillaires pulmonaires s'écoulent dans les veinules pour finalement se réunir et former les deux veines pulmonaires de chaque poumon. Les quatre veines pulmonaires déversent leur contenu dans l'oreillette gauche. Les artères pulmonaires transportent le sang pauvre en O_2 mais riche en CO_2 alors que les veines transportent le sang riche en O_2 mais pauvre en CO_2 . La paroi de l'artère

pulmonaire est mince mais elle représente environ le double de l'épaisseur de la veine cave et le 1/3 de celle de l'aorte. Les artères pulmonaires sont extrêmement courtes et les petites artères ainsi que les artérioles possèdent un plus grand diamètre que leurs équivalentes systémiques. La grande complaisance de cette circulation qui est environ de 7 ml/mm Hg (valeur similaire à la circulation systémique entière) est en grande partie expliquée par le fait que les vaisseaux pulmonaires sont minces et très extensibles. Cette complaisance permet à la circulation pulmonaire d'accommoder environ le 2/3 de l'éjection du ventricule droit.

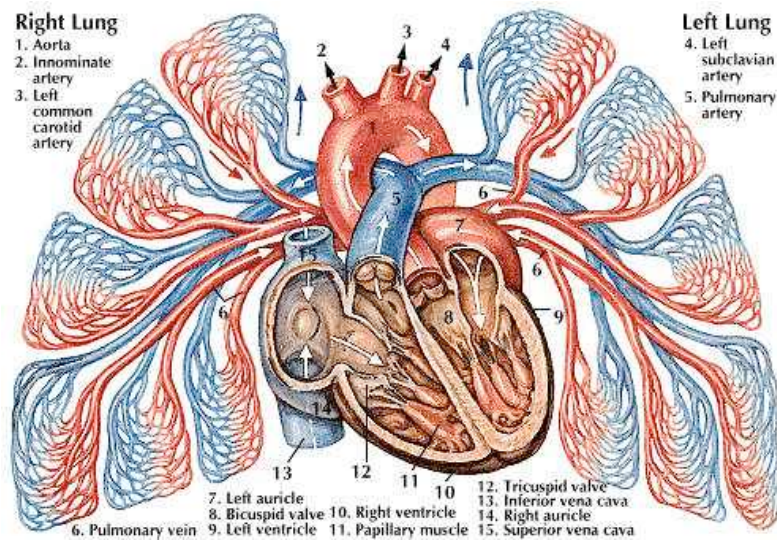


Figure 2. Anatomie de la circulation pulmonaire (www.images.google.ca)

Circulation bronchique

Le sang circule à travers les poumons via de petites artères bronchiques qui proviennent de la circulation systémique. Les artères bronchiques contiennent du sang oxygéné qui alimente les tissus pulmonaires tels que les tissus conjonctifs, le septum ainsi que les petites et grandes bronches. Lorsque le sang artériel et bronchique a traversé les tissus conjonctifs, il se déverse dans la veine pulmonaire et pénètre l'oreillette gauche.

Vaisseaux lymphatiques

Les vaisseaux lymphatiques s'étendent autour des tissus de support en commençant par l'espace de tissus connectifs entourant les bronches puis traversent l'hilum des poumons et achèvent leur course dans le conduit lymphatique droit. Les particules qui entrent dans les alvéoles ainsi que les protéines qui s'échappent des capillaires sont principalement expulsées par les canaux lymphatiques permettant ainsi la prévention de l'œdème pulmonaire.

1.1.2 Endothélium vasculaire pulmonaire

Comme au niveau de la circulation systémique, la paroi des artères et des veines de la circulation pulmonaire est composée de trois tuniques soit l'intima, la media et l'adventice.

La tunique interne est formée d'un endothélium qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux sanguins. Il est stratégiquement situé afin de séparer le compartiment intravasculaire (sang) du compartiment interstitiel et des cellules musculaires lisses. D'un point de vue de son nombre de cellules (6×10^{13}), de son poids (1.5 kg) et de sa taille (1000 m²), l'endothélium est reconnu comme étant le plus grand organe autonome du corps humain (McHugh et al, 1998). Autrefois, l'endothélium était considéré comme rien de plus qu'une simple barrière sélective permettant la diffusion de macromolécules de la lumière des vaisseaux sanguins vers l'espace interstitiel. Toutefois, durant les 25 dernières années, plusieurs découvertes ont permis de démontrer que ses actions autocrines et paracrines jouent un rôle clé au niveau de la régulation du débit sanguin, de la coagulation sanguine, de l'adhésion des leucocytes, ainsi que de la croissance des cellules musculaires lisses (Pechanova et al, 2007). L'endothélium permet la synthèse et la relâche de nombreuses substances vasodilatatrices (Chen et al., 1988; Furchgott et al., 1980) et vasoconstrictrices (Piper et al., 1969; Yanagisawa et al., 1988b) qui régulent le tonus vasculaire.

1.1.2.1 Agents vasodilatateurs

Les stimuli mécaniques tels que la pression et les forces de cisaillement ainsi que certains stimuli hormonaux entraînent la relâche d'agents vasodilatateurs dépendants de l'endothélium communément appelés EDRF (*endothelium derived relaxing factors*) (Pechanova et al., 2007) (Figures 3 et 4).

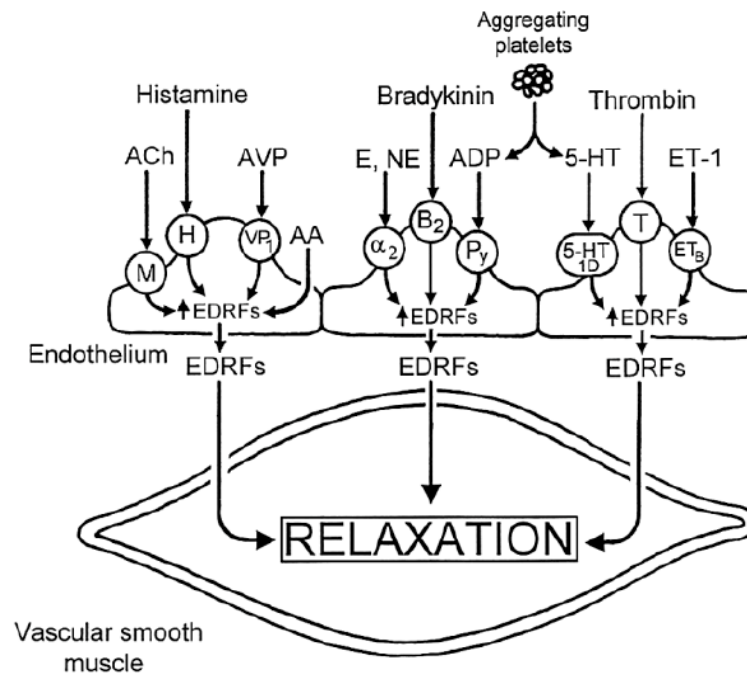


Figure 3. Quelques-uns des médiateurs hormonaux entraînant la relâche d'EDRF via l'activation de récepteurs spécifiques à l'endothélium (Vanhoutte., 2003)

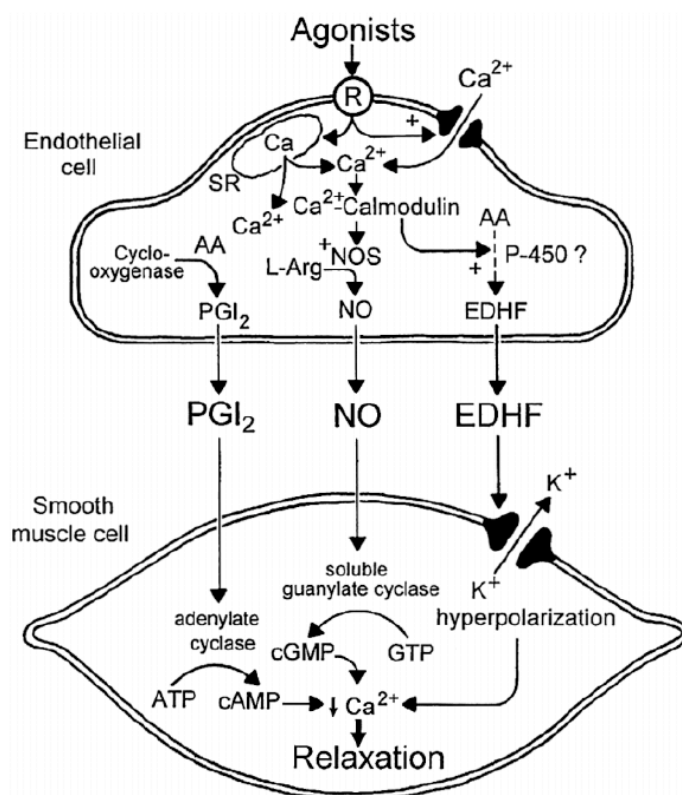


Figure 4. Sécrétion et mécanismes d'action des substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium (Vanhoutte., 2003)

1.1.2.1.1 Monoxyde d'azote

La découverte du NO a été considérée, durant la deuxième portion du 20^{ième} siècle, comme la plus grande trouvaille en biologie vasculaire pour laquelle les investigateurs Furchgott et Zawadski ont reçu le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1998. C'est au tout début des années 70 que Furchgott et Zawadski ont débuté leurs études sur l'acétylcholine (Ach) et ses effets vasculaires (Furchgott et al., 1980). En effet, ils ont remarqué que lorsque l'aorte thoracique de lapin était dénudée de son endothélium, l'Ach entraînait une vasoconstriction du muscle lisse. Au contraire, en présence de l'endothélium, l'Ach produisait une vasorelaxation du muscle lisse. Cette relaxation pouvant être inhibée

par l'addition d'atropine, ils ont proposé que l'Ach, en agissant sur ses récepteurs endothéliaux, induisait la relâche d'une substance ayant la capacité de diffuser jusqu'au muscle lisse pour induire une vasorelaxation. C'est en 1988 que Palmer et ses collaborateurs ont observé que l'EDRF relâché par la cellule endothéliale était en fait le NO (Palmer et al., 1988).

Le NO est un gaz hautement diffusible possédant une demie-vie de 3 à 5 secondes. Il est produit à partir de l'extrémité guanidine de l'acide aminé L-arginine par l'action de trois isoformes de la NO synthétase soit les formes neuronale (nNOS), inducible (iNOS) et endothéliale (eNOS) (Figure 6) (Moncada et al., 1991; Pollock et al., 1991). La nNOS et la eNOS sont toutes deux considérées comme étant des formes constitutives exprimées et activées par une entrée de calcium (Ca^{2+}) dans la cellule (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1988) alors que la iNOS est Ca^{2+} -indépendante et est synthétisée durant le processus inflammatoire par diverses cytokines et endotoxines (Marletta et al., 1988; Szabo et al., 1995). En condition physiologique, la eNOS est la principale isoforme exprimée dans les cellules endothéliales produisant du NO en faibles concentrations (nano molaires). Elle est activée et régulée par la contractilité du cœur et est exprimée au niveau de l'endothélium de l'endocarde, de la circulation coronarienne, des myocytes cardiaques et des tissus de conduction spécialisés (Balligand et al., 1995; Schulz et al., 1991). L'expression de la iNOS est associée à des dommages cellulaires et inflammatoires (Radomski et al., 1995). Cette isoforme peut produire de fortes concentrations de NO (micro molaires) durant de longues périodes pouvant durer jusqu'à 5 jours. L'expression de la iNOS est induite par les cytokines dans les myocytes cardiaques, l'endothélium endocardique, les cellules inflammatoires, les cellules musculaires lisses vasculaires, les fibroblastes et l'endothélium micro vasculaire (Balligand et al., 1994; Balligand et al., 1995; Schulz et al., 1992). Toutefois, les trois isoformes de la NOS requièrent, afin d'avoir une activité optimale, la présence de plusieurs cofacteurs soient le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), le 5, 6, 7, 8-tétra-hydrobiopterine (BH4), la flavine adénine dinucléotide (FAD) ainsi que la flavine mononucléotide (FMN) (Cosentino et al., 1999).

En condition basale, les forces de cisaillement et le débit sanguin sont tous deux des stimuli majeurs qui entraînent la relâche du NO. De plus, celui-ci peut être synthétisé et relâché par la stimulation de certains agonistes tels que la bradykinine (BK), l'histamine, la sérotonine, la thrombine et bien sûr l'Ach (Figure 5). L'Ach et les forces de cisaillements entraînent une augmentation de l'activité de la eNOS via la phosphorylation du résidu sérine 1179 par Akt (Dimmeler et al., 1999). Cette phosphorylation conduit à la dissociation de la eNOS de la membrane plasmique ainsi que son activation (Dimmeler et al., 1999). Toutefois, la eNOS peut aussi être activée par des voies Akt-indépendantes. En effet, certains agonistes bêta-adrénergiques peuvent favoriser l'activation de celle-ci via l'augmentation des niveaux de 3'5' adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et via l'activation de la protéine kinase A (PKA) (McDaniel et al., 1994). De plus, la HSP90 (*heat shock protein*) peut aussi favoriser la dissociation de la eNOS de la cavéoline entraînant ainsi son activation (Garcia-Cardena et al., 1998; Gratton et al., 2000). Le NO est synthétisé au niveau du cytosol des cellules endothéliales et diffuse jusqu'aux cellules musculaires lisses où il se lie à la guanylate cyclase soluble (GCs) qui catalyse la production de 3'5' guanosine monophosphate (GMPc) entraînant éventuellement une réduction des niveaux calciques. Cette baisse de Ca^{2+} produit une réduction au niveau de la cellule musculaire lisse de la formation du complexe Ca^{2+} -calmoduline sur la chaîne légère de myosine. Ceci provoque la phosphorylation de cette dernière favorisant ainsi une vasorelaxation. Le GMPc réduit l'entrée de Ca^{2+} via l'inhibition directe de canaux calciques voltage-dépendants (Bolotina et al., 1994) et via l'activation d'une protéine kinase G (PKG) dépendante du GMPc. La PKG entraîne la phosphorylation de protéines présentes dans le réticulum sarcoplasmique (RS) incluant les canaux potassiques activés par le Ca^{2+} , le 1, 4, 5 inositol triphosphate (IP_3) ainsi que le phospholamban. Le phospholamban favorise la réduction de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire via l'activation de la pompe calcique du RS (SERCA) résultant en une relaxation du muscle lisse (Sanders., 1995).

En plus de ses propriétés vasodilatatrices, le NO inhibe l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (Radomski et al., 1987a), la prolifération des cellules musculaires lisses, l'adhésion des monocytes et l'expression de différentes molécules d'adhésion (Radomski et

al., 1987c;Radomski et al., 1987b) (Boulanger et al., 1990;Boulanger et al., 1991) (Figure 5). Le NO est également en mesure de neutraliser les effets de certains vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II (ANGII) (Zhou et al., 2004), les espèces oxygénés radicalaires (ROS) et l'ET-1 (Boulanger et al., 1990;Boulanger et al., 1991).

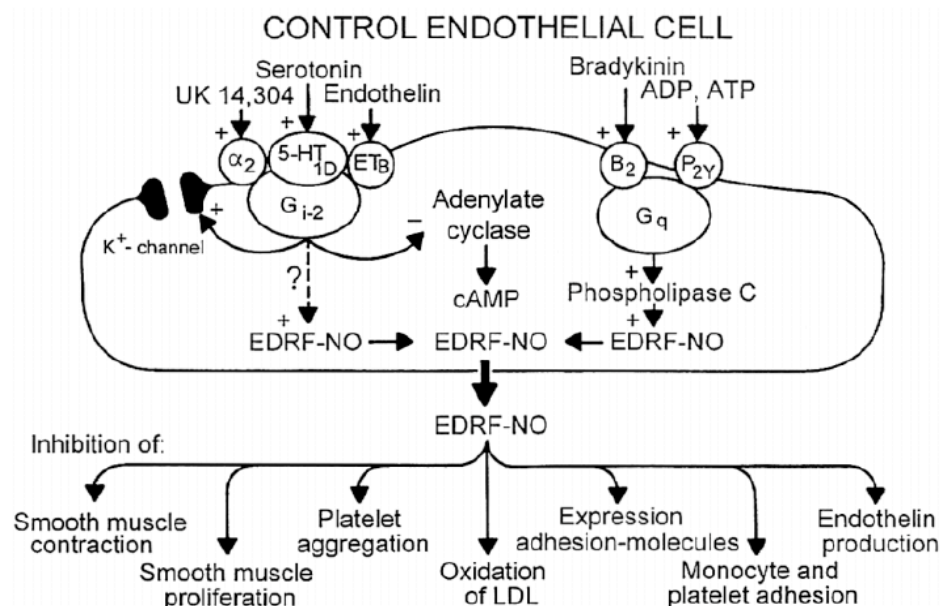


Figure 5. Les différents agonistes et les différentes voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la relâche de NO par la cellule endothéliale (Vanhoutte, 2003)

1.1.2.1.1.1 Interaction entre le monoxyde d'azote et l'endothéline-1

L'ET-1 sera abordée plus amplement dans une section subséquente. Il est toutefois important de mentionner qu'il existe une interaction entre celle-ci et le NO. Cette interaction pourrait jouer un rôle clé dans la balance entre les influences vasodilatatrice et vasoconstrictrice qui agissent sur les cellules musculaires lisses. En effet, plusieurs études ont démontré que le NO peut, en condition physiologique, inhiber l'action et la production de l'ET-1. Plusieurs effets induits par l'ET-1 sont révélés lors de la suppression du NO. Par exemple, la dénudation de l'endothélium d'artères coronaires de porc a induit une

augmentation de la vasoconstriction induite par l'ET-1 (Suzuki et al., 1991). De plus, Luscher *et al* ont démontré que la dénudation de l'endothélium d'artères humaines favorise l'augmentation de la vasoconstriction dépendante de l'ET-1. Au contraire, la contraction induite par l'ET-1 est inhibée par la relâche de NO induite par une administration d'Ach, une application directe de NO ou encore une administration d'un donneur de NO tel que le nitroprussiate de sodium (Luscher et al., 1990). Le NO provoque non seulement une réduction des effets induits par l'ET-1 mais peut aussi influencer la production d'ET-1 (Boulanger et al., 1990; Boulanger et al., 1991). En effet, la production d'ET-1 induite par une stimulation à la thrombine est augmentée par le L-NMMA (NG-monométhyl-L-arginine; inhibiteur de la eNOS) et le bleu de méthylène (inhibiteur non-spécifique de la GCs) mais réduite par le 8-bromo-GMPc (analogue non-hydrolysable du GMPc). Ces quelques études ont confirmé l'existence d'une interaction entre le NO et l'ET-1, au sein de laquelle le NO agit comme mécanisme de protection contre une vasoconstriction exagérée induite par l'ET-1.

1.1.2.1.2 Prostacycline

La PGI₂ communément appelée prostacycline a été la première substance endothéliale vasoactive découverte au milieu des années 70 par le groupe de recherche de Sir John Vane (Vane., 1971). D'un point de vue physiologique, la PGI₂ est une hormone locale plutôt que circulante puisque les concentrations retrouvées au niveau plasmatique sont beaucoup trop faibles (3 pg/ml) pour avoir un effet généralisé sur la circulation (Vane et al., 1990). Conséquemment, la PGI₂ relâchée par les cellules endothéliales affecte l'environnement local. Tout comme le NO, la PGI₂ est une hormone cardio-protectrice et ses principaux effets sont: la prévention de l'agrégation plaquettaire, la réduction du risque de thrombose, la vasorelaxation et la réduction du remodelage des cellules musculaires lisses (Nakayama., 2006).

La synthèse de la PGI₂ implique trois étapes séquentielles dépendantes d'enzymes catalytiques soit: 1) l'activation, par la stimulation d'un agoniste, de la phospholipase A₂

entraînant ainsi la relâche de l'acide arachidonique (AA) de la membrane plasmique, 2) le métabolisme de l'AA par la cyclo-oxygénase (COX) favorisant ainsi la formation de la prostaglandine H₂ (PGH₂) et finalement, 3) un réarrangement enzymatique de la structure de la PGH₂ par la PGI₂ synthétase favorisant ainsi la formation de la PGI₂ (Figure. 6). La PGI₂ est donc un produit de la COX qui est principalement synthétisée par les cellules endothéliales. Il existe deux isoformes de la COX, la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est exprimée constitutivement alors que la COX-2 est induite en condition inflammatoire (Mitchell et al., 2006). En condition physiologique, la COX-1 est le principal isoforme exprimé par les cellules endothéliales (Mitchell et al., 2006). De par leur expression distincte, COX-1 et COX-2 présentent des différences au niveau de leurs mécanismes de régulation, de leurs distributions tissulaires, de leurs spécificités de substrats, de leurs couplages à des enzymes et finalement de leurs susceptibilités d'inhibition par une classe hétérogène d'inhibiteurs des COXs.

La vasorelaxation induite par la PGI₂ est initiée par la stimulation des récepteurs à la prostaglandine I₂ (IP) présents sur les cellules musculaires lisses. Cette liaison favorise l'activation d'une enzyme intracellulaire, l'adénylate cyclase (AC), entraînant ainsi la formation d'AMPc (Gryglewski et al., 1988). L'AMPc favorise la phosphorylation de la PKA qui inhibe la contraction vasculaire en activant deux cibles importantes impliquées dans la mobilisation du Ca²⁺ soit par la phosphorylation du RGS-4 et par l'inactivation du complexe G α q-GTP. De plus, la PKA induit la phosphorylation de la RhoA entraînant ainsi son inactivation et sa translocation au niveau du cytosol et lui interdisant ainsi l'accès à ses substrats soit la Rho kinase et la phospholipase D. L'inhibition de ces deux substrats, habituellement impliqués dans l'inhibition de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine, entraîne la déphosphorylation de cette chaîne et favorise ainsi la relaxation du muscle lisse vasculaire (Murthy et al., 2003).

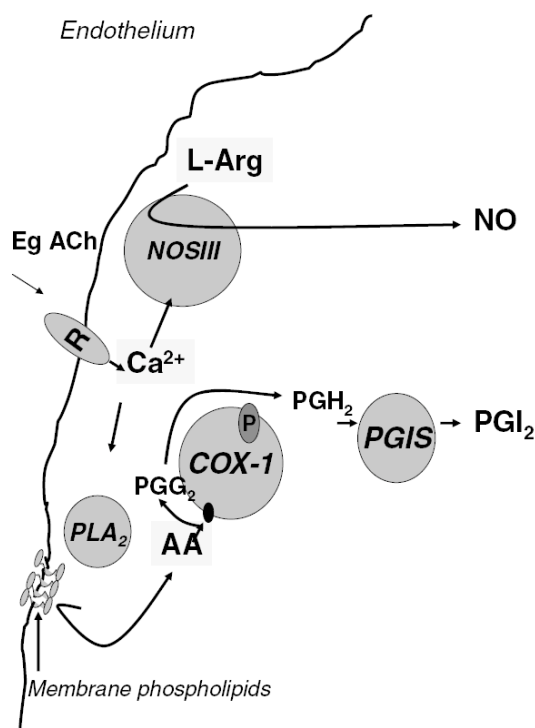


Figure 6. Synthèse de NO et de PGI₂ par les cellules endothéliales (Mitchell et al., 2008)

1.1.2.1.3 Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Une relaxation dépendante de l'endothélium a été observée dans plusieurs vaisseaux sanguins de diverses espèces incluant l'humain et ceci même en présence d'inhibiteurs de la NOS et des COX (Taylor et al., 1988). En effet, certains groupes de recherche ont démontré que l'ACh et la BK induisent une hyperpolarisation du muscle lisse d'artères de chien, de cochon d'Inde et de porc, qui était toutefois indépendante du NO et de la PGI₂ (Feletou et al., 2000). Ces résultats ont permis de suggérer l'existence d'un facteur distinct du NO ou de la PGI₂, pouvant traverser l'espace extracellulaire pour aller moduler le potentiel membranaire des cellules musculaires lisses et ainsi induire une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (Chen et al., 1991; Mombouli et al., 1996). Cette hyperpolarisation a été attribuée à une substance diffusible plus communément appelée EDHF (*endothelium derived hyperpolarizing factor*). L'acronyme EDHF porte à confusion

puisque celui-ci implique qu'une seule et unique substance est responsable de l'hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse. Pourtant plusieurs facteurs dérivés de l'endothélium incluant les ROS, le monoxyde de carbone (CO₂), l'adénosine et divers métabolites de l'AA sont en mesure d'induire une hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse. De façon générale, la réponse induite par l'EDHF inclue une augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire, une ouverture des canaux potassiques de petite conductance (SK_{Ca}) et de conductance intermédiaire (IK_{Ca}) activés par le Ca²⁺ ainsi qu'une hyperpolarisation de la cellule endothéliale (Chataigneau et al., 1998; Gluais et al., 2005). Certaines études ont démontré que l'hyperpolarisation subséquente de la cellule musculaire lisse dépendante de l'endothélium pourrait être provoquée par un couplage électrique direct grâce à des jonctions gap puisque l'utilisation d'inhibiteurs de ces jonctions a réduit ou inhibé la réponse EDHF (Chaytor et al., 2001; Dora et al., 1999; Edwards et al., 1999). Un mécanisme additionnel pouvant être responsable de l'hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse serait l'accumulation d'ions potassiques dans l'espace intercellulaire (Hendrickx et al., 1974). Une activation des pompes Na²⁺/K⁺ ATPase musculaires (Neylon., 1999) et des canaux potassiques à rectification entrante (K_{IR}) (Prior et al., 1998) serait responsable de l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses par les ions potassiques. Dans la majorité des artères étudiées, la contribution de l'EDHF dans la relaxation dépendante de l'endothélium varie en fonction de la taille de l'artère étudiée: l'implication de l'EDHF est plus importante au niveau des artères de résistance (Nagao et al., 1992). La vraie nature de l'EDHF demeure encore à ce jour très incertaine, même si plusieurs candidats ont été proposés tel que les jonctions gap, les acides epoxyéicosatriénoïques, les ions potassiques ainsi que le peroxyde d'hydrogène (Figure 7) (Busse et al., 2002; Feletou et al., 2000; Vanhoutte., 2001)

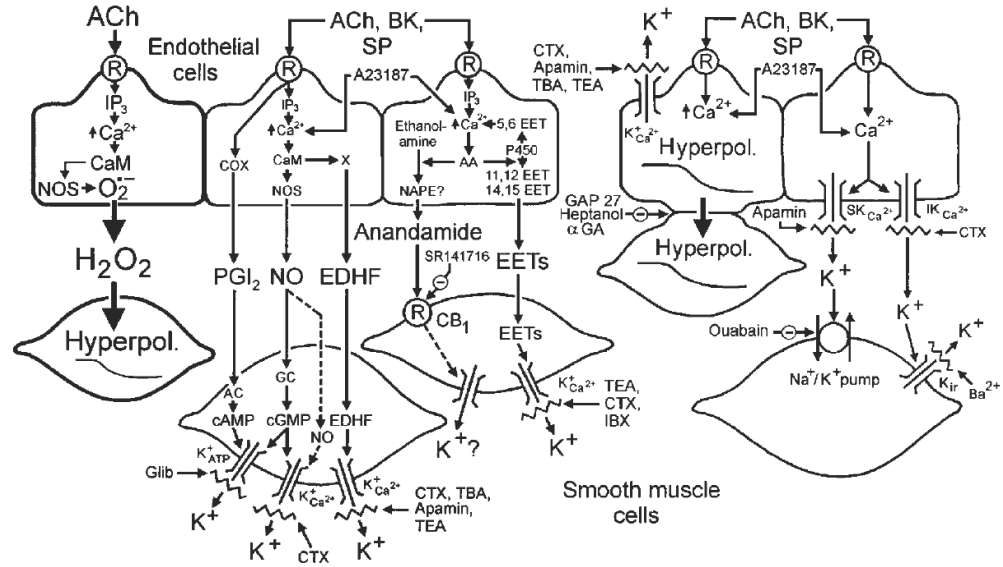


Figure 7. Les multiples mécanismes pouvant entraîner une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (Vanhoutte., 2003)

1.1.2.2 Agents vasoconstricteurs

L'endothélium pulmonaire peut aussi libérer, en plus des facteurs vasodilatateurs, plusieurs facteurs vasoconstricteurs communément appelés EDCF (*endothelium derived contracting factor*) (Figure 8). Parmi ces substances, nous retrouvons le thromboxane A₂ (TxA₂), l'ET-1 et l'ET-3. Dans la présente thèse, nous nous concentrerons d'avantage sur l'ET-1 et l'ET-3 puisqu'ils sont au cœur du sujet de la présente étude.

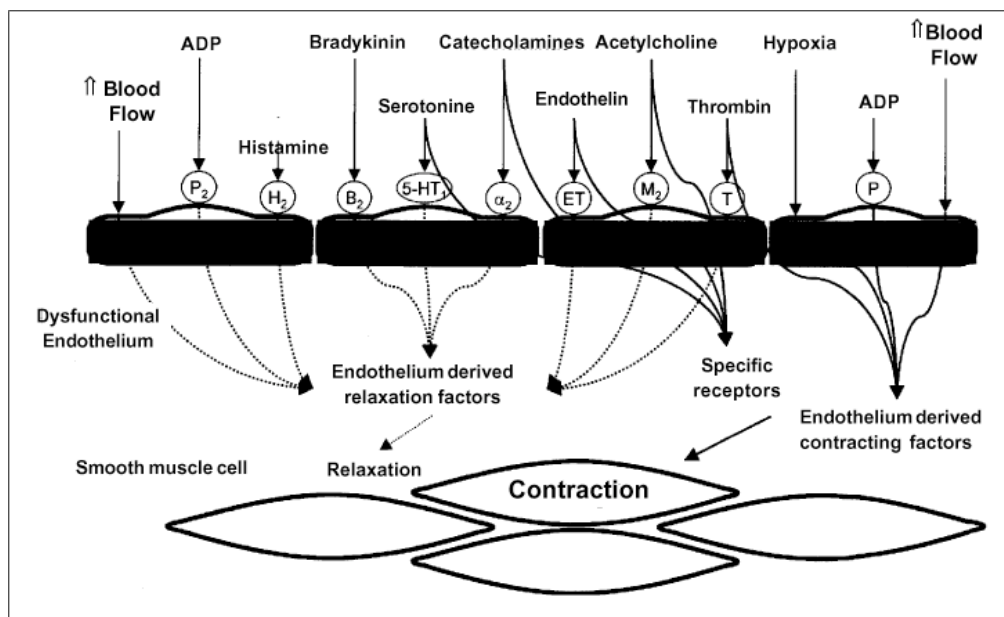


Fig. 2 – Diagram describing the actions of various effectors on dysfunctional endothelium. In the presence of endothelial dysfunction, a reduction in the action of endothelium-derived relaxation factors occurs, with predominance of vasoconstriction (H₂-histamine receptor, α₂-a-adrenergic receptor; 5-HT- serotonergic receptor; B- bradykinin receptor; M- muscarinic receptor; P- purinergic receptor; ET- endothelin receptor; T- thrombin receptor).

Figure 8. Quelques-uns des médiateurs hormonaux entraînant la relâche d'EDCF et d'EDFR via l'activation de récepteurs spécifiques à l'endothélium (<http://www.scielo.br>)

1.1.2.2.1 Thromboxane A₂

C'est en 1969 que Piper et Vane ont découvert, au niveau du poumon du cochon d'Inde, une puissante substance vasoactive libérée en condition anaphylactique (Piper et al., 1969). À cette époque, ils l'ont nommée substance constrictrice de l'aorte de lapin (RCS). Puisqu'il était possible d'inhiber la relâche de RCS à l'aide d'anti-inflammatoires stéroïdien et non-stéroïdien, ils ont conclu que cette substance était apparentée à la famille des prostaglandines. En 1973, Vargaftig et Zirinis ont démontré que la RCS était libérée durant l'agrégation plaquettaire induite par l'AA. L'appellation RCS persista jusqu'en 1975 lorsque Hamberg *et al* ont démontré que celle-ci était en fait une substance biosynthétique instable intermédiaire entre la PGH₂ et le PHD, un métabolite stable maintenant connu sous

le nom de thromboxane B₂. C'est alors qu'ils ont proposé une structure chimique ainsi qu'un nouveau nom, le TxA₂ (Figure 9) (Hamberg et al., 1975).

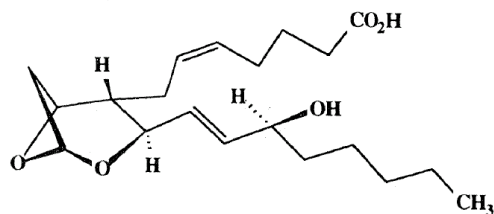


Figure 9. Structure du TxA₂ (Ogletree., 1987)

Le TxA₂ se distingue de son précurseur PGH₂ par sa demi-vie de courte durée (34 secondes versus 5 minutes) ainsi que par sa plus grande puissance vasoconstrictrice. Ce prostanoloïde est libéré principalement par les plaquettes activées (Hamberg et al., 1975) et joue un rôle important dans le contrôle local de l'homéostasie vasculaire (Narumiya et al., 1999). La TxA₂ synthétase est l'enzyme responsable de la conversion de la PGH₂ en TxA₂. Il est très difficile de décrire l'importance physiologique du TxA₂ puisque celui-ci et la PGH₂ possèdent plusieurs activités similaires. Ainsi, les récepteurs par lesquels ces substances induisent leurs actions ont été nommés les récepteurs aux endoperoxydes TxA₂/PG. Lors de la classification des récepteurs aux prostanoloïdes, Kennedy et ses collaborateurs les ont alors renommés les récepteurs de type T Prostanoloïde (TP). Il existe deux types de récepteurs TP soit le récepteur TP α et le récepteur TP β qui font tous deux partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs peuvent s'associer à plusieurs protéines G telles que G_q, G₁₂, G₁₃, G₁₆ et G_{i2}. Ils se retrouvent sur les plaquettes et également sur les cellules endothéliales et musculaires lisses (Halushka et al., 1995). La liaison du TxA₂ à son récepteur entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) et favorise ainsi l'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca²⁺. En situation physiologique, la PGI₂ contrebalance les effets du TxA₂. Toutefois, lors d'un dérèglement de l'homéostasie vasculaire, une augmentation du TxA₂ peut

contribuer au développement de certaines pathologies telle que l'HTAP (Christman et al., 1992).

Ces différents agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium vasculaire et véhiculés par le sang seront en mesure d'influencer les pressions pulmonaires en agissant directement sur le muscle lisse vasculaire.

1.1.3 Les pressions pulmonaires

Pression ventriculaire droite

La pression systolique au niveau du ventricule droit est d'environ 25 mm Hg alors que la pression diastolique a une valeur de 0 à 1 mm Hg. Ces valeurs représentent environ le 1/5 des valeurs retrouvées au niveau du ventricule gauche.

Pression de l'artère pulmonaire

La pression systolique artérielle pulmonaire est d'environ 25 mm Hg alors que la pression artérielle diastolique pulmonaire est de 8 mm Hg. Il en résulte une pression artérielle pulmonaire moyenne de 15 mm Hg.

Pression capillaire

Les échanges d'O₂ et de CO₂ se produisent au niveau des capillaires pulmonaires. Les artéioles pré-capillaires représentent le site de résistance maximale où les premiers changements pathologiques de l'HTP se réalisent. La pression capillaire moyenne est environ de 7 mm Hg. Cette faible pression est très importante pour l'échange des fluides et la prévention de l'œdème pulmonaire. Selon les forces de Starling, la filtration des fluides

dépend de 4 forces, la pression hydrostatique des capillaires (+7 mm Hg), la pression colloïdale osmotique du plasma (-28 mm Hg), la pression négative du fluide interstitiel (-8 mm Hg) et la pression colloïdale osmotique du liquide interstitiel (-14 mm Hg). Ainsi, nous obtenons une pression de filtration qui permet une sortie continue de liquide des capillaires pulmonaires vers l'espace interstitiel. Ce liquide retournera éventuellement à la circulation via le système lymphatique pulmonaire. Tout facteur pouvant mener à une augmentation des pressions colloïdales osmotique interstitielle et hydrostatique des capillaires entraîne une entrée de liquide dans l'espace interstitiel et dans les alvéoles provoquant ainsi un œdème pulmonaire. Il est donc essentiel de préserver l'intégrité de la barrière épithéliale alvéolaire ainsi que l'endothélium des micro-vaisseaux. Les causes les plus fréquentes d'œdème pulmonaire sont des défaillances du ventricule gauche ou encore des pathologies de la valve mitrale. Un dommage à la membrane capillaire pulmonaire par une infection telle qu'une pneumonie peut aussi provoquer une fuite de protéines plasmatiques et donc une perte de liquide au niveau de l'espace interstitiel.

Pression auriculaire gauche

La pression moyenne de l'oreillette gauche et de la veine pulmonaire tourne autour de 2 mm Hg. Il est difficile de mesurer directement la pression auriculaire gauche à l'aide d'un cathéter toutefois celle-ci peut être estimée à l'aide de la WP (*wedge pressure*). Cette dernière est obtenue par l'insertion d'un cathéter au niveau d'une veine périphérique puis à travers le ventricule droit pour atteindre l'artère pulmonaire et finalement pénétrer une des petites artérioles pulmonaires où l'on prend la mesure.

1.2 Hypertension pulmonaire

L'HTP est une pathologie débilante qui est caractérisée par une vasoconstriction exagérée des cellules musculaires lisses, une augmentation de la RVP ainsi qu'une augmentation des pressions pulmonaires menant éventuellement à une défaillance

ventriculaire droite et ultimement à la mort (Farber et al., 2004). Elle est diagnostiquée lorsque la pression artérielle pulmonaire moyenne est au dessus de 25 mm Hg au repos ou au dessus de 30 mm Hg à l'exercice, alors que les pressions ventriculaires gauches sont normales.

1.2.1 Classification

C'est en 1998 que la WHO a proposé un système de classification des différentes formes d'HTP. Cette catégorisation a été basée sur les options thérapeutiques ainsi que sur les similitudes des mécanismes pathophysiologiques et la présentation clinique de la maladie (Fishman., 2004). En 2003, lors de la réunion de la WHO à Venise, plusieurs modifications ont été apportées à ce système de classification afin qu'il devienne plus complet, plus facile à utiliser et plus pratique pour les cliniciens (Figure 10) (Galie et al., 2004). Dans cette thèse de doctorat, nous nous concentrerons sur l'HTAP puisque le modèle animal utilisé dans les études présentées ici est comparable à cette pathologie.

1. Pulmonary arterial hypertension
 - 1.1. Idiopathic
 - 1.2. Familial
 - 1.3. Associated with:
 - 1.3.1. Collagen vascular disease
 - 1.3.2. Congenital systemic-to-pulmonary shunts^a
 - 1.3.3. Portal hypertension
 - 1.3.4. HIV infection
 - 1.3.5. Drugs and toxins
 - 1.3.6. Other (thyroid disorders, glycogen storage disease, Gaucher disease, hereditary hemorrhagic telangiectasia, hemoglobinopathies, myeloproliferative disorders, splenectomy)
 - 1.4. Associated with significant venous or capillary involvement
 - 1.4.1. Pulmonary veno-occlusive disease
 - 1.4.2. Pulmonary capillary hemangiomatosis
 - 1.5. Persistent pulmonary hypertension of the newborn
2. Pulmonary hypertension with left heart disease
 - 2.1. Left-sided atrial or ventricular heart disease
 - 2.2. Left-sided valvular heart disease
3. Pulmonary hypertension associated with lung diseases and/or hypoxemia
 - 3.1. Chronic obstructive pulmonary disease
 - 3.2. Interstitial lung disease
 - 3.3. Sleep-disordered breathing
 - 3.4. Alveolar hypoventilation disorders
 - 3.5. Chronic exposure to high altitude
 - 3.6. Developmental abnormalities
4. Pulmonary hypertension due to chronic thrombotic and/or embolic disease
 - 4.1. Thromboembolic obstruction of proximal pulmonary arteries
 - 4.2. Thromboembolic obstruction of distal pulmonary arteries
 - 4.3. Non-thrombotic pulmonary embolism (tumor, parasites, foreign material)
5. Miscellaneous: Sarcoidosis, histiocytosis X, lymphangiomatosis, compression of pulmonary vessels (adenopathy, tumor, fibrosing mediastinitis)

Figure 10. Classification de l'HTP (Venise 2003) (Puri et al., 2007)

1.2.1.1 Hypertension artérielle pulmonaire

L'HTAP est une pathologie rare et débilitante qui affecte environ 50 000 à 100 000 personnes aux États-Unis. Elle se caractérise par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire en absence d'augmentation des pressions ventriculaires gauches. Il n'existe présentement aucun traitement curatif de cette pathologie toutefois, depuis 1995 il y a eu une explosion de nouveaux traitements qui améliorent la durée et la qualité de vie des patients.

1.2.1.1.1 Contribution génétique et environnementale

Une meilleure compréhension de la prédisposition génétique et environnementale est d'une importance capitale afin d'identifier les racines de la pathogénèse de l'HTAP. L'HTAP idiopathique (HTAPI) est une pathologie extrêmement rare qui frappe de 1-2 /1 000 000 personnes par année aux États-Unis. Elle affecte 2 à 3 fois plus de femmes que d'hommes et l'âge moyen des personnes affectées est de 36 ans. L'HTAPI est une pathologie progressive qui provoque la mort en moyenne 2.8 ans après le diagnostic (Rubin., 1997).

Une étude réalisée par le groupe de Newman a démontré un lien direct entre l'HTAP familiale et une région située sur le chromosome 2 (Newman et al., 2001). En effet, le séquençage du génome des candidats a révélé une mutation hétérozygote du gène impliqué dans le codage du récepteur de type II de la BMP (BMPR-II) qui est un membre de la superfamille des récepteurs du TGF- β (Deng et al., 2000; Lane et al., 2000). Les BMP ont originellement été identifiées comme des molécules responsables de la croissance et de la différenciation des os et du cartilage (Kawabata et al., 1998) toutefois, les BMP sont maintenant considérées comme des cytokines multifonctionnelles biologiquement actives dans divers types cellulaires tels que les monocytes, les cellules épithéliales ainsi que les cellules neuronales (Kawabata et al., 1998). L'activation du BMPR-II permet la régulation de la transcription génique. La présence, à la surface cellulaire, d'un BMPR-II ayant subi une mutation permet tout de même la liaison des BMP mais non la signalisation intracellulaire qui accompagne habituellement cette liaison. Donc, l'incapacité du BMPR-II muté à générer les signaux d'inhibition de la croissance cellulaire pourrait contribuer à la prolifération cellulaire anormale observée en condition d'HTPA (Figure 11).

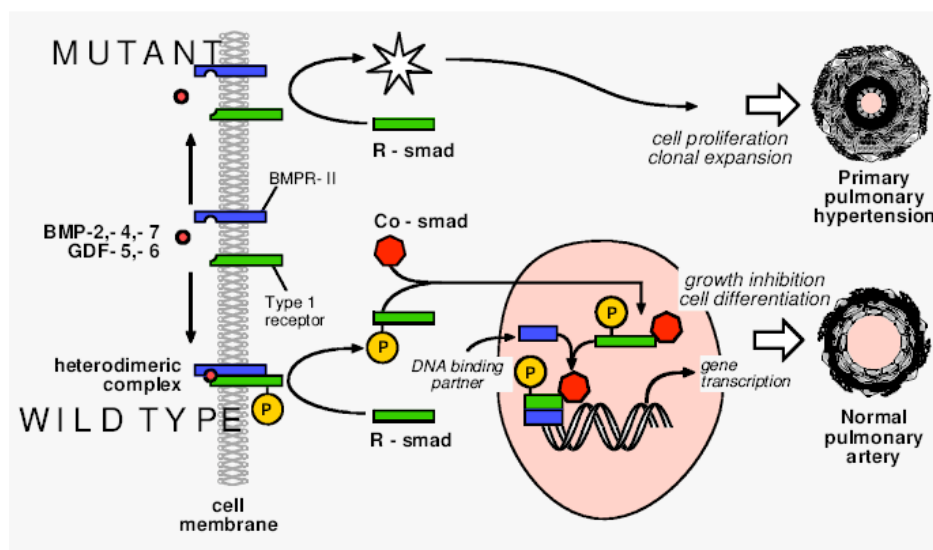


Figure 11. Rôle joué par le BMPR-II dans la circulation pulmonaire (Morrell et al., 2001)

Comme celle du BMPR-II, la voie de signalisation de la sérotonine a été proposée comme pouvant participer au développement de l'HTAPI. Les concentrations plasmatiques de sérotonine sont augmentées chez les patients souffrant d'HTAPI (Herve et al., 1990; Herve et al., 1995). Une étude réalisée par le groupe d'Eddahibi a démontré qu'un pourcentage plus élevé de patients souffrant d'HTAPI (65%) présentait un polymorphisme homozygote pour le promoteur de la sérotonine comparativement aux sujets contrôles (27%). De plus, ils ont prouvé que cette variation génétique entraînait une prolifération plus rapide des cellules musculaires lisses pulmonaires suite à une exposition à la sérotonine. Ainsi, les patients présentant ce polymorphisme seraient plus susceptibles de développer une HTAPI (Eddahibi et al., 2001). Une association positive a aussi été observée chez les patients souffrant d'un défaut plaquettaire congénital impliquant le stockage de la sérotonine et le développement de l'HTAP (Herve et al., 1990).

Il a été suggéré que plusieurs facteurs environnementaux pourraient aussi contribuer à la pathogénèse de l'HTAPI. En effet, une association directe existe entre le développement de l'HTAPI et la consommation de médicaments supprimant l'appétit

particulièrement le groupe des fenfluramine/dexfenfluramine (Abenhaim et al., 1996;Haworth., 1998;Polak et al., 1998). De plus, il existe une prévalence élevée d'HTP (0.5%), semblable à l'HTAPI d'un point de vue pathologique et clinique, chez les patients atteints d'une infection au HIV.

1.2.1.1.2 Pathogénèse

La pathogénèse de l'HTAP est complexe et multi-factorielle. Plusieurs types cellulaires présents dans la paroi des artères pulmonaires et dans la circulation pulmonaire contribuent au développement et au maintien de l'HTAP. L'endothélium vasculaire pulmonaire joue un rôle central dans la perception des différents stimuli nuisibles associés à l'HTAP tels que l'hypoxie, les forces de cisaillement et l'inflammation. Ainsi, le débalancement entre la production et la relâche des différents agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs observé en condition d'HTAP pourrait être la conséquence d'un dommage initial à l'endothélium vasculaire pulmonaire. Certaines études ont toutefois proposé qu'un débalancement au niveau des composantes de la paroi vasculaire tel que les fibroblastes ou encore un débalancement des composantes de la matrice extracellulaire pourraient plutôt être à l'origine du développement de la pathologie (Stenmark et al., 2002). Néanmoins, plusieurs caractéristiques histologiques sont communes à la majorité des types d'HTAP et inclut trois processus majeurs.

En premier lieu, une vasoconstriction exagérée des cellules musculaires lisses résultant d'un débalancement entre la production et la relâche des vasodilatateurs et vasoconstricteurs est observable au niveau de la circulation pulmonaire (Chan et al., 2008;Humbert et al., 2004b) (Figure 12).

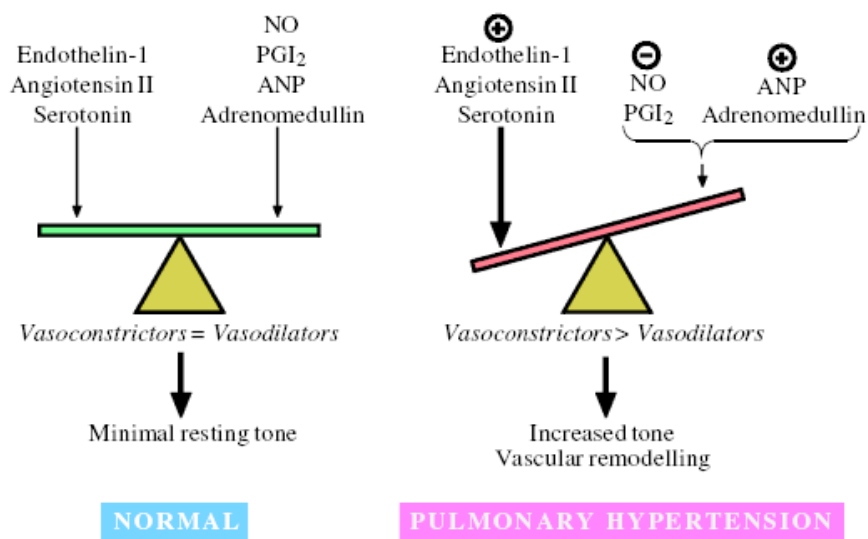


Figure 12. Vasoconstricteurs et vasodilatateurs de la circulation pulmonaire en condition contrôle et en condition d’HTP (Morrell et al., 2001)

Deuxièmement, une prolifération excessive des cellules musculaires lisses et endothéliales se développe, favorisant ainsi un important remodelage vasculaire. Ces modifications morphologiques typiques incluent un développement de la musculature ainsi qu’un épaissement et une fibrose de l’intima des petites artères pulmonaires (<200 μ M) (Figure 13). De plus, le développement d’une musculature dans les artérioles qui n’en présentaient initialement pas est aussi observée (Chan et al., 2008; Humbert et al., 2004b).

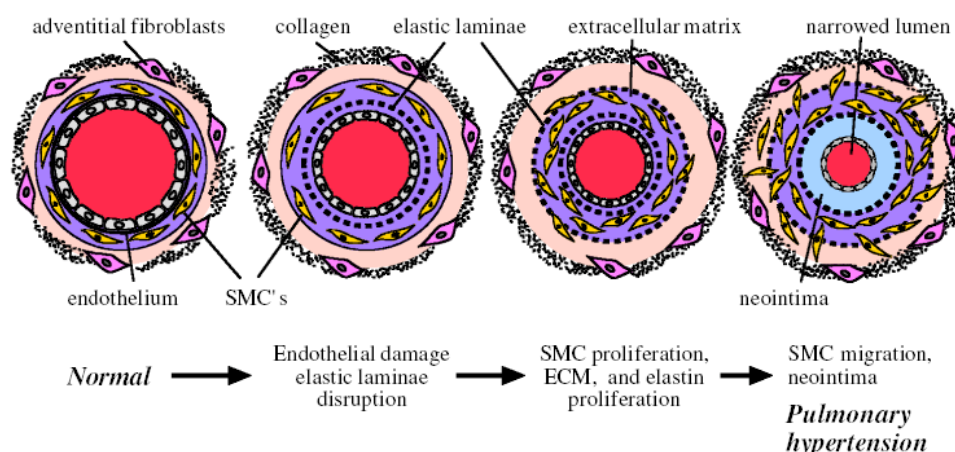


Figure 13. Remodelage vasculaire des artères pulmonaires en condition d'HTAP (Morrell et al., 2001)

Finalement, une coagulation anormale qui résulte en la formation de thrombus *in situ* contribuant à l'augmentation de la RVP est aussi apparente (Chan et al., 2008; Humbert et al., 2004b).

Ces trois processus pathologiques contribueront à la réduction de la lumière des artères pulmonaires et à l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire menant ultimement à l'augmentation des pressions pulmonaires.

Dans les prochaines sous-sections nous présenterons les différents médiateurs impliqués dans la dysfonction endothéliale et conséquemment dans la vasoconstriction exagérée des cellules musculaires lisses pulmonaires.

1.2.1.1.2.1 NO

Les caractéristiques du NO ont été présentées dans une section ultérieure toutefois nous n'avons pas abordé l'implication de cet agent vasodilatateur dans le développement et le maintien de l'HTAP.

Plusieurs études animales ont confirmé l'implication du NO dans le développement et le maintien de l'HTAP. Le groupe de Steudel a démontré que les souris ayant subi une délétion pour le gène de la eNOS étaient plus susceptibles de développer une HTP comparativement aux souris contrôles (Steudel et al., 1997). De plus, une étude complémentaire réalisée par le même groupe de recherche a confirmé que ces mêmes souris développaient une HTP plus sévère suite à une insulte hypoxique comparativement aux souris contrôles (Steudel et al., 1997). La délétion du gène de la eNOS chez des souris mâles et femelles était associée à des caractéristiques histologiques de l'HTAP durant leur développement fœtal et au moment de leur naissance (Miller et al., 2005). De plus, les souris possédant une délétion pour le BH4, un co-facteur nécessaire à l'activité enzymatique de la eNOS, développent une HTP (Nandi et al., 2005).

Plusieurs études ont démontré que le NO joue un rôle important dans la circulation pulmonaire (Zapol et al., 1994) puisque ce dernier est responsable, en condition physiologique, de maintenir de basses pressions pulmonaires. En effet, une étude réalisée par le groupe de Giaid a démontré qu'en condition basale les vaisseaux pulmonaires de patients contrôles présentent une forte expression endothéliale d'eNOS. Alors qu'en condition d'HTAP, une réduction des niveaux d'eNOS a été observée au niveau de ces mêmes vaisseaux (Giaid et al., 1995). De plus, cette réduction d'expression enzymatique corrélait inversement avec la résistance vasculaire pulmonaire.

L'impact du NO a été confirmé par l'efficacité de produits ciblant spécifiquement cette voie dans le traitement de l'HTAP (Barnett et al., 2006). Un inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5 s'avère un traitement efficace de l'HTAP. Nous présenterons de façon détaillée le sildénafil dans une section subséquente.

1.2.1.1.2.2 PGI₂

La PGI₂ a été un des premiers vasodilatateurs endogènes à être associé au développement de l'HTAP.

L'excrétion et la production de la PGI₂ sont réduites chez les patients souffrant d'HTAP (Christman et al., 1992). Cette réduction de la production est la conséquence d'une

réduction de l'expression de la PGI₂ synthase au niveau des petites et moyennes artères pulmonaires. De plus, une réduction de l'expression des récepteurs à la PGI₂ a aussi été observée au niveau des cellules musculaires lisses de patients souffrant d'HTAP (Hoshikawa et al., 2001; Smyth et al., 2002). Ainsi, la PGI₂ s'est avérée la première drogue efficace dans le traitement de l'HTAP. En effet, cette dernière possède deux effets bénéfiques soit l'inhibition de l'agrégation plaquettaire ainsi que l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses pulmonaires, deux processus fortement impliqués dans le développement de l'HTAP.

1.2.1.1.2.3 TxA₂

Tout comme la PGI₂, le TxA₂ est un produit de l'acide arachidonique. Contrairement à la PGI₂, ce dernier stimule l'agrégation plaquettaire et possède des propriétés vasoconstrictrices.

L'excrétion urinaire du métabolite stable de la TxA₂ soit le TxB₂ est augmentée chez les patients souffrant d'HTAP primaire et secondaire (Christman et al., 1992). De plus, une étude réalisée par le groupe de Fike a démontré que l'utilisation du terbogrel, un antagoniste des récepteurs au TxA₂, a entraîné une atténuation du développement de l'HTAP et une augmentation de la réponse à l'Ach chez des cochons hypoxiques (Fike et al., 2005). De façon similaire, l'utilisation d'ozagrel, un inhibiteur de la TxA₂ synthétase, a induit une amélioration des symptômes de patients souffrant d'HTAP (Maruyama et al., 2005).

1.2.1.1.2.4 ET-1

En raison de ses propriétés vasoconstrictrices et pro-mitogéniques, l'ET-1 occupe une place importante dans le développement et le maintien de l'HTAP. Les caractéristiques du système ET ainsi que son implication dans le l'HTAP seront abordées en détail dans la prochaine section.

1.2.1.1.2.5 Facteur de croissance dérivé des plaquettes

Plusieurs données suggèrent que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est impliqué dans l'HTP. Le PDGF possède des propriétés mitogéniques et chémo-attractantes pour les cellules musculaires lisses pulmonaires (Yu et al., 2003). Une augmentation de l'expression des deux récepteurs du PDGF, le PDGF- α et le PDGF- β , est observée chez l'agneau souffrant d'HTP (Balasubramaniam et al., 2003). De plus, l'utilisation de l'antagoniste des récepteurs au PDGF, le ST1571, a entraîné une réduction de la pression ventriculaire droite et de l'hypertrophie ventriculaire droite ainsi qu'une amélioration du taux de survie chez deux modèles animaux d'HTP soit le rat monocrotaline et la souris hypoxique (Schermuly et al., 2005).

1.2.1.1.2.6 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Le facteur de croissance dérivé de l'endothélium vasculaire (VEGF) est le facteur principal de croissance de l'endothélium et il est exprimé de façon très importante dans le poumon. Il est nécessaire au développement et au maintien des structures du poumon (Voelkel et al., 2006). La liaison de l'agoniste à son récepteur à la tyrosine kinase 2 (VEGFR-2) entraîne une augmentation de l'expression de la eNOS ainsi qu'une augmentation de la production de la PGI₂ (Voelkel et al., 2006).

Une étude réalisée par le groupe de Le Cras a démontré que l'utilisation d'un antagoniste du récepteur VEGFR-2, chez des rats nouveau-nés, entraînait le développement d'une HTP et d'une hypertrophie ventriculaire droite (Le Cras et al., 2002). De plus, l'utilisation de ce même antagoniste, le SU-5416, a aussi induit, en condition hypoxique, le développement d'une HTP sévère chez le rat. À l'inverse, l'administration de VEGF chez des agneaux et des rats monocrotalines a favorisé une réduction de la sévérité de l'HTP (Grover et al., 2005).

Il est important de mentionner que chacun de ces médiateurs n'est pas en mesure d'induire, individuellement, le développement d'une HTP. Ainsi, le développement de

l'HTP est la conséquence d'une combinaison de plusieurs facteurs endothéliaux ainsi que d'une prédisposition génétique.

1.3 Système endothéline

En 1985, Hickey et ses collaborateurs ont démontré que l'application d'un milieu de culture obtenu de cellules endothéliales aortiques bovines entraînait une augmentation progressive dose-dépendante de la tension isométrique d'artères coronaires bovine, canine et de porc (Hickey et al., 1985). Toutefois, ce ne fût qu'en 1988 que le groupe de Yanagisawa a finalement isolé ce peptide dans des cellules endothéliales aortiques de porc et ils l'ont par la suite séquencé, cloné et nommé ET-1 (Yanagisawa et al., 1988a). Il existe trois gènes humains distincts pour l'encodage des trois isomères de l'ET soit: 1) la forme classique et prédominante de l'ET (ET-1), 2) l'endothéline-2 (ET-2) ainsi que 3) l'endothéline-3 (ET-3). Il existe aussi une autre ET-1 de 31 acides aminés (Goldie et al., 2000; Kishi et al., 1998) ainsi qu'un quatrième peptide de cette famille cloné chez la souris et nommé ET-4 ou VIC (*vasoactive intestinal contractor*) (Saida et al., 1989).

1.3.1 Endothéline-1

L'ET-1 possède un poids moléculaire de 2492 kilodaltons (kDa), est le seul isoforme synthétisé au niveau de l'endothélium vasculaire (White et al., 1991) et est considéré comme le plus puissant peptide vasoconstricteur du muscle lisse vasculaire. Parmi les différents organes du corps humain, le poumon est considéré comme celui possédant les niveaux les plus élevés d'ET-1 sécrétés (Firth et al., 1992) par l'endothélium, le muscle lisse, l'épithélium aérien ainsi que plusieurs autres types cellulaires. Plusieurs agents peuvent entraîner la libération de ce peptide tels que le TGF- β (*transforming growth factor*), l'angiotensine II (ANGII), l'adrénaline, l'insuline, la vasopressine ainsi que l'interleukine-1 (Figure 8) (Imai et al., 1992; Yoshizumi et al., 1989). Par contre, le NO, les

prostaglandines et le peptide natriurétique de l'oreillette peuvent en réduire la synthèse (Figure 14) (Kramer et al., 1994; Prins et al., 1994). La synthèse et la relâche des ET sont augmentées en conditions pathologiques aiguës et chroniques telles que l'athérosclérose, le cancer, l'hypertension artérielle (HTA) et l'HTP (Battistini et al., 1993).

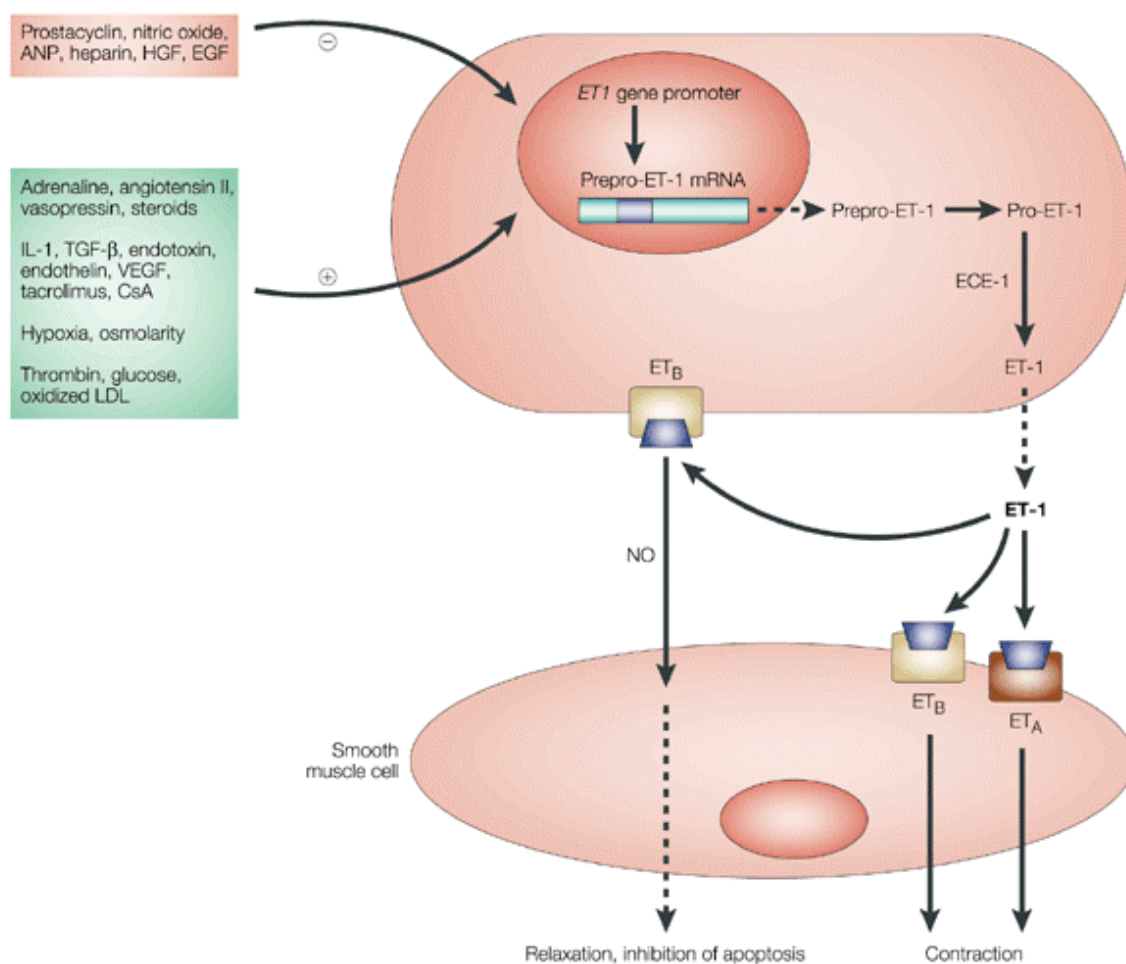


Figure 14. Les agents qui régulent la libération de l'ET-1 (Remuzzi et al., 2002)

1.3.1.1 Biosynthèse et Biochimie

1.3.1.1.1 Structure des membres du système ET

La famille des ET est constituée des trois isoformes d'ET ainsi que de quatre sarafotoxines (S6)(S6a, S6b, S6c, S6d), des peptides cardiotoxiques hautement similaires isolés du venin du serpent *Atractapsis engaddensis* (Figure 15)(Kloog et al., 1988;Kloog et al, 1989). Tous les membres de cette famille possèdent 21 acides aminés. L'ET-2 et l'ET-3 diffèrent de l'ET-1 par la substitution de deux et six aminés. Les ET-1 humaine et porcine possèdent des séquences d'acides aminés identiques. Au contraire, les ET-1 du rat et de l'humain diffèrent pour 6 des 21 résidus d'acides aminés (Bloch et al., 1989b). Il est dorénavant bien établi que le pont disulfure est essentiel à la liaison des ET aux R-ET_A alors que celui-ci est moins crucial pour la liaison aux R-ET_B(Rubanyi et al., 1994).

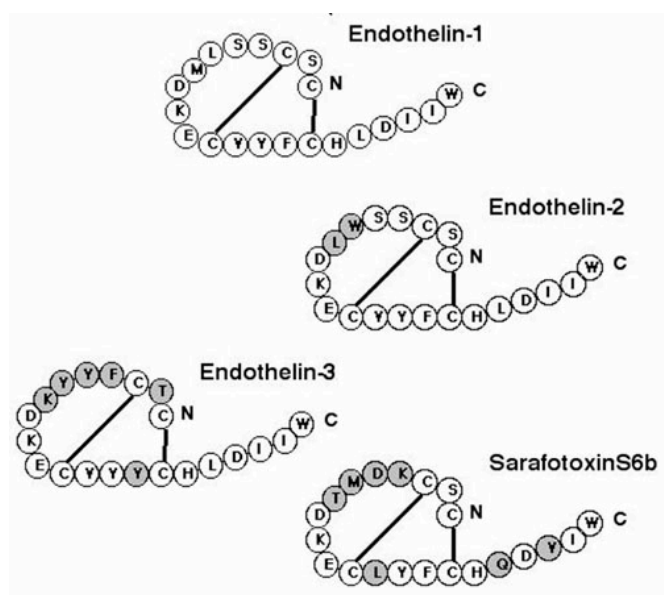


Figure 15. Structure des membres de la famille ET (Barnes., 1994)

1.3.1.1.2 Biosynthèse

La localisation chromosomique du gène pour l'ET-1 a été cartographiée à la région 6p23-24 (Arinami et al., 1991). Les gènes de l'ET-2 et l'ET-3 se retrouvent pour leur part au niveau des chromosomes 1 et 20 respectivement. La biosynthèse des ET ressemble à celle de tout autre peptide biologiquement actif (Arinami et al., 1991). Elles sont initialement synthétisées sous la forme de larges précurseurs inactifs qui sont ensuite clivés à des sites spécifiques permettant la libération des peptides biologiquement actifs. L'ET-1 humaine origine donc d'un précurseur de 212 acides aminés communément appelé preproET-1 (Itoh et al., 1988). La preproET est clivée par des endopeptidases de type furine pour former un intermédiaire biologiquement inactif de 38 acides aminés communément appelé Big ET ou proET. Cette dernière est enfin clivée au niveau de la liaison Trp²¹-Val/Ile²² pour former le peptide final de 21 acides aminés (Kimura et al., 1989). Il a été suggéré que cette dernière étape a lieu au niveau de la membrane plasmique des cellules cibles et est catalysée par des métalloprotéases membranaires à zinc de la superfamille des néprilysines appelées enzymes de conversion de l'ET (ECE) (Turner et al., 1997). Bien que la Big ET-1 possède une activité vasoconstrictrice, celle-ci est 140 fois moins puissante que celle de l'ET-1.

1.3.1.1.2.1 Enzymes impliquées dans la biosynthèse

L'ECE est une métalloprotéase membranaire zinc-dépendante. Il existe trois isoformes de l'ECE soit l'ECE-1, l'ECE-2 et l'ECE-3. L'ECE-1 a été découverte en 1993 et représente l'isoforme la plus importante physiologiquement en raison de son large spectre d'action et d'expression (Takahashi et al., 1993). L'ECE-1 est une métalloprotéase membranaire de type II, métabolisant la Big ET-1 produite de façon endogène ainsi que la Big ET-1 exogène présente sur la surface cellulaire (Yoshioka et al., 1998). L'expression de l'ECE-1 est régulée par des mécanismes dépendants de la protéine kinase C (PKC), par les R-ET_B (Naomi et al., 1998), par des cytokines telles que IL-1, IL-4 et IL-10 (Yoshioka et

al., 1998). Cette enzyme est produite de façon abondante au niveau des cellules endothéliales et autres types cellulaires reconnus pour la relâche d'ET-1 mature. La spécificité de l'ECE-1 pour les différents Big ET est décroissante (Big ET-1 > Big ET-2 > Big ET-3). Quatre isoformes de l'ECE-1 ont été identifiées: L'ECE-1a (Shimada et al., 1995), l'ECE-1b (Shimada et al., 1995), l'ECE-1c (Schweizer et al., 1999) ainsi que l'ECE-1d (Valdenaire et al., 1999). Un seul gène présent sur le chromosome 1 (1p36) est responsable de la synthèse de ces quatre isoformes humains. Ceux-ci diffèrent seulement au niveau de la portion N-terminale qui est responsable de leurs localisations cellulaires respectives. En effet, l'ECE-1a, l'ECE-1c et l'ECE-1d se retrouvent toutes au niveau de la membrane plasmique avec le domaine catalytique orienté vers l'extérieur de la cellule alors que l'ECE-1b est localisée à l'intérieur de la cellule. Certaines études ont toutefois contredit ces données en suggérant plutôt que l'ECE-1b et l'ECE-1d étaient toutes deux localisées au niveau du système endosomal (Muller et al., 2003). Ils ont aussi suggéré que l'ECE-1b serait responsable de l'activité et de la localisation cellulaire des autres isoformes. Plus récemment, le groupe de recherche de Meidan a démontré l'existence d'une variante d'épissage de l'ECE-1 soit l'ECE-1sv au niveau des cellules endothéliales du boeuf. En raison du fait qu'elle ne possède pas de domaine transmembranaire (peptide signal), l'ECE-1sv serait retenue au niveau du cytosol (Klipper et al., 2006). De plus, la présence de cette isoforme dans un compartiment cellulaire distinct de l'ECE-1 pourrait suggérer un rôle physiologique différent de cette protéine.

En 1995, Emoto et Yanagisawa ont identifié l'isoforme ECE-2 (Emoto et al., 1995). Ils ont démontré que l'ECE-2 a un pH optimal plus acide (pH 5.5) que celui de l'ECE-1 (Emoto et al., 1995). L'ECE-2 préfère la Big ET-1 plutôt que les Big ET-2 et Big ET-3. L'ECE-2 possède 59% d'homologie avec l'ECE-1. En 2002, Ikeda *et al* ont identifié quatre isoformes de l'ECE-2 soit: l'ECE-2a-1, l'ECE-2a-2, l'ECE-2b-1 ainsi que l'ECE-2b-2 (Ikeda et al., 2002). L'ECE-2a-1 et l'ECE-2a-2 sont exprimés dans une variété de tissus tels que le foie, le rein, la glande surrénale, les testicules ainsi que les cellules endothéliales alors que l'ECE-2b-1 et l'ECE-2b-2 sont exprimés au niveau du cerveau et de la glande surrénale. Un troisième isoforme de l'ECE soit l'ECE-3, a été identifié au niveau des

microsomes de l'iris de bœuf (Hasegawa et al., 1998). Cet isoforme serait spécifique pour la Big ET-3 et permettrait la formation de l'ET-3 mature (Hasegawa et al., 1998).

Les chymases dérivées des mastocytes pulmonaires de rats (Wypij et al., 1992) et d'humains (Maguire et al., 2004; Nakano et al., 1997) peuvent aussi former l'ET-1 mature (1-21) à partir de son précurseur Big ET. Finalement il a aussi été prouvé qu'une autre enzyme soit une métalloprotéase matricielle de type-2 (MMP-2) possède aussi la capacité de générer l'ET-1 (1-32) à partir des Big ET-1 humaine et de rat (Maguire et al., 2001).

1.3.1.2 Sécrétion de l'ET-1

L'ET-1 est sécrétée préférentiellement (80%) du côté abluminal lui conférant ainsi son activité paracrine et locale alors que seulement 20% de celle-ci est sécrétée du côté luminal (Wagner et al., 1992). Des études de microscopie réalisées au niveau des cellules endothéliales de la veine ombilicale (Russell et al., 1998a) et de l'artère coronaire humaine (Russell et al., 1998b) ont permis de proposer deux voies de sécrétion pour le transport et la relâche d'ET-1, les voies constitutive et induite.

Puisque les cellules endothéliales possèdent peu de granules de sécrétion, Yanagisawa et ses collaborateurs ont stipulé en 1988 que la voie constitutive était responsable de la sécrétion de l'ET par les cellules endothéliales aortiques de porc (Yanagisawa et al., 1988b). En effet, Harrison *et al* ont démontré l'existence de vésicules de transport et de sécrétion de l'ET au niveau des cellules endothéliales aortiques de boeuf prouvant ainsi l'implication de la voie constitutive dans le transport de ce peptide (Harrison et al., 1993). L'ECE et la Big ET ont aussi été retrouvées ensemble dans ces vésicules endothéliales de sécrétion (Barnes et al., 1998). Ces données permettent d'affirmer que la relâche basale d'ET par les cellules endothéliales est probablement effectuée par la voie de sécrétion constitutive.

Par contre, plusieurs évidences semblent aussi indiquer un rôle de la voie de sécrétion induite dans le transport de l'ET. Le groupe de recherche de Russell a émis

l'hypothèse que la Big ET-1 était transformée en ET-1 et emmagasinée dans des vésicules de sécrétion pour être ultérieurement libérée (Russell et al., 1998b; Russell et al., 1998a). Des études morphologiques ont démontré l'existence de granules de stockage communément appelées vésicules de Weibel-Palade qui pourraient être responsables de la sécrétion de l'ET-1 (Weibel et al., 1964).

Il a été proposé dans une étude réalisée par le groupe de Davenport que deux voies distinctes de sécrétion (constitutive et induite) peuvent être utilisées par une même cellule (Russell et al., 1998b). En effet, ils ont suggéré que le transport et la relâche d'ET par les cellules endothéliales coronaires humaines s'effectuaient de façon constitutive à partir de vésicules de sécrétion mais l'ET pouvait aussi être emmagasinée dans les corps de Weibel-Palade et être relâchée en réponse à certains stimuli (Russell et al., 1998b).

1.3.1.3 Clairance de l'ET-1

La clairance par liaison à un récepteur ainsi que la dégradation enzymatique par les endopeptidases semblent être les deux voies métaboliques de l'ET-1. La circulation pulmonaire représente le lit vasculaire clé responsable de la clairance rapide de l'ET circulante. Effectivement, dès 1989, Anggard et ses collaborateurs ont démontré que l'ET-1 exogène, lorsqu'administrée dans la circulation pulmonaire du rat, possédait une demie-vie de seulement 3 minutes (Anggard et al., 1989). D'autres études ont subséquemment prouvé que 60% de l'ET-1 infusée dans le poumon isolé de cochon d'Inde et de rat était extraite lors d'un premier passage pulmonaire (De Nucci et al., 1988). De façon similaire, des clairances de 31% et de 49% lors du premier passage pulmonaire ont été observées chez le chien (Dupuis et al., 1994) et le lapin, respectivement (Rimar et al., 1992). De plus, Dupuis *et al* ont confirmé que l'extraction pulmonaire d'ET-1 chez des volontaires sains était de 47% (Dupuis et al., 1996b). Ces données suggèrent que le pourcentage d'extraction et le métabolisme pulmonaire peuvent varier en fonction de l'espèce étudiée. Ainsi, comme la majorité des autres peptides et hormones, cette clairance est régulée par un récepteur (Anderson et al., 1993; Nussenzveig et al., 1990). Les résultats suivants: (1) la réduction

significative de la clairance et du captage de l'ET-1 au niveau des poumons et des reins par l'administration intraveineuse de l'antagoniste BQ-788 (antagoniste sélectif ET_B), (2) l'absence d'effet d'un antagoniste sélectif ET_A, et (3) la capture de 80% de l'ET-1 marquée à l'iode 125 par les poumons ont permis à plusieurs groupes dont ceux de Fukuroda et Dupuis de démontrer l'importance du R-ET_B dans la clairance rapide de l'ET-1 (Dupuis et al., 1996a; Fukuroda et al., 1994b).

La dégradation enzymatique par des endopeptidases contribue aussi à la clairance de l'ET-1. L'endopeptidase neutre (NEP), localisée dans les vésicules de la bordure du tubule proximal du rein, catabolise l'ET-1. En effet, l'inhibition de cette enzyme induit une augmentation des concentrations plasmatique et urinaire d'ET-1 (Abassi et al., 1992). Une étude réalisée par le groupe de Shi a confirmé la contribution du rein dans la clairance de l'ET-1 chez le rat puisqu'une néphrectomie bilatérale a entraîné une réduction de la clairance d'ET-1 exogène (Shi et al., 1994). De plus, Johnstrom *et al* ont prouvé que cette clairance rénale d'ET était régulée par la liaison à un récepteur puisque l'administration d'un antagoniste sélectif ET_B a favorisé une réduction significative du captage d'ET-1 au niveau du rein (Johnstrom et al., 2005). Les résultats de cette étude ont aussi démontré l'implication du foie dans la clairance de l'ET-1 (Johnstrom et al., 2005).

1.3.1.4 Récepteurs vasculaires à l'ET-1

Maggi *et al* ont été les principaux investigateurs à exécuter les premières études pharmacologiques dans le but de caractériser les récepteurs à l'ET (Maggi et al., 1989). Ils ont confirmé l'existence de deux récepteurs distincts et les ont nommés ET_A et ET_B. Plusieurs groupes ont par la suite cloné ces deux récepteurs chez plusieurs espèces incluant l'humain (Lin et al., 1991) et le rat (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Les récepteurs ET_A et ET_B sont tous deux des récepteurs à 7 domaines transmembranaires hydrophobes couplés aux protéines G. Le R-ET_A humain possède 427 acides aminés et un poids moléculaire de 48, 516 Da alors que le R-ET_B possède 442 acides aminés et un poids

moléculaire de 46, 901 Da (Ozaki et al., 1995). Les gènes pour les R-ET_A et ET_B sont situés sur les chromosomes 4 et 13, respectivement (Masaki., 1995). Il existe une homologie de 58.9% entre ces deux récepteurs (Elshourbagy et al., 1993). L'affinité du R-ET_A pour les endothélines 1 et 2 est plus élevée que pour l'ET-3 alors que le R-ET_B possède la même affinité pour les trois isoformes (Masaki., 1995).

1.3.1.4.1 Distribution des récepteurs ET_A et ET_B

Puisque le poumon est un important site de production et de clairance de l'ET-1, il représente une des cibles les plus importantes des effets induits par ce peptide. Les récepteurs ET_A et ET_B sont largement distribués au niveau pulmonaire, ils y sont exprimés sur les bronches, les alvéoles et les vaisseaux pulmonaires. Au niveau du système respiratoire humain, une forte densité des récepteurs se retrouvent au niveau des cellules musculaires lisses des voies aériennes. Le R-ET_B y est prédominant représentant de 60 à 90% des sites de liaison néanmoins, le R-ET_A est aussi présent (Fukuroda et al., 1996;Goldie et al., 1995). Ces deux récepteurs sont responsables de la contraction des voies aériennes. Plusieurs données suggèrent que la distribution et la proportion des récepteurs ET_A et ET_B varient selon l'espèce (Goldie et al., 1994) et la région des voies respiratoires étudiées (Goldie et al., 1996;Hay et al., 1993). Au niveau des vaisseaux pulmonaires, le R-ET_A est situé majoritairement sur les artères alors que le R-ET_B se retrouve de manière prédominante sur les veines (Moreland et al., 1994). Ainsi, au niveau de la circulation pulmonaire humaine, le R-ET_A est prédominant au niveau des artères de conductance alors que la proportion de R-ET_B augmente au niveau des artères pulmonaires distales (Davie et al., 2002). Les récepteurs ET_A et ET_B sont tous deux exprimés au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires alors que seul le R-ET_B est exprimé au niveau des cellules endothéliales. Au niveau des vaisseaux sanguins et des bronches humaines une deuxième division a été suggérée en ce qui concerne le R-ET_B soit ET_{B1} et ET_{B2} (Hay et al., 1998). Le R-ET_{B1} est principalement retrouvé au niveau des cellules endothéliales et favorise une vasorelaxation alors que le R-ET_{B2} est présent au niveau des cellules musculaires lisses où

il induit une vasoconstriction et une broncho constriction importantes. Toutefois, de récentes études ont démontré que les deux sous-types de récepteur sont codés par un seul et unique gène (Flynn et al., 1998) discréditant ainsi l'existence de plus d'un sous-type de récepteur ET_B.

Les récepteurs ET_A et ET_B sont aussi exprimés dans plusieurs autres types cellulaires. En effet, ils se retrouvent au niveau des cardiomyocytes (Modesti et al., 1999), des myofibroblastes pulmonaires (Prefontaine et al., 2008), des hépatocytes (Housset et al., 1993) ainsi qu'au niveau du rein (Wilkes et al., 1991).

1.3.1.4.2 Voies de signalisation intracellulaire

Les récepteurs ET_A et ET_B sont tous deux capables de coupler plusieurs protéines G (G_q, G_s, G_i, G_o...) suggérant ainsi que la signalisation intracellulaire peut différer selon la protéine G qui est couplée au récepteur. L'ET-1 produit une augmentation bi-phasique des concentrations calciques intracellulaires soit une augmentation rapide et transitoire (2-5 secondes) suivie d'une augmentation soutenue et prolongée (30-60 minutes) (Wright et al., 1988).

Phase rapide et transitoire

- La liaison de l'ET-1 à ses récepteurs induit généralement l'activation de la PLC qui hydrolyse le phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate (PIP₂) pour former l'IP₃ ainsi que le diacylglycérol (DAG) (Resink et al., 1988).
 - L'IP₃ entraîne la mobilisation initiale et transitoire de Ca² via l'activation de récepteurs se trouvant à la surface du RS (Neylon., 1999).

Phase soutenue et prolongée

- La vidange des réservoirs internes de Ca^{2+} entraîne l'augmentation initiale de Ca^{2+} intracellulaire nécessaire à l'ouverture de canaux calciques (SOCC, NSCC) situés à la membrane plasmique permettant ainsi l'entrée subséquente de Ca^{2+} dans la cellule. Pour sa part, le DAG facilite l'ouverture de canaux calciques activés par des récepteurs (ROC).
- L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire peut aussi favoriser une ouverture des canaux chlores (Cl^-) dépendants du Ca^{2+} facilitant ainsi une sortie de Cl^- de la cellule et donc une dépolarisation cellulaire (Simonson et al, 1992).
- L'inhibition par l'ET-1 (Shimoda et al., 1998) des canaux potassiques responsables du potentiel membranaire des cellules musculaires lisses (Archer et al., 2000) entraîne aussi une dépolarisation cellulaire et une entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendants (VOCC)(Weir et al, 1995).
- L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} peut aussi conduire à l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ entraînant l'alcalinisation cellulaire et l'activation subséquente de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Grinstein et al., 1986) en plus de favoriser la relâche de Ca^{2+} du RS via les récepteurs à la ryanodine.

Ainsi, la diversité des signaux calciques activés par l'ET-1 dépendront de l'expression et de la distribution relative des récepteurs ET_A et ET_B (Figure 16).

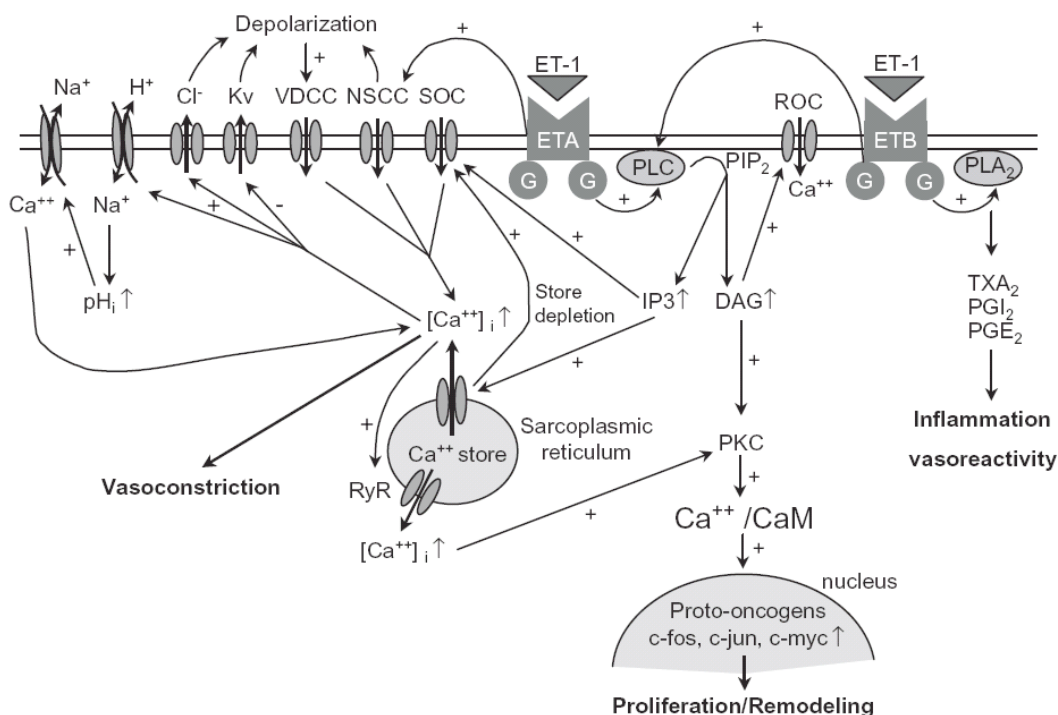


Figure 16. Signalisation intracellulaire responsable de la vasoconstriction et du remodelage vasculaire induit par l'ET-1. (Motte et al., 2006)

1.3.1.4.3 Implication des récepteur ET_B dans les effets délétères induits par l'ET-1

Plusieurs études ont démontré que l'ET-1 était impliquée dans la vasoconstriction (Bonvallet et al., 1994; Yanagisawa et al., 1988b), la prolifération cellulaire (Ohlstein et al., 1992) et la fibrose. Bien que l'implication du R-ET_A dans ces effets délétères ait clairement été prouvée, l'implication du R-ET_B a été beaucoup plus complexe à démontrer. Les effets de l'activation du R-ET_B sur le tonus vasculaire dépendent de la distribution relative des R-ET_B endothéliaux vasodilatateurs et des R-ET_B musculaires lisses vasoconstricteurs. Plusieurs études réalisées chez des volontaires sains ont suggéré que l'activation du R-ET_B endothélial entraînait la relâche de NO et de PGI₂ (De Nucci et al., 1988; Takayanagi et al., 1991; Warner et al., 1989b) de sorte que, les R-ET_B ont été reconnus initialement comme

étant plutôt vasodilatateurs. Pourtant depuis quelques années, la fonction vasodilatatrice du R-ET_B est remise en question. En effet, certaines études cliniques ont démontré que la stimulation du R-ET_B n'entraînait pas de relaxation dépendante de l'endothélium des artères radiale et mammaire humaines, (Liu et al., 1996) et de la circulation de l'avant-bras de volontaires sains (Love et al., 1996). De plus, une étude réalisée par le groupe de Clozel a démontré que l'administration intraveineuse de Big ET-1 ne provoquait pas de vasorelaxation mais induisait plutôt une augmentation de la pression artérielle (Clozel et al., 1993a). De façon similaire, le groupe de Kiely a démontré que l'administration intraveineuse d'ET-1, chez des volontaires sains, entraînait une augmentation des pressions artérielles pulmonaires et systémiques moyennes ainsi que des résistances vasculaires pulmonaires et systémiques (Kiely et al., 1997). Les résultats de ces études suggèrent donc que le rôle vasodilatateur du R-ET_B observé suite à une injection exogène d'ET-1 pourrait n'être qu'un artefact pharmacologique plutôt qu'une observation physiologique.

De plus en plus d'études suggèrent que le R-ET_B pourrait avoir une contribution importante dans les effets pathologiques de l'ET-1. Effectivement, le R-ET_B est impliqué dans les effets vasoconstricteurs de l'ET-1. Toutefois, certaines études ont démontré que la localisation et la taille de l'artère étudiée déterminaient lequel des deux types de récepteur étaient responsable de la vasoconstriction induite par l'ET-1 (MacLean et al., 1994). Par exemple, il a été prouvé que le R-ET_A était responsable de la vasoconstriction des artères de large diamètre (extra-pulmonaires) alors que le R-ET_B était plutôt responsable de la vasoconstriction des petites artères de résistance (MacLean et al., 1994). Ainsi, il a été démontré que les récepteurs ET_A et ET_B participaient tous deux à la vasoconstriction des artères pulmonaires humaines (MacLean et al., 1998) et de lapins (LaDouceur et al., 1993). Ces études ont en effet confirmé que la stimulation du R-ET_B pouvait entraîner une importante vasoconstriction et qu'un antagonisme double des récepteurs était nécessaire pour réduire la réponse à l'ET-1. Au niveau du poumon isolé de rat, l'IRL-1620 et la S6c (agonistes sélectifs du R-ET_B) ont tous deux induit une importante vasoconstriction pulmonaire ainsi qu'un œdème pulmonaire pouvant être prévenus par l'administration d'un antagoniste sélectif ET_B (Sato et al., 1995).

Le R-ET_B peut aussi induire les effets pro-fibrotiques de l'ET-1. En effet, l'ET-1 a entraîné une augmentation de la production de collagène de type I et de type III par les fibroblastes normaux et sclérodermiques (Shi-Wen et al., 2001). Hoscher *et al* ont démontré, dans une étude réalisée chez des rats hypertendus, que l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_B pouvait à lui seul prévenir la fibrose cardiaque (Hocher et al., 1999). De plus, une deuxième étude réalisée par ce même groupe de recherche a établi que l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A, dans un modèle de rat hypertendu, favorisait le développement d'une fibrose rénale (Hocher et al., 2000a). Ces données expérimentales suggèrent que la stimulation du R-ET_B pourrait favoriser la fibrose.

L'activation du R-ET_B est impliquée dans plusieurs autres effets délétères induits par l'ET-1. En effet, le R-ET_B semblerait être impliqué dans la prolifération cellulaire puisque une étude réalisée par Davie *et al* a démontré que l'ET-1 et la S6c pouvaient toutes deux stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses pulmonaires humaines (Davie et al., 2002). Le R-ET_B est aussi impliqué dans l'activité pro-inflammatoire de l'ET-1. En effet, une administration intraveineuse d'ET-1 ou d'IRL 1620 a favorisé l'extravasation d'albumine au niveau de la trachée et des bronches chez le cochon d'Inde (Filep et al., 1995).

En résumé, ces quelques données précliniques et cliniques ont confirmé l'implication du R-ET_B dans les effets pathologiques induits par l'ET-1.

1.3.1.4.3.1 Profil d'expression du récepteur ET_B en condition pathologique

Puisque le R-ET_B possède une double fonction vasodilatatrice (R-ET_B endothélial) et vasoconstrictrice (R-ET_B musculaire lisse), il est important de déterminer le profil d'expression et le rôle joué par ce récepteur en condition pathologique. Les modèles expérimentaux d'HTP ont été utilisés afin de clarifier l'implication du R-ET_B dans le processus pathologique de cette maladie. En effet, certaines études réalisées dans un modèle de rat transgénique *sl/sl* (mutation génétique pulmonaire du R-ET_B) ont démontré que l'administration de monocrotaline et l'injection exogène d'ET-1 n'induisaient pas une

vasodilatation ET-dépendante (Ivy et al., 2001;Nishida et al., 2004b), une augmentation des pressions pulmonaires basales ainsi qu'une augmentation de la réponse à l'hypoxie chez ces animaux (Ivy et al., 2001;Nishida et al., 2004b). De plus, le blocage chronique du R-ET_B chez l'agneau a induit le développement d'une HTP (Ivy et al., 2000). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le R-ET_B aurait un rôle vasodilatateur et que son dysfonctionnement ou son blocage pourrait favoriser le développement d'une HTP. Toutefois, en condition pathologique, une réduction de l'expression des R-ET_B vasodilatateurs endothéliaux ainsi qu'une augmentation de l'expression des R-ET_B vasoconstricteurs présents sur la cellule musculaire lisse (Adner et al., 1998;Moller et al., 1998;Uddman et al., 2002) ont été observées (Clozel et al., 1993b). Davie et ses collaborateurs ont également remarqué que les patients souffrant d'HTP présentaient une augmentation significative du nombre de sites de liaison des récepteurs à l'ET au niveau des artères pulmonaires distales (Davie et al., 2002). De plus, Bauer *et al* ont démontré que les patients souffrant d'HTP présentaient une augmentation des expressions géniques et protéiques du R-ET_B dans la media des artères pulmonaires (Bauer et al., 2002). L'expression du R-ET_B est aussi augmentée au niveau des vaisseaux pulmonaires de gros calibres et de l'épithélium alvéolaire chez les patients souffrant de sclérodermie associée à une fibrose pulmonaire (Abraham et al., 1997). De plus, une réduction du marquage d'ET_B par immunofluorescence au niveau de la cellule endothéliale ainsi qu'une augmentation du marquage au niveau des cellules musculaires lisses ont été observées chez des rats souffrant d'hypertension, de diabète ou d'hypercholestérolémie (Kakoki et al., 1999). Aussi, dans ces modèles atteints d'hypertension, de diabète ou d'hypercholestérolémie, l'activation du R-ET_B a entraîné une plus forte vasoconstriction que chez les rats contrôles, suggérant la participation de ce récepteur à l'augmentation du tonus vasculaire observée en condition pathologique (Kakoki et al., 1999).

Ces données suggèrent donc que la majorité des pathologies cardio-vasculaires sont caractérisées par une réduction de l'expression des R-ET_B endothéliaux vasodilatateurs et par une augmentation de l'expression des R-ET_B musculaires lisses vasoconstricteurs.

1.3.1.4.4 Régulation croisée entre les récepteurs ET_A et ET_B

L'antagonisme sélectif d'un des deux récepteurs à l'ET-1 pourrait entraîner une compensation par l'autre récepteur suggérant donc l'existence d'une régulation croisée (*cross-talk*) entre la signalisation intracellulaire activée par les récepteurs ET_A et ET_B (Sauvageau et al., 2007). Ainsi, lorsqu'une même cellule exprime les récepteurs ET_A et ET_B , le blocage d'un seul de ces deux récepteurs pourrait permettre à l'ET-1 d'induire ses effets par le biais de l'autre récepteur. Ce système compensatoire pourrait indiquer qu'un antagonisme double serait nécessaire pour obtenir une inhibition complète des effets induits par l'ET-1. L'existence d'une régulation croisée entre les récepteurs ET_A et ET_B a été suggérée dans le passé (Fukuroda et al., 1994c; Fukuroda et al., 1996; Mickley et al., 1997). En effet, Clozel *et al* ont démontré que l'inhibition sélective du R- ET_A avec le BQ-123 n'était pas suffisante pour supprimer la constriction de la trachée induite par l'ET-1 car le R- ET_B était en mesure de prendre la relève (Clozel et al., 1995). De façon similaire, certaines études ont démontré qu'il était nécessaire de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin de réduire la vasoconstriction d'artères pulmonaires de lapin (Fukuroda et al., 1994c) et la constriction des bronches humaines (Fukuroda et al., 1996; Hay et al., 1998) et de mouton (Henry et al., 1999) induites par l'ET-1. De plus, nous avons récemment démontré l'existence d'une interaction entre les récepteurs ET_A et ET_B au niveau des artères de résistance pulmonaires de rat nécessitant le blocage simultané des deux récepteurs pour inhiber la vasoconstriction induite par l'ET-1 (Sauvageau et al., 2007). Des résultats similaires avaient été observés dans le passé. En effet, MacLean *et al* ont démontré que l'utilisation d'un antagoniste double était nécessaire afin d'inhiber la vasoconstriction d'artères de résistance pulmonaire humaines (MacLean et al., 1994; MacLean et al., 1998). Le groupe de recherche de Walker a récemment démontré, dans des cellules HEK 293, que l'hétérodimérisation des récepteurs ET_A et ET_B induisait une augmentation soutenue des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire. De plus, cette augmentation de Ca^{2+} ne pouvait être inhibée que par l'utilisation d'une combinaison d'antagonistes sélectifs ET_A (BQ-123) et ET_B (BQ-788). Ces résultats pourraient expliquer la nécessité de bloquer simultanément les

récepteurs ET_A et ET_B afin de réduire la vasoconstriction induite par l'ET-1 (Evans et al., 2008b).

L'existence d'une régulation croisée entre les récepteurs ET_A et ET_B a aussi été suggérée dans la prolifération des myofibroblastes pulmonaires induite par l'ET-1 (Prefontaine et al., 2008). Ce phénomène pourrait donc être une caractéristique qui est généralement retrouvée lorsque les deux récepteurs coexistent dans un même type cellulaire.

1.3.1.4.5 *Antagonisme sélectif versus antagonisme double*

Le développement d'antagonistes sélectifs et doubles a permis de comparer leurs efficacités relatives dans divers modèles expérimentaux. Certaines études ont démontré qu'un traitement avec un antagoniste double était plus efficace que l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A. Une étude réalisée par le groupe de Dupuis a comparé l'efficacité d'un traitement de 3 semaines avec un antagoniste sélectif ET_A (LU 135252) à celle obtenue par un traitement avec un antagoniste double (BSF 420627) dans un modèle d'HTP induite par l'administration de MCT. Les auteurs ont conclu que les deux antagonistes étaient efficaces dans ce modèle d'HTAP. Toutefois, seul l'antagoniste double a été en mesure de réduire le développement de l'hypertrophie ventriculaire droite et d'améliorer le taux de survie des animaux (Jasmin et al., 2001). Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats hypertendus SHR (*spontaneously hypertensive rats*). En effet, le groupe de Clozel a démontré que l'administration intraveineuse d'antagonistes doubles (bosentan ou terosentan) chez ces animaux entraînait une plus forte réduction de la pression artérielle que l'administration d'antagonistes sélectifs ET_A (BQ-123, BMS182874) (25 mm Hg versus 17 mm Hg) (Clozel et al., 1999). De plus, Sato *et al* ont démontré au niveau du poumon isolé de rat, que la combinaison d'un antagoniste sélectif ET_A (BQ-123) et ET_B (BQ-788) était plus efficace que l'utilisation de l'antagoniste sélectif ET_A seul pour inhiber la vasoconstriction et le développement de l'œdème pulmonaire induits par l'ET-1 (Sato et al., 1995). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme. En effet, chez des patients

hypertendus, le blocage simultané des récepteurs ET_A et ET_B (combinaison BQ-123 et BQ-788) a induit une plus forte réponse vasodilatatrice de l'artère brachiale que le seul blocage des R-ET_A (Cardillo et al., 1999).

1.3.1.5 Rôles physiologiques

Chez les mammifères, le système ET est essentiel dans le développement embryonnaire et néonatal (Baynash et al., 1994;Kurihara et al., 1994), dans le maintien du tonus vasculaire (Haynes et al., 1994;Wright et al., 1988), dans l'homéostasie rénale (Badr et al., 1989;Edwards et al., 1990;Pernow et al., 1988), dans la réparation du tissu cardiaque(Weber et al., 1992), dans l'angiogenèse (Knowles et al., 2005) et dans la régulation de la respiration (Dreshaj et al., 1995;Kuwaki et al., 1996).

1.3.1.5.1 Développement embryonnaire et néonatal

Les expériences d'inactivation de gène du système ET chez la souris ont montré l'importance physiologique de ce système dans le développement embryonnaire et néonatal. L'ET-1, le R-ET_A ainsi que l'ECE-1 sont essentiels au développement des structures cranio-faciales et des éléments du système d'éjection cardiaque dérivés des crêtes neuronales (Clouthier et al., 1998;Kurihara et al., 1994;Yanagisawa et al., 1998b). En effet, les souris invalidées pour les gènes codant pour l'ET-1 ou pour le R-ET_A meurent à la naissance par asphyxie en raison de malformations cranio-faciales et pharyngo-laryngées alors que les souris invalidées pour le gène codant l'ECE-1 meurent à un stade plus précoce soit *in utero*. Les souris invalidées pour les gènes codant pour le R-ET_A, l'ET-1 et l'ECE-1 possèdent plusieurs défauts de structures artérielles tels que l'absence d'artère sub-clavière droite, l'interruption de l'aorte ainsi que la présence d'une arche aortique droite. Il a ainsi été démontré que le R-ET_A doit être activé par l'ET-1 au stade embryonnaire E10 afin

d'assurer une prolifération normale des cellules de la crête neuronale permettant ainsi le développement normal des structures artérielles (Yanagisawa et al., 1998a).

1.3.1.5.2 *Maintien du tonus vasculaire*

L'évaluation des effets de l'administration d'ET-1 et d'antagonistes des récepteurs à l'ET ont permis de démontrer l'importance de ce système dans la régulation du tonus vasculaire. L'administration intraveineuse d'ET-1 dans diverses espèces entraîne une réduction de courte durée (quelques minutes) de la résistance vasculaire, suivie d'une importante vasoconstriction de longue durée (1 heure) démontrant ainsi la fonction vasodilatatrice et vasoconstrictrice de l'ET (Wright et al., 1988). Une libération de NO et de PGI₂ via la stimulation du R-ET_B endothélial est à l'origine de la vasodilatation initiale puisque l'utilisation *in vivo* ou *in vitro* d'inhibiteurs du NO et de la PGI₂ ou d'antagonistes du R-ET_B abolissent cette vasodilatation initiale (Berti et al., 1993;Filep et al., 1993). Toutefois, la vasoconstriction observée par la suite est induite par la stimulation du R-ET_A présent sur les cellules musculaires lisses puisque l'administration d'antagoniste du R-ET_A peut atténuer cet effet presseur. L'intensité des effets, et la nature des ces derniers, de l'administration d'antagonistes sélectifs et doubles dépendront de l'espèce étudiée. En effet, l'implication du système ET dans la régulation du tonus vasculaire est limitée chez le rat (Gardiner et al., 1996;Thompson et al., 1995), le chien (Munter et al., 1999;Teerlink et al., 1995) et le lapin (Gratton et al., 1997;Ignasiak et al., 1997). Au contraire, l'administration des antagonistes des récepteurs à l'ET a d'importantes répercussions hémodynamiques chez l'homme. Ainsi, l'administration d'antagonistes sélectifs ET_A (PD 145065 et BQ-123) ou double (bosentan) chez le rat n'induit aucune modification de la pression artérielle (Banting et al., 1996;Filep., 1997;Richard et al., 1995). De plus, l'administration de l'antagoniste double bosentan n'entraîne aucun effet hémodynamique chez le chien anesthésié (Teerlink et al., 1995). L'administration intraveineuse d'un antagoniste sélectif ET_A (PD156707) chez le lapin n'induit aucune modification de la pression artérielle (Ignasiak et al., 1997).

En revanche, Haynes *et al* ont démontré que l'administration intraveineuse de l'antagoniste double TAK-044 chez l'homme favorise une réduction de la résistance vasculaire et de la pression artérielle suggérant ainsi une contribution basale du système ET dans le maintien du tonus vasculaire (Haynes et al., 1996). De plus, l'administration intra-artérielle locale d'un antagoniste sélectif ET_A (BQ-123) chez l'homme induit une vasodilatation ainsi qu'une augmentation de débit sanguin local (Haynes et al, 1994). Ces données suggèrent que l'influence du système ET sur le tonus vasculaire pourrait être plus importante chez l'homme que chez certains modèles animaux.

1.3.1.5.3 Homéostasie rénale

Le système ET joue un rôle important dans la physiologie et la pathophysiologie rénale. L'ET-1 et l'ET-3 sont toutes deux synthétisées dans diverses cellules des néphrons telles que les cellules épithéliales de la medulla et du tubule collecteur cortical. Les récepteurs ET_A et ET_B sont tous deux présents au niveau de la médulla et du cortex toutefois, 70% de ces récepteurs sont du type B. De plus, ces récepteurs sont présents au niveau des vaisseaux et des tubules rénaux, des cellules mésangiales ainsi qu'au niveau de l'interstitium médullaire (Wilkes et al., 1991). Ainsi il n'est pas surprenant que le système ET contrôle le débit rénal, la réabsorption d'H₂O et de sodium ainsi que l'équilibre acido-basique (Peng et al., 2001).

Il est important de noter que les effets rénaux de l'ET dépendront non seulement de la dose mais aussi du type d'administration. En effet, l'administration systémique d'ET-1 chez le rat entraîne une augmentation de la résistance vasculaire rénale ainsi que des réductions du débit sanguin rénal et du rythme de filtration glomérulaire favorisant donc la rétention d'H₂O et de sodium (Matsuura et al., 1997). En revanche, l'administration de cette dernière directement au niveau de l'artère rénale favorise une augmentation rapide et transitoire du débit sanguin rénal suivie d'une réduction de longue durée qui s'accompagne d'une diminution du rythme de filtration glomérulaire (Wilkes et al., 1991). Les effets

rénaux de l'ET-1 ont aussi pu être observés lors de l'administration d'ET-1 au niveau de l'artère rénale de lapin anesthésié (Evans et al., 1998). Cette administration a entraîné une réduction du débit sanguin rénal, de la perfusion corticale, du rythme de la filtration glomérulaire, du débit urinaire ainsi que de l'excrétion sodique. Toutefois, un effet opposé a été observé au niveau de la médulla où l'activation du R-ET_B a plutôt induit une natriurèse et une diurèse via l'inhibition de l'action de la vasopressine (Evans et al., 1998).

1.3.1.6 Rôles pathophysiologiques

Il est dorénavant bien établi que le système ET est impliqué dans le développement et le maintien de certaines maladies cardiovasculaires. En effet, une augmentation des niveaux circulants d'ET-1 a été observée dans diverses pathologies telles que la défaillance cardiaque (McMurray et al., 1992), l'HTA (Saito et al., 1990), l'athérosclérose (Lerman et al., 1991), le choc septique (Schuetz et al., 2007), ainsi que la fibrose rénale (Hochoer et al., 1997).

1.3.1.6.1 Défaillance cardiaque et insuffisance cardiaque chronique

L'insuffisance cardiaque (IC) touche plus de 400 000 Canadiens et le nombre de nouveaux cas chaque année dépasse les 50 000. En 2002, plus de 4 500 Canadiens sont morts d'IC. L'IC est une condition pathophysiologique où la performance cardiaque est réduite et ne répond plus à la demande et aux besoins de l'organisme. Une des principales conséquences de cette maladie est l'activation des systèmes neurohormonaux tels que les systèmes nerveux sympathique, rénine-angiotensine-aldostérone ainsi que ET. En effet, des augmentations des concentrations circulantes de noradrénaline, d'ANGII, d'ET-1 et d'aldostérone ont été observées chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique (ICC) (Cleland et al., 1996; Wright et al, 1988). Cette activation est initialement bénéfique puisqu'elle permet de maintenir une pression adéquate de perfusion des organes

vitaux toutefois, à long terme, cette activation devient délétère et est impliquée dans la progression rapide de l'IC menant, éventuellement, à la mort.

Une grande percée dans le traitement de l'IC a été l'introduction des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). En effet, les ECA ont démontré des bénéfices en termes de mortalité, de la tolérance à l'exercice, de la fonction ventriculaire gauche ainsi que de la protection cardiaque (Kober et al., 1995;Pfeffer et al., 1992;Wing et al., 2003). Malgré les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA, les taux de mortalité et de morbidité demeurent élevés chez les patients souffrant d'ICC probablement une conséquence de l'activation d'autres systèmes neurohormonaux qui induisent leurs effets délétères. En effet, une augmentation des concentrations circulantes d'ET-1 ainsi qu'une augmentation de la production d'ET-1 par le myocarde ont été observées chez des rats souffrant d'IC chronique (ICC) (Sakai et al., 1996b).De plus, une augmentation des expressions génique et protéique des récepteurs ET_A et ET_B a été confirmée au niveau du ventricule gauche d'un modèle de rat infarctus (Kobayashi et al., 1999;Picard et al., 1998). En raison des nombreuses données expérimentales impliquant le système ET dans la pathophysiologie de l'ICC, plusieurs études précliniques évaluant l'efficacité des antagonistes des récepteurs à l'ET-1 ont été réalisées. C'est avec les travaux de Sakai et ses collaborateurs, en 1996, qu'un véritable intérêt pour les antagonistes des récepteurs à l'ET-1 a vu le jour (Sakai et al., 1996a). Ils ont démontré que l'administration prolongée d'un antagoniste sélectif ET_A (BQ-123) réduisait de moitié la mortalité dans un modèle de rats infarctus induit par la ligature d'une artère coronaire. Depuis, plusieurs études évaluant l'efficacité d'antagonistes sélectifs et double dans l'ICC ont été publiées (Miyachi et al., 2004;Mulder et al., 1997;Mulder et al., 1998;Nguyen et al., 1998;Sakai et al., 1996a). Ces études ont suggéré que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'ET-1 pourrait améliorer la fonction ventriculaire gauche, le remodelage cardiaque, l'hémodynamie pulmonaire et systémique ainsi que le pronostic.

Chez les patients souffrant d'ICC, des augmentation des concentrations plasmatiques (Cacoub et al., 1993;McMurray et al., 1992;Rodeheffer et al., 1992) et

tissulaires d'ET-1 ont été rapportées (Ergul et al., 2000; Kakoki et al., 1999). Les niveaux plasmatiques d'ET-1 corrélaient positivement avec la classe fonctionnelle de la NYHA (*New York Heart Association*) (Rodeheffer et al., 1992; Wei et al., 1994) et le volume du ventricule gauche en fin de diastole (Wei et al., 1994) et inversement avec la fraction d'éjection ventriculaire gauche (Cacoub et al., 1993; Rodeheffer et al., 1992). Ainsi, les niveaux plasmatiques d'ET-1 sont en mesure de prédire, chez les patients souffrants d'ICC, la détérioration clinique, le besoin d'une transplantation cardiaque et la mort (Galatius-Jensen et al., 1996; Pousset et al., 1997). Il est fort intéressant de noter que les niveaux plasmatiques d'ET-1 corrélaient positivement avec la sévérité de l'HTP (Cacoub et al., 1993; Cody et al., 1992; Pacher et al., 1993) dans l'ICC. Toutefois, il est encore aujourd'hui incertain si cette augmentation représente un marqueur ou un médiateur de l'HTP. Cowburn *et al* ont démontré que la perfusion exogène d'ET-1 directement dans l'artère pulmonaire, en concentrations similaires à celles retrouvées chez les patients souffrant d'ICC, chez des patients souffrant d'une défaillance ventriculaire gauche entraîne une vasoconstriction systémique mais non pulmonaire (Cowburn et al., 1998). Ces données suggèrent que l'ET-1 serait un marqueur plutôt qu'un médiateur de l'HTP. L'augmentation des concentrations plasmatiques d'ET-1 observée en condition d'ICC pourrait en fait être le résultat d'une augmentation de la production, de la sécrétion et/ou d'une réduction de la clairance d'ET-1. En effet, Dupuis et Staniloae ont tous deux démontré que la capacité de clairance pulmonaire était réduite chez les patients souffrant d'IC secondaire à un infarctus du myocarde (Dupuis et al., 1998c; Staniloae et al., 2004). De plus, Dupuis *et al* ont aussi observé une réduction de la clairance d'ET-1 chez les patients souffrant d'HTP (Dupuis et al., 1998a). De plus en plus de données suggèrent que le R-ET_B serait responsable de la clairance de l'ET-1 circulante (Dupuis et al., 1996a; Fukuroda et al., 1994a). Ainsi, l'augmentation des concentrations plasmatiques en condition d'ICC pourrait être la conséquence d'une réduction de l'expression du R-ET_B dans l'ICC. En effet, une réduction de l'expression pulmonaire du R-ET_B a été observée chez certains modèles expérimentaux d'ICC (Kobayshi et al., 1998).

1.3.1.6.1.1 Antagonistes des récepteurs à l'ET-1

En raison des résultats précliniques prometteurs, plusieurs études cliniques évaluant l'efficacité d'antagonistes sélectifs et doubles chez des patients souffrant d'ICC ont été réalisées. L'étude REACH-1 (*Research on Endothelin Antagonists in Chronic Heart Failure*) a évalué, chez des patients souffrant d'ICC de classe IIIB/IV, les effets d'un traitement à long terme avec un antagoniste double (bosentan) (Mylona et al., 1999). Cette étude a été terminée prématurément en raison de l'augmentation des transaminases hépatiques observée. Par la suite, les effets du bosentan à plus faibles doses ont été évalués dans deux grandes études cliniques réalisées aux États-Unis soit ENABLE-1 et ENABLE-2 (*Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure*). Les résultats de ces deux études n'ont toutefois guère démontré que l'administration du bosentan pouvait avoir un effet bénéfique sur le taux de morbidité et de mortalité des patients souffrant d'ICC (Teerlink., 2002). Une autre étude évaluant les effets sur la classe fonctionnelle et la fréquence d'hospitalisation d'un autre antagoniste double, l'enrasentan (ENCOR, *Enrasentan Cooperative Randomized Evaluation*), n'a démontré aucun bénéfice puisque le traitement placebo a été plus efficace. L'étude EARTH (*EndothelinA Receptor Antagonist Trial in Heart Failure*) a évalué le remodelage vasculaire après 6 mois de traitement avec un antagoniste sélectif ET_A (darusentan) chez 642 patients souffrant d'ICC de classe II-IV et présentant une fraction d'éjection ventriculaire gauche de moins de 35% (Coletta et al., 2002). Même si les investigateurs ont conclu que le darusentan était bien toléré par les patients, ils n'ont pas été en mesure de démontrer un effet bénéfique clairement associé au traitement.

Les attentes envers les antagonistes des récepteurs à l'ET-1 dans le traitement des patients souffrant d'ICC n'ont clairement pas été satisfaites par les nombreuses études cliniques réalisées jusqu'à ce jour. Une excellente revue de la littérature par Kelland *et al.*, a proposé plusieurs explications de ces résultats négatifs (Kelland et al., 2006). Premièrement, ils ont mentionné qu'il était possible que les antagonistes des récepteurs à l'ET-1 améliorent l'éjection cardiaque à court terme mais que leur utilisation à long terme

ne soit pas en mesure de réduire les taux de morbidité et de mortalité. Deuxièmement, ils ont suggéré que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'ET-1 aurait pu être un succès dans le traitement de l'ICC s'ils avaient été introduits avant les inhibiteurs de l'ECA, les bêta-bloquants et la spirinolactone. En effet, une fois que deux des trois systèmes neurohormonaux sont bloqués, il est possible que le blocage du troisième système ajoute peu d'effets bénéfiques additionnels. Troisièmement, ils ont énoncé qu'il existait peut-être une sous-population de patients souffrant d'ICC qui pourrait bénéficier d'un traitement avec des antagonistes des récepteurs à l'ET-1. Finalement, ils ont proposé que l'utilisation d'antagonistes sélectifs ET_A pourrait être plus bénéfique que l'utilisation d'antagonistes doubles chez les patients souffrant d'ICC.

1.3.1.6.2 Hypertension artérielle systémique

L'HTA systémique affecte une personne sur cinq au Canada. Il s'agit du principal facteur de risque associé aux arrêts cérébraux-vasculaires et l'un des plus importants facteurs de risque associés aux maladies du cœur. Selon l'organisation mondiale de la santé (*World Health Organization*, WHO), l'HTA est définie par une pression systolique égale ou supérieure à 160 mm Hg et par une pression diastolique égale ou supérieure à 95 mm Hg. La pression sanguine est optimale lorsque les pressions systolique et diastolique sont en bas de 120 mm Hg et 80 mm Hg, respectivement.

En raison du fait que l'administration exogène d'ET-1 entraîne une augmentation de la pression artérielle chez le rat (Mortensen et al., 1992;Potter et al., 1997), le chien (Wilkins et al., 1993) et l'homme (Rabelink et al., 1994), plusieurs études ont évalué l'implication du système ET dans la pathophysiologie de l'HTA. Une réduction de la réponse à l'ET-1 de l'aorte de rats DOCA-sel a été la première observation suggérant l'implication du système ET dans certaines formes expérimentales d'HTA (Nguyen et al., 1993). L'activation du système ET a aussi été observée dans plusieurs modèles animaux d'hypertension tels que le rat DOCA-sel (Carneiro et al., 2008;Lariviere et al., 1993b;Lariviere et al., 1993a;Schiffrin et al., 1997), le rat DOCA-sel SHR (Schiffrin et al.,

1995), le rat Dahl-sel (Doucet et al., 1996) et le hamster SHR (Rubinstein., 2006). Ces modèles animaux présentent une augmentation des niveaux tissulaires d'ET-1 au niveau de l'aorte et des artères mésentériques (Day et al., 1995) et ont une baisse de pression artérielle suite à l'administration d'antagonistes des récepteurs à l'ET-1 (d'Uscio et al., 1997; Day et al., 1995; Lariviere et al., 1995; Li et al., 1996b; Okada et al., 2000). Au contraire, l'activation du système ET ne semble pas jouer de rôle important dans les modèles animaux SHR et rénovasculaire d'HTA (Li et al., 1996a), dans les modèles animaux transgéniques (mREN2)²⁷ (Rossi et al., 2000) de même que dans les modèles animaux exprimant la rénine et l'angiotensinogène humaine (Bohlender et al., 2000). En effet, dans ces divers modèles animaux, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'ET-1 n'a eu aucun effet anti-hypertenseur.

Les niveaux plasmatiques d'ET-1 sont habituellement normaux chez les patients souffrant d'HTA (Davenport et al., 1990; Kohno et al., 1990; Schiffrin et al., 1991). Toutefois, des niveaux élevés peuvent être retrouvés chez les américains d'origine africaine et chez certains patients souffrant d'HTA sévère (Ergul et al., 1996). L'utilisation d'antagonistes sélectifs ET_A entraîne une plus forte vasodilatation chez les patients souffrant d'HTA essentielle que chez des volontaires sains suggérant donc un rôle prédominant du R-ET_A dans la régulation du tonus vasculaire par l'ET-1 endogène. Ainsi, Cardillo *et al.*, ont démontré que l'administration d'un antagoniste sélectif ET_A (BQ-123) améliore la vasodilatation chez les patients souffrant d'HTA (Cardillo et al., 1999). De plus, l'administration d'un antagoniste sélectif ET_B (BQ-788) au niveau de la circulation de l'avant-bras de patients hypertendus entraîne une vasodilatation (Cardillo et al., 1999) alors que l'administration du BQ-788 chez des volontaires sains induit une vasoconstriction des artères de résistance de l'avant-bras. Ces résultats suggèrent que chez les volontaires sains, le R-ET_B pourrait jouer un rôle vasodilatateur alors que chez les patients hypertendus, le R-ET_B aurait un rôle vasoconstricteur.

1.3.1.6.2.1 Antagonistes des récepteurs à l'ET-1

L'implication du système ET dans la pathophysiologie de l'HTA humaine est toujours incertaine. Quelques études cliniques ont tenté de démontrer l'efficacité d'antagonistes des récepteurs à l'ET-1 dans l'HTA. Ainsi, l'administration de l'antagoniste double bosentan (500-2000 mg/jour sur 4 semaines) chez des patients souffrant d'HTA légère (classe I-II), a entraîné une réduction de la pression diastolique comparable à celle obtenue lors de l'administration d'un inhibiteur de l'ECA (enalapril, 20 mg/jour) (Krum et al., 1998). De plus, une étude réalisée chez 392 patients hypertendus a évalué les effets d'un traitement de deux semaines avec un antagoniste sélectif ET_A (darusentan). L'administration du darusentan a induit des réductions de la pression diastolique de 6 (10 mg/jour pendant 6 semaines) et 11.3 mm Hg (100 mg/jour) chez ces patients hypertendus (Nakov et al., 2002). Des résultats similaires ont été obtenus récemment dans une étude de phase II réalisée chez 115 patients souffrant d'une forme résistante d'hypertension et traités avec le darusentan. En effet, dix semaines de traitement avec cet antagoniste sélectif ET_A a résulté en une réduction des pressions systoliques et diastoliques (Black et al., 2007). Malgré des résultats fort intéressants, il demeure toujours incertain si les antagonistes des récepteurs à l'ET seront éventuellement inclus dans les traitements thérapeutiques de l'HTA. Peut-être existe-t-il une sous-population de patients souffrant d'HTA qui pourrait être plus susceptible de répondre positivement à un traitement avec des antagonistes des récepteurs à l'ET. En effet, l'ET semble être impliquée dans le développement de l'HTA sensible au sel. La majorité des études réalisées à ce jour ont seulement évalué les effets des antagonistes des récepteurs à l'ET-1 sur la pression artérielle. Pourtant, il est bien connu que le système ET est impliqué dans les dommages tissulaires ainsi il est possible que l'utilisation de ces agents puisse protéger contre ces effets délétères plutôt que d'entraîner une réduction de la pression artérielle. En effet, une étude réalisée par le groupe de Barton a démontré que l'administration d'un antagoniste sélectif ET_A (LU135252) pendant deux mois n'a induit qu'une légère réduction de la pression artérielle mais a néanmoins prévenu l'hypertrophie vasculaire et a normalisé la réactivité vasculaire induite par une diète riche en sodium (Barton et al., 1998). De plus, Okada *et al* ont révélé que l'administration d'un

antagoniste sélectif ET_A (J-105859) a aussi prévenu l'hypertrophie vasculaire chez des rats Dahl-sel en plus de réduire le taux de mortalité et d'éviter le développement de lésions cérébrales induites par l'ET-1 (Okada et al., 2000).

Néanmoins, les effets sur les enzymes hépatiques, les maux de tête occasionnés et leur courte durée d'action nécessitant plus d'une administration par jour, ont entraîné une réduction de l'intérêt pour le développement de ces agents dans le traitement de l'HTA.

1.3.1.6.3 Hypertension pulmonaire

Les niveaux plasmatiques d'ET-1 sont élevés chez les patients souffrant d'HTP de diverses étiologies (Giaid et al., 1993; Kumar et al., 1996; Langleben et al., 1993) et corrént positivement avec la sévérité de la maladie, la pression de l'artère pulmonaire et la résistance vasculaire pulmonaire (Cody et al., 1992). Ils corrént par contre de façon négative avec le pronostic. Une augmentation du gradient artériovoineux d'ET-1 suggère que la circulation pulmonaire pourrait contribuer à cette augmentation des niveaux circulants d'ET-1 (Stewart et al., 1991). Il reste néanmoins à déterminer si cette élévation est la conséquence d'une augmentation de la production et/ou une réduction de la clairance pulmonaire due à une diminution de l'activité du R-ET_B (Dupuis et al., 1998c; Dupuis et al., 1998a; Dupuis et al., 1998b; Dupuis et al., 1996a; Mathieu et al., 2001). De plus, la signification de cette augmentation des niveaux plasmatiques d'ET-1 demeure incertaine. Toutefois, il est fort probable que cette augmentation d'ET-1 circulante soit secondaire au processus pathologique de l'HTP et serait donc un marqueur plutôt qu'un médiateur. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'une administration chronique exogène d'ET-1 sur une période de quatre semaines chez le rat n'a pas induit le développement d'une HTP ou d'une hypertrophie ventriculaire droite (Migneault et al., 2005). De plus, Hocher *et al* ont démontré que la surexpression pulmonaire d'ET-1 chez la souris n'induisait pas le développement d'une HTP mais entraînait toutefois le développement d'une inflammation et d'une fibrose pulmonaires (Hocher et al., 2000b). Ainsi, ces données suggèrent que l'activation seule du système ET est insuffisante pour induire une HTP et donc qu'un déséquilibre de d'autres facteurs endothéliaux tels que le NO, le TxA₂ et la PGI₂ ainsi

qu'une modification des propriétés des cellules musculaires lisse et du BMPR-II (*Bone protein morphogenic receptor*) pourraient être nécessaires pour permettre à l'ET-1 d'induire de tels effets pathophysiologiques.

Bien qu'il soit toujours incertain si l'augmentation plasmatique est une cause ou une conséquence de l'HTP, les études qui ont évalué les niveaux d'expression tissulaire du système ET confirment l'implication de ce dernier dans la pathogénèse de l'HTAP. En effet, l'étude réalisée par le groupe de Giaid a démontré que comparativement au groupe contrôle, une augmentation de l'expression tissulaire pulmonaire d'ET-1 a été observée chez les patients souffrant d'HTAP. Cette augmentation d'expression était localisée principalement au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires ainsi qu'au niveau des lésions plexiformes. De plus, l'intensité du marquage corrélait positivement avec la résistance vasculaire pulmonaire (Giaid et al., 1993). Une augmentation du marquage de l'ECE-1 (Giaid., 1998) de même qu'une augmentation de l'expression du récepteur ET_B (Davie et al., 2002) ont aussi été remarquées au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires de patients souffrant d'HTAPI.

Ainsi, ces données confirment que les composantes du système ET sont en majorité surexprimées au niveau des artères pulmonaires et ces dernières corrént de façon positive avec la sévérité de la pathologie.

Dans les prochaines sous-sections nous présenterons les différents modèles expérimentaux d'HTAP tout en précisant l'implication du système ET.

1.3.1.6.3.1 Modèles animaux expérimentaux

Une variété de stimuli chimiques, physiologiques et moléculaires ont été utilisés pour étudier l'HTP (Tableau 1). Parmi ceux-ci, les modèles hypoxiques et MCT sont couramment utilisés.

	Experimental model	Animal species	Shared pathological findings in human disease
(Patho)physiological stimuli	Acute and chronic hypoxia	Bird, cow, dog, guinea pig, mouse, pig, rat, sheep	Increased muscularization of resistance vessels in chronic bronchitis, cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease, hypoventilation and chronic heart disease
	Increased flow	Dog, pig, rat, sheep	Increased muscularization in congenital heart disease
	Vascular obstruction (air embolism, synthetic microspheres)	Dog, pig, rat, sheep	Vascular obliteration and increased muscularization in chronic pulmonary thromboembolism
Chemical and toxic stimuli	Monocrotaline (pyrrole)	Dog, rat, sheep	Increased muscularization and vascular inflammation in drug-induced PH
	α -Naphthylthiourea	Rat	Pulmonary edema and increased muscularization induced by chemotherapy
	Bleomycin	Mouse, rabbit, rat	Fibrosis and increased muscularization in interstitial lung diseases
	Group B Streptococcus	Pig, sheep	Vasoconstriction in persistent PH of the newborn
Molecular stimuli	VEGFR-2 inhibition + hypoxia	Rat	Plexiform lesions in primary PH
	Angiotensin-II overexpression	Rat	Muscularization and vascular occlusion in primary and secondary PH
Genetic stimuli	Fawn-hooded rat	Rat	Genetic predisposition resulting in increased muscularization
	Broiler chickens	Chicken	Genetic predisposition resulting in increased muscularization
	BMPR2 knockout	Mouse	Genetic predisposition resulting in increased muscularization
	S100A4 overexpression	Mouse	Genetic predisposition resulting in plexiform lesions

Tableau 1. Modèles animaux expérimentaux d'HTP (Marsboom et al., 2004)

1.3.1.6.3.1.1 Modèle hypoxique

Les modèles hypoxiques simulent plusieurs aspects de l'HTP résultant de pathologies pulmonaires et cardiaques chroniques. Ainsi, les modèles hypoxiques aigus et chroniques sont tous deux des modèles couramment utilisés dans les études de la vasoréactivité pulmonaire et de l'HTP. L'HTP se développe secondairement à une réduction de pression de l'air atmosphérique (hypoxie hypobarique, simulant une exposition à haute altitude) ou à une réduction de la tension partielle d'oxygène à pression atmosphérique normale (hypoxie normobarique). L'hypoxie aiguë induit une vasodilatation des vaisseaux systémiques alors qu'elle provoque plutôt une vasoconstriction des artères pulmonaires. Cet effet aiguë et réversible est en fait la conséquence de la surexpression de

vasoconstricteurs tels que l'ET-1 (Petersen et al., 2008) et la sérotonine en plus de l'activation de canaux potassiques dépendants de l'hypoxie situés sur les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (Sweeney et al., 2000). L'hypoxie aïgue entraîne une vasoconstriction de la circulation pulmonaire pouvant être inhibée par des inhibiteurs de canaux calciques de type L (McMurtry et al., 1976). Ceci suggère que l'hypoxie entraîne une dépolarisation membranaire des cellules musculaires lisses et une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} via l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants favorisant une vasoconstriction pulmonaire et conséquemment, une augmentation de la RVP. De plus, la dépolarisation initiale est associée à l'inhibition de canaux potassiques voltage-dépendants (I_K). Au contraire, l'hypoxie chronique est plus ou moins irréversible et s'accompagne d'un remodelage vasculaire incluant le développement de la musculature des artères initialement dépourvues de cellules musculaires ainsi qu'un épaissement de la média des artérioles (Chan et al., 2008). Les modifications structurelles à long-terme augmentent d'avantage la RVP et en conséquence le travail sur le ventricule droit.

1.3.1.6.3.1.1 Implication du système ET

Plusieurs études ont démontré l'implication et l'activation du système ET dans le développement d'une HTP secondaire à des hypoxies aïgue et chronique. En effet, une augmentation des niveaux plasmatique et tissulaire pulmonaires d'ET-1 ainsi qu'une augmentation des expressions géniques de l'ET-1, du R-ET_A et du R-ET_B ont été observées chez des rats exposés à des conditions hypoxiques à court et à long terme (Elton et al., 1992;Horio et al., 1991;Li et al., 1994b;Li et al., 1994a;Shirakami et al., 1991). De plus, de nombreuses études ont aussi démontré l'efficacité des antagonistes sélectifs ET_A (Bonvallet et al., 1994;Dicarlo et al., 1995;Oparil et al., 1995;Petersen et al., 2008;Yuyama et al., 2005) et doubles ET_A/ET_B (Chen et al., 1995) dans la prévention et le traitement de l'HTP induite par l'hypoxie.

1.3.1.6.3.1.2 Modèle monocrotaline

La MCT est un alcaloïde pyrole isolé de la plante *Crotalaria spectabilis* qui, lorsqu'injecté de façon intra-péritonéale, entraîne le développement progressif d'une HTP (Chesney et al., 1973; Wilson et al., 1992). Lorsqu'injectée, la MCT est métabolisée par la famille d'enzymes des cytochromes P450 du foie pour former un métabolite réactif soit la dihydro-monocrotaline (DMCT) (Mattocks., 1968). Ce métabolite possède une demie-vie d'environ 3 secondes (Mattocks et al., 1990). Cette courte demi-vie du métabolite actif suggère que les cellules endothéliales des vaisseaux pulmonaires semblent être la cible de la toxicité de la MCT, une hypothèse supportée par le fait que l'endothélium vasculaire pulmonaire est physiquement très proche du foie. Des études ont démontré l'implication des cellules endothéliales dans le modèle d'HTAP induit par l'administration de MCT toutefois, le mécanisme par lequel ces cellules perdent leur capacité fonctionnelle est toujours inconnu. Certaines études ont démontré une augmentation de l'incorporation de thymidine, une extravasation de certaines macromolécules ainsi qu'une réduction de la clairance de 5-hydroxytryptamine par les cellules endothéliales suite à l'administration de MCT (Hoorn et al., 1992; Meyrick et al., 1982; Wilson et al., 1992). De plus, des études *in vitro* réalisées avec des cellules endothéliales aortiques bovines ont démontré que la DMCT pouvait entraîner une inhibition de leur prolifération cellulaire (Hoorn et al., 1993), une prolongation de l'arrêt du cycle cellulaire en G2-M (Thomas et al., 1996), une réduction de leur capacité à servir de barrière perméable (Taylor et al., 1997; Thomas et al., 1998b) en plus d'une incapacité de compensation face à une insulte électrophilique entraînant l'apoptose des cellules (Thomas et al., 1998a).

1.3.1.6.3.1.2.1 Implication du système ET

Plusieurs études ont démontré l'implication du système ET dans le développement de l'HTAP induite par l'administration de MCT. En effet, en 1995, Miyauchi et ses collaborateurs ont démontré que 14 jours suivant l'administration intra-péritonéale de

MCT, des rats développaient une importante HTP secondaire à une augmentation des concentrations plasmatiques d'ET-1 (Miyachi et al., 1993). Ces données ont alors suggéré que l'ET-1 était impliquée dans la pathogénèse de l'HTAP induite par l'administration de MCT. Une augmentation des concentrations plasmatiques d'ET-1 a été observée par divers groupe de recherche (Dupuis et al., 2000;Jasmin et al., 2003;Prie et al., 1997;Yorikane et al., 1993). De plus, plusieurs études ont démontré l'efficacité d'antagonistes des récepteurs à l'ET-1 dans le traitement de l'HTAP induite par la MCT. En effet, Prié et ses collaborateurs ont démontré que l'administration orale d'un antagoniste sélectif ET_A 48 heures avant l'injection de MCT et poursuivie pendant 3 semaines réduisait le développement de l'HTAP de façon significative (Prie et al., 1997). De plus, Jasmin *et al* ont prouvé que l'administration chronique d'un antagoniste sélectif ET_A ou double ET_A/ET_B était efficace dans le traitement de l'HTAP induite par la MCT (Jasmin et al., 2001). Les groupes de recherche de Clozel (Clozel et al., 2006) et de Hill (Hill et al., 1997) ont démontré que l'administration d'un antagoniste double, le bosentan, était efficace dans le traitement de l'HTAP induite par l'administration de MCT. Plusieurs autres études ont démontré l'efficacité d'antagonistes sélectifs (Nishida et al., 2004a;Yuyama et al., 2004) et doubles (Nishida et al., 2004a) dans le traitement de l'HTAP induite par la MCT. Ainsi, l'implication du système ET et l'efficacité des antagonistes des récepteurs à l'ET-1 (sélectif ou double) dans le traitement de l'HTAP induite par l'administration de MCT ont clairement été établis.

1.3.2 Endothéline-3

Comme mentionné précédemment, le système ET est composé de trois membres. Toutefois, la majorité des études réalisées à ce jour ont porté leur attention sur l'ET-1 et ainsi, moins de données expérimentales et de littérature sont disponibles sur l'ET-3.

L'ET-3 est un peptide de 21 acides aminés qui diffère de l'ET-1 par 6 acides aminés (Yanagisawa et al., 1988a). La localisation chromosomique du gène codant pour l'ET-3 a

été cartographiée à la région 20q13.2-13.3. Ce peptide est synthétisé à partir de son précurseur la Big ET-3. Cette étape impliquerait le clivage d'un lien tryptophane-isoleucine par une ECE spécifique. En effet, l'ECE-3 a été identifiée au niveau des microsomes de l'iris de bœuf, elle serait spécifique pour la Big ET-3 et permettrait la formation de l'ET-3 mature (Hasegawa et al., 1998). De plus, une étude réalisée par le groupe de Redman a démontré que les protéines du groupe Kell pouvaient aussi cliver la Big ET-3 pour former le peptide mature (Lee et al., 1999).

L'ET-3 induit ses effets via l'activation des récepteurs ET_A et ET_B, décrits dans une section antérieure (1.3.1.4). Selon la littérature, l'ET-3 serait un agoniste spécifique du R-ET_B, tout comme la S6c. Toutefois, ses effets pharmacologiques sont très complexes et ne peuvent pas toujours être expliqués par son action sur le R-ET_B. En effet, dans diverses préparations, une faible concentration d'ET-3 a induit des effets qui ne peuvent être mimés par l'administration d'agonistes sélectifs du R-ET_B mais qui peuvent toutefois être inhibés par l'administration d'antagonistes sélectifs ET_A (Eglezos et al., 1993; Kasai et al., 1994). Quelques années plus tard, Desmaret *et al* ont démontré que l'ET-3 pouvait se lier au R-ET_A avec une affinité beaucoup plus élevée que celle qui avait été originalement proposée (Desmaret et al., 1999). De plus, un troisième sous-type de récepteur nommé R-ET_C a été cloné dans le *Xenopus Laevis* et semblerait lier l'ET-3 de façon spécifique (Karne et al., 1993). Bien que des études fonctionnelles supportent son existence, ce récepteur n'a toujours pas été cloné chez les mammifères (Di Nunzio et al., 2004;Jaureguiberry et al., 2004;Sokolovsky., 1995).

L'ET-3 est fortement exprimée dans le cerveau (Shinmi et al., 1989), les intestins (Matsumoto et al., 1989), les reins (Shiba et al., 1992;Tack et al., 1997) et les poumons (Firth et al., 1992). Contrairement à l'ET-1, des études passées ont démontré que l'ARNm de l'ET-3 n'était pas détecté au niveau des cellules endothéliales aortiques de porc (Bloch et al., 1989a).

1.3.2.1 Rôles physiologiques

Contrairement à l'ET-1, les rôles physiologiques de l'ET-3 sont moins bien définis. Certaines études ont toutefois démontré que l'ET-3 possède des propriétés vasoconstrictrice et vasodilatatrice (Crawley et al., 1992), qu'elle entraîne la natriurèse et la diurèse (Majowicz et al., 1998), qu'elle stimule la relâche du peptide natriurétique de l'oreillette (Ntunes-Rodrigues et al., 1993) et qu'elle possède une activité pro-mitogénique (Rubanyi GM., 1994).

1.3.2.1.1 Rôles vasodilatateur et vasoconstricteur de l'ET-3

L'ET-3 diffère de l'ET-1 d'un point de vue de son profil pharmacologique et de ses activités vasodilatatrice et vasoconstrictrice (Inoue et al., 1989). Ainsi, selon la littérature, l'ET-3 serait 20 fois moins puissante que l'ET-1 (Yanagisawa et al., 1988a). Cependant, l'ET-3 serait un vasodilatateur plus sélectif que l'ET-1 et entraînerait la relâche d'EDRF à une dose 100 fois plus faible que celle nécessaire pour induire une vasoconstriction (Warner et al., 1989b).

Chez le chat, l'administration intraveineuse d'ET-3 a induit une réduction de la pression artérielle et une augmentation du débit sanguin aortique alors qu'une réduction du débit sanguin et une augmentation de la résistance vasculaire ont été observées au niveau mésentérique (Minkes et al., 1989). Une étude réalisée par le groupe de Lipton a démontré que l'administration de l'ET-3 a favorisé une vasodilatation de la circulation pulmonaire du chat lorsque le tonus vasculaire de cette circulation avait été augmenté avec un analogue du TxA_2 (Lipton et al., 1991). De plus, l'administration d'ET-3 chez des rats conscients (Yanagisawa et al., 1988a) et anesthésiés (Spokes et al., 1989) a causé une réduction transitoire de la pression artérielle suivie d'une augmentation soutenue de la pression artérielle. De plus, l'administration *in vitro* d'ET-3 a entraîné une vasoconstriction dose-dépendante de l'aorte de porc (Rodman et al., 1989) et des artères de résistance

pulmonaires humaines (Arai et al., 1990), de porc (Rodman et al., 1989) et de rat (Arai et al., 1990). Alors que l'administration intraveineuse d'une faible dose d'ET-3 chez le rat a produit une vasodilatation des lits vasculaires rénaux (Gardiner et al., 1990) et mésentériques (Warner et al., 1989a). En ce qui concerne le lit vasculaire mésentérique, cette vasodilatation a pu être inhibé par le L-NMMA, un inhibiteur de la NOS, suggérant que cette vasodilatation implique la relâche d'EDRF (Fukuda et al., 1990). Ces quelques données suggèrent que les effets vasodilatateurs et vasoconstricteurs de l'ET-3 dépendront de la dose utilisée ainsi que du lit vasculaire et de l'espèce étudiés.

1.3.2.1.2 Développement du système nerveux entérique et des mélanocytes

Les expériences d'inactivation de gène du système ET chez la souris ont démontré l'importance physiologique de ce système dans le développement embryonnaire et néonatal. L'ET-3, le R-ET_B ainsi que l'ECE-1 sont nécessaires au développement des mélanocytes de l'épiderme dérivés de la crête neuronale ainsi qu'au développement du système nerveux entérique (SNE) (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994; Yanagisawa et al., 1998b). Ainsi, les souris invalidées pour les gènes codant pour l'ET-3 et le R-ET_B sont viables à la naissance toutefois, en absence de développement, elles meurent après trois à six semaines. Ces souris n'ont pas de mélanocytes au niveau de l'épiderme ce qui entraîne un défaut de pigmentation de la peau. De plus, le développement des neurones mésentériques est incorrect ce qui entraîne un dysfonctionnement intestinal et la mort des animaux (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994; Yanagisawa et al., 1998b). Ainsi, pour le développement régulier du SNE, le R-ET_B présent sur les cellules dérivées de la crête neuronale doit avoir été préalablement activé par l'ET-3.

1.3.2.2 Rôles pathophysiologiques

L'implication pathophysiologique de l'ET-3 a été suggérée dans certaines maladies. En effet, une augmentation des concentrations plasmatiques d'ET-3 a été observée chez les patients sous hémodialyse chronique (Miyachi et al., 1991) ainsi que chez les patients atteints d'une cirrhose (Tsai et al., 1995) ou d'une glomérulonéphrite (Wolf et al., 1998). De plus, des études d'inactivation du gène codant pour l'ET-3 réalisées chez la souris ont démontré que ce peptide pourrait être impliqué dans certaines formes humaines de la maladie de Hirschsprung (MH) (Parisi et al., 2000).

1.3.2.2.1 Maladie de Hirschsprung

La MH est une maladie génétique rare qui est caractérisée par une malformation congénitale au niveau du SNE. Une absence de cellules ganglionnaires nerveuses est observée au niveau de la paroi digestive. Cette absence de cellules nerveuses provoque une paralysie intestinale. Malgré le retrait du segment aganglionnaire, certains patients ont des problèmes postopératoires (20%) (Baillie et al., 1999). Afin d'améliorer les traitements de la MH, il est nécessaire de comprendre le développement normal du SNE.

Durant l'embryogénèse, le développement du SNE du côlon est principalement dérivé des cellules de la crête neuronale qui pénètrent le mésenchyme du petit intestin et migrent vers le rectum afin de coloniser les intestins en entier (Le Douarin et al., 1973; Yntema et al., 1954; Young et al., 1998). Bien que plusieurs des mécanismes responsables de la colonisation du colon par les cellules de la crête neuronale demeurent inconnus, un système de signalisation impliquant le R-ET_B et son ligand a été suggéré comme étant crucial (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994). En effet, le R-ET_B et l'ET-3 ont été reconnus comme étant nécessaires à la colonisation complète du côlon puisque des souris invalidées pour les gènes codant ces deux protéines présentent une absence de cellules ganglionnaires nerveuses au niveau du côlon et du rectum (Hosoda et al., 1994).

Ces mêmes mutations ont été observées chez certains patients souffrant de la MH (Parisi et al., 2000). En effet, des mutations génétiques hétérozygotes du R-ET_B ont été détectées chez des patients asymptomatiques souffrant de la MH de même que des mutations homozygotes du R-ET_B et de l'ET-3 ont été détectées chez des patients atteints de la MH associée au syndrome de Waardenburg de type 2 (Branski et al., 1979; Omenn et al., 1979). Ces données confirment l'implication de l'ET-3 et du R-ET_B dans la pathophysiologie de certaines formes humaines de la MH.

1.3.2.2.2 Hypertension pulmonaire

Il est bien connu que le système ET est activé en condition d'HTP et que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'ET s'avère un traitement efficace chez les patients souffrant de cette pathologie. L'idée de l'implication de l'ET-3 dans cette maladie provient de récentes études expérimentales et cliniques. En effet, nous avons récemment évalué l'implication des R-ET_A et ET_B dans la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-3 et nous avons de plus examiné l'implication potentielle de l'ET-3 dans l'HTAP induite par l'administration de MCT (Sauvageau et al., 2008). Nous avons démontré qu'en condition contrôle, il était nécessaire de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin d'inhiber la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-3 (Sauvageau et al., 2008) alors qu'en condition d'HTAP, l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A était suffisante pour inhiber complètement la réponse induite par l'ET-3. De plus, une tendance à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'ET-3 ainsi qu'une élévation du ratio ET-1/ET-3 ont été observées chez les rats MCT. Les résultats de cette étude suggèrent que l'ET-3, tout comme l'ET-1, pourrait participer au développement et au maintien de l'HTAP. Une étude réalisée par le groupe de Chang a démontré, tout comme notre étude, que les niveaux plasmatiques d'ET-3 n'étaient pas élevés chez des patients souffrant d'une pathologie cardiaque valvulaire et d'HTP (Chang et al., 1993). Alors qu'une récente étude réalisée par Montani *et al* a suggéré pour la première fois que les niveaux plasmatiques

d'ET-3 étaient réduits chez des patients souffrant d'HTAP de diverses étiologies et que ces niveaux corrélaient positivement avec les paramètres cliniques de sévérité de l'HTAP (Montani et al., 2007). Ils ont aussi démontré que le ratio ET-1/ET-3 était augmenté et qu'il serait en mesure de donner plus d'informations sur la pathologie que la mesure seule de l'ET-1.

1.4 Récepteurs couplés aux protéines G

La majorité des gènes codants pour les récepteurs de surface membranaire appartient à la superfamille des RCPG. Cette dernière représente la plus grande famille de récepteurs cellulaires au niveau du génome des mammifères. Chez l'homme, des 1000 gènes qui encodent les RCPG, plusieurs (300-400) sont responsables de l'induction des effets de ligands endogènes. Ainsi, ils sont à la base de plusieurs processus physiologiques et sont en conséquence ciblés par plusieurs drogues cliniques importantes.

Les RCPG partagent tous une structure similaire serpentine qui est caractérisée par 7 hélices transmembranaires, un domaine amino-terminal extracellulaire et un domaine carboxyle-terminal intracellulaire. La région extracellulaire est responsable de la liaison du ligand alors que la région intracellulaire est impliquée dans la signalisation intracellulaire. Ainsi, l'interaction entre un ligand et son RCPG entraîne un changement conformationnel du domaine transmembranaire du récepteur et permet l'interaction entre le récepteur et la protéine G. Cette interaction engendre l'activation de la signalisation intracellulaire et l'induction d'une réponse physiologique (Lefkowitz et al., 1993) (Figure 17). Basé sur leurs similitudes, les RCPG sont classés en trois grandes classes, A (*rhodopsin type receptor*), B (*secertin/glucagon receptor*) et C (*metabotropic neurotransmitter and Ca²⁺- sensing receptor*).

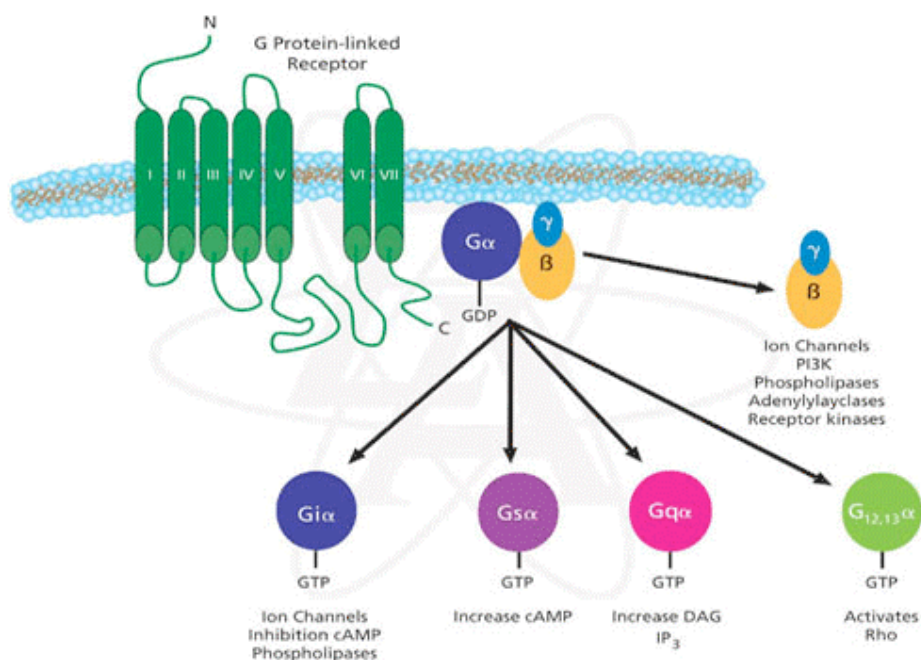


Figure 17. Mode d'action des récepteurs couplés aux protéines G (www.images.google.ca)

1.4.1 Dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG ont toujours été acceptés comme des entités existant et fonctionnant sous forme de monomères. Toutefois, en 1982 Agnati *et al* (Agnati et al., 1982) ont proposé pour la première fois que les RCPG pouvaient exister et fonctionner sous forme de dimères. À cette époque, le nouveau concept de dimérisation ne fut guère accepté par la communauté scientifique mais, depuis quelques années, plusieurs données pharmacologiques et biochimiques ont favorisé l'émergence d'une nouvelle vision suggérant que la majorité sinon tous les RCPG fonctionnent sous forme de dimères ou d'oligomères (Figure 18) (George et al., 2002; Kroeger et al., 2003).

Receptor	Heterodimer Partner	Negative Controls	Effect of Heterodimerization	Reference
5-HT _{1B}	5-HT _{1D}		n.d.	Xie et al., 1999
Adenosine A1	Dopamine D1	Dopamine D2	Signaling	Gines et al., 2000
Adenosine A1	P2Y ₁		Pharmacology	Yoshioka et al., 2001, 2002a, 2002b
Adenosine A1	mGluR1 α	mGluR1 β	Signaling	Ciruela et al., 2001
Adenosine A2A	Dopamine D2	Dopamine D1	Internalization, signaling	Hillion et al., 2002; Canals et al., 2003; Ferre et al., 2004
Adenosine A2A	mGluR5	mGluR1 β	Signaling	Ferre et al., 2002
Angiotensin 1A	Angiotensin 2		Signaling	AbdAlla et al., 2001a
Angiotensin 1A	β_2 AR		Signaling, trafficking	Barki-Harrington et al., 2003
Angiotensin 1A	Bradykinin B2		Internalization, pharmacology, signaling	AbdAlla et al., 2000, 2001b
Calcium sensing receptor	mGluR1 and mGluR5		Trafficking	Gama et al., 2001
CCR2	CXCR4 and CCR5		Signaling, reduction of HIV infection	Mellado et al., 2001; Rodriguez-Frade et al., 2004
CCR5	δ -, κ -, and μ -OPR		Desensitization	Suzuki et al., 2002; Chen et al., 2004
Cholecystokinin A	Cholecystokinin B	β_2 AR	Signaling, internalization	Cheng et al., 2003
Dopamine D1	Dopamine D2		Signaling	Lee et al., 2004
Dopamine D2	SSTR5		Pharmacology, signaling	Rocheville et al., 2000a
Dopamine D2	Dopamine D3		Pharmacology	Scarselli et al., 2001; Maggio et al., 2003
Endothelin A	Endothelin B		Internalization	Gregan et al., 2004
GABA _B R1	GABA _B R2		Gain of function, pharmacology	Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998; Kuner et al., 1999; Martin et al., 1999; Ng et al., 1999
Melatonin MT1	Melatonin MT2	β_2 AR	n.d.	Ayoub et al., 2002, 2004
Muscarinic M2	Muscarinic M3		Pharmacology	Maggio et al., 1999
Oxytocin	Vasopressin V1a and V2	GABA _B R2	n.d.	Terrillon et al., 2003; Devost and Zingg, 2004
S1P1	S1P2 and S1P3	LPA1	n.d.	Van Brocklyn et al., 2002
SSTR1	SSTR5	SSTR4	Internalization, pharmacology, expression	Rocheville et al., 2000b; Patel et al., 2002; Grant et al., 2004a
SSTR2A	SSTR3		Desensitization	Pfeiffer et al., 2001
SSTR2A	μ -OPR		Desensitization	Pfeiffer et al., 2002
Substance P (NK1)	μ -OPR		Internalization, desensitization	Pfeiffer et al., 2003
TRHR1	TRHR2	GnRHR	Internalization	Hanyaloglu et al., 2002
Vasopressin V1a	Vasopressin V2		Internalization	Terrillon and Bouvier, 2004a; Terrillon et al., 2003, 2004
α_{1B} AR	α_{1A} AR	β_2 AR, NK1, CCR5	Internalization	Stanasila et al., 2003; Uberti et al., 2003
α_{1B} AR	Histamine H ₁		n.d.	Carrillo et al., 2003
α_{1D} AR	α_{1B} AR	α_{1A} AR	Gain of function, internalization	Uberti et al., 2003; Hague et al., 2004b
α_{1D} AR	β_2 AR	β_1 AR	Gain of function, internalization	Uberti et al., 2005
α_{2A} AR	β_1 AR		Internalization, pharmacology	Xu et al., 2003
α_{2A} AR	μ -OPR		Signaling	Jordan et al., 2003
β_1 AR	β_2 AR		Internalization, pharmacology, signaling	Lavoie et al., 2002; Mercier et al., 2002; Lavoie and Hebert, 2003
β_2 AR	δ -, κ -OPR		Internalization, signaling	Jordan et al., 2001; McVey et al., 2001; Ramsay et al., 2002
β_2 AR	β_2 AR	GABA _B R2	Internalization, signaling	Breit et al., 2004
β_2 AR	M71-OR		Gain of function, internalization	Hague et al., 2004a
κ -OPR	δ -OPR	μ -OPR	Internalization, pharmacology, signaling	Jordan and Devi, 1999
μ -OPR	δ -OPR		Pharmacology, signaling	George et al., 2000; Gomes et al., 2000, 2004

n.d., not determined.

Figure 18. Liste succincte des RCPG pouvant former des hétérodimères (Prinster et al., 2005)

Même si le concept de dimérisation des RCPG est dorénavant accepté par la communauté scientifique, son importance fonctionnelle demeure encore controversée.

1.4.1.1 Dimérisation, réticulum endoplasmique et expression à la surface cellulaire

Plusieurs études ont démontré que de nombreux RCPG pouvaient former des dimères lors de leur synthèse au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Floyd et al.,

2003;Issafras et al., 2002;Overton et al., 2002) ou lors de leur maturation dans l'appareil de golgi (Bulenger et al., 2005). En réalité, pour plusieurs de ces protéines, la dimérisation ou l'oligomérisation est essentielle puisqu'elle permet de masquer certains signaux qui autrement entraîneraient leur rétention au niveau du RE (Reddy et al., 1998). Les premières démonstrations de l'importance du RE dans cette étape proviennent d'études réalisées sur les récepteurs métabotropiques gamma amino butyriques (GABA). Il existe deux types de récepteur GABA, le GABA_BR1 et le GABA_BR2 (Marshall et al., 1999a) et lorsque GABA_BR1 est exprimé seul, il est retenu au niveau intracellulaire comme une protéine immature puisqu'il possède, à la partie carboxyle-terminal, un signal de rétention au RE (Marshall et al., 1999b). À l'opposé, le GABA_BR2 pourra être exporté à la membrane cellulaire lorsqu'il est exprimé seul mais il demeure toutefois non-fonctionnel (Marshall et al., 1999b). Lorsque ces deux récepteurs sont co-exprimés, l'hétérodimérisation masque le signal de rétention du GABA_BR1 permettant ainsi le transport du dimère fonctionnel à la membrane plasmique (Marshall et al., 1999a). Des résultats similaires ont été obtenus avec les récepteurs adrénergiques (AR) et les récepteurs du goût (T1R1, T1R2, T1R3). En effet, dans la plupart des systèmes hétérologues lorsque le récepteur α_{1D} AR est exprimé seul, il est retenu au niveau du RE et ne pourra donc pas être exporté à la membrane cellulaire (Uberti et al., 2003). De même, l'expression de deux ou trois sous-unités des récepteurs du goût est essentielle pour la formation de récepteurs fonctionnels à la membrane cellulaire (Zhao et al., 2003).

1.4.1.2 Régulation de la dimérisation

La dimérisation des RCPG n'exclut pas la possibilité d'une régulation de l'état oligomérique du récepteur lorsque ce dernier est exprimé à la surface cellulaire. Il est toutefois incertain si l'activation du récepteur par un agoniste peut favoriser ou inhiber la dimérisation. Ceci est pourtant une question centrale ayant des implications importantes sur la régulation et l'activation des récepteurs. En effet, plusieurs études suggèrent que la liaison de l'agoniste au dimère peut favoriser la formation de celui-ci (Angers et al.,

2000;Horvat et al., 2001;Rocheville et al., 2000) ou l'inhiber (Cheng et al., 2001;Gines et al., 2000;Gregan et al., 2004) alors que plusieurs autres études ont démontré que l'homodimérisation et l'hétérodimérisation étaient des processus constitutifs ne pouvant être modifiés par la liaison d'un agoniste (Babcock et al., 2003;Evans et al., 2008a;Overton et al., 2000). Ces contradictions peuvent en fait refléter les différents comportements des divers récepteurs étudiés ou encore les différentes techniques qui ont été utilisées dans chacune des études.

1.4.1.3 Dimérisation et signalisation intracellulaire

La dimérisation pourrait avoir d'importantes répercussions au niveau de la signalisation intracellulaire. En effet, celle-ci pourrait entraîner non seulement une potentialisation ou une diminution de la signalisation intracellulaire mais pourrait aussi entraîner une modification du type de protéines G (Gs, Gq, Gs, Gi) qui est couplé au récepteur. Des études ont démontré que la dimérisation pouvait favoriser une potentialisation de la signalisation intracellulaire, pour les récepteurs des opioïdes δ et μ (Gomes et al., 2000), les récepteurs aux chémokines CCR₅/CCR₂(Mellado et al., 2001), ainsi que pour les récepteurs à l'angiotensine AT1/bradykinine B2 (bdAlla et al., 2000) alors qu'une diminution de la signalisation a été décrite pour les récepteurs aux somatostatines SST_{2a}/SST₃(Pfeiffer et al., 2001) ainsi que pour le récepteur adénosine A₁/dopamine D1(Gines et al., 2000). Une étude réalisée par le groupe de George a démontré que lorsque les récepteurs aux opioïdes μ et δ étaient co-exprimés dans des cellules COS-7, une perte du couplage à la protéine Gi était observée (George et al., 2000). En revanche, pour les récepteurs aux chémokines CCR₅ et CCR_{2b}, un couplage à la protéine G₁₁ est observé lorsqu'ils sont co-exprimés (Mellado et al., 2001). De plus, une étude réalisée sur les récepteurs GABA a démontré que la co-expression de GABA_BR1 et GABA_BR2 était essentielle à la formation d'un récepteur qui peut lier la protéine G (Galvez et al., 2001;Margeta-Mitrovic et al., 2000) suggérant ainsi que la co-expression des deux récepteurs GABA_B est nécessaire à leur fonction (Marshall et al., 1999b).

La vision classique de l'activation des protéines G est basée sur la croyance qu'un récepteur interagit avec une seule protéine G hétérotrimérique à la fois. Toutefois, ce concept devrait être réévalué en tenant compte de la dimérisation. La grande question demeure de savoir si un dimère active une ou deux protéines G à la fois? Des études d'évaluation de la structure d'interface entre un récepteur et une protéine G ont mené à l'identification de plusieurs points de contact entre les sous-unités α et $\beta\gamma$ de la protéine G et le récepteur (Hamm., 2001). Pourtant, la structure cristalline du récepteur à la rhodopsine démontre que la surface cytoplasmique est trop petite pour permettre l'accommodation simultanée de ces deux points de contact. En conséquence, il a été proposé que deux récepteurs pourraient être nécessaires pour satisfaire les besoins d'une seule protéine G (Hamm., 2001). Alors que d'autres études ont plutôt suggéré que les deux récepteurs activaient une seule et unique protéine G (George et al., 2003;Hebert et al., 1996). Ainsi, des études additionnelles seront nécessaires afin de déterminer si les dimères interagissent avec une seule protéine G à la fois ou deux.

1.4.1.4 Dimérisation et pertinence physiologique

Jusqu'à maintenant les systèmes de surexpression hétérologue ont été les modèles les plus couramment utilisés dans l'étude des conséquences fonctionnelles de la dimérisation des RCPG. Ceci soulève donc la question à savoir si la dimérisation existe aussi *in vivo*. Par exemple, la co-expression artificielle de récepteurs qui ne sont habituellement pas co-exprimés *in vivo* pourrait mener à des conclusions erronées. Bien que la majorité des études tentent de maintenir les niveaux d'expression dans les normes physiologiques, les niveaux élevés d'expression de la plupart de ces systèmes peuvent entraîner la formation d'interactions artéfactuelles. En effet, cette possibilité a été confirmée dans une étude réalisée par le groupe de Ramsay qui a démontré que les récepteurs opioïde (δ et κ) et β_2 -AR pouvaient seulement former des hétérodimères dans des cellules HEK293 lorsqu'ils étaient fortement surexprimés (Ramsay et al., 2002). En effet, 250 000 copies du récepteur par cellule étaient nécessaires pour visualiser cette

hétérodimérisation. Néanmoins, la pertinence physiologique de l'hétérodimérisation est supportée par des études qui ont évalué la dimérisation de RCPG habituellement co-exprimés de façon endogène (bdAlla et al., 2000;Gomes et al., 2000).

Plusieurs observations mentionnées précédemment démontrent que l'homodimérisation et l'hétérodimérisation pourraient grandement influencer plusieurs aspects biologiques tels que la signalisation intracellulaire et l'expression des RCPG à la membrane cellulaire. Pourtant, plusieurs autres études seront nécessaires afin 1) de démontrer que la dimérisation existe *in vivo*, 2) d'identifier l'interface de dimérisation et l'organisation structurelle tridimensionnelle des dimères, 3) de déterminer les règles qui gouvernent la sélectivité de l'interaction entre les récepteurs, 4) de déterminer la stœchiométrie de l'interaction entre les récepteurs et finalement 5) de déterminer si les complexes oligomériques, incluant plus de deux récepteurs, existent.

1.4.2 Dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B

La dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B pourrait expliquer plusieurs des résultats divergents obtenus dans le passé par divers groupes de recherche. Ces derniers avaient alors proposé la présence de nouveaux sous-types de récepteur ou encore la possibilité d'une régulation croisée entre la signalisation intracellulaire activée par les récepteurs ET_A et ET_B. En effet, Fukuroda *et al* ont démontré que la contraction bronchique humaine induite par l'ET-1 n'était pas bloquée par l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A ou ET_B alors que la combinaison des deux antagonistes entraînait l'inhibition de la réponse induite par l'ET-1 (Fukuroda et al., 1996). Des résultats similaires ont été observés au niveau de tissus exprimant les récepteurs ET_A et ET_B comme la trachée de rat (Clozel et al., 1995) et de lapin (Yoneyama et al., 1995), la veine saphène (Nishiyama et al., 1995) et les artères pulmonaires de lapin (Fukuroda et al., 1994c) ainsi qu'au niveau de l'oreillette de rat (Sokolovsky et al., 1994). Toutefois, ce n'est qu'en 2002 qu'a été faite la première démonstration que les récepteurs ET_A et ET_B pouvaient former des dimères fonctionnels. En effet, Harada *et al* ont démontré, à l'aide d'une technique quantitative

d'autoradiographie, que les récepteurs ET_A et ET_B pouvaient former des dimères au niveau de l'hypophyse antérieure de rat (Harada et al., 2002). Ils ont proposé plusieurs scénarios d'hétérodimérisation. Ils ont suggéré qu'il existait, en plus des dimères ET_A/ET_B , des monomères du R- ET_A indépendants du complexe ET_A/ET_B . Ainsi, ils ont proposé que l'ET-1 se lie de façon préférentielle au R- ET_A mais ce n'est qu'une fois que celui-ci est occupé par un antagoniste (BQ-123) que l'ET-1 peut alors se lier au R- ET_B (Harada et al., 2002). En 2004, le groupe de Gregan a aussi démontré à l'aide d'études d'immunoprécipitation et de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) que les récepteurs ET_A et ET_B pouvaient former des dimères fonctionnels dans les cellules HEK293. Ils ont toutefois proposé que cette dimérisation était réversible puisque la dissociation des récepteurs ET_A et ET_B a été observée suite à une incubation prolongée avec un agoniste sélectif ET_B (S6c) (Gregan et al., 2004). Une récente étude réalisée par le groupe de recherche de Walker a confirmé que les récepteurs ET_A et ET_B formaient des dimères au niveau des cellules HEK293. Ils suggèrent toutefois que cette dimérisation est constitutive puisque l'incubation des cellules en présence d'ET-1 ou de S6c n'a entraîné aucune modification du nombre de dimères (Evans et al., 2008a). De plus, nous avons démontré à l'aide d'étude de co-immunoprécipitation que les récepteurs ET_A et ET_B pouvaient former des hétérodimères au niveau des artères de résistance pulmonaires de rat sham et infarctus (Sauvageau et al., 2006). Ainsi, la dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B pourraient offrir une explication aux nombreux résultats inexplicables obtenus dans le passé.

1.4.3 Techniques utilisées pour la détection des dimères

De façon à vérifier si les dimères existent au niveau des cellules viables, plusieurs méthodes pharmacologiques (études de liaison) et techniques biochimiques (études de co-immunoprécipitation et études d'inactivation radioactive) et biophysiques (FRET et BRET) ont été développées et utilisées afin d'observer les interactions protéine-protéine *in situ*.

1.4.3.1 Études de Co-immunoprécipitation

Les études de co-immunoprécipitation représentent l'une des techniques immunochimiques les plus couramment utilisées pour évaluer les interactions protéine-protéine. L'immunoprécipitation consiste à précipiter une protéine cible, présente dans une cellule ou dans un tissu homogénéisé, à l'aide d'un anticorps spécifique pour visualiser par la suite, par immunobuvardage de type Western, si celle-ci est associée et forme donc un dimère avec une autre protéine. Toutefois, l'une des limitations majeures de cette technique est la possibilité d'obtenir une agrégation artéfactuelle (en raison de la nature hydrophobique des RCPG) durant le processus de solubilisation. De plus, cette technique n'est pas suffisamment sensible pour permettre d'évaluer l'effet d'un agoniste sur la dimérisation du récepteur. En effet, un changement de l'immunoréactivité détectée pourrait en fait n'être que la conséquence d'un changement conformationnel influençant la reconnaissance de l'épitope induit par l'agoniste plutôt qu'une variation du nombre de dimères.

1.4.3.2 Études de FRET et de BRET

Le BRET (*Bioluminescence resonance energy transfer*) et le FRET sont toutes deux des techniques qui ont été utilisées pour observer les interactions protéine-protéine directement au niveau des cellules. La technique de BRET permet la mesure du transfert, à la protéine GFP (*Green fluorescence protein*), de l'énergie de la lumière émise par la dégradation catalytique de la coelenterazine par la Renilla Luciférase. L'excitation du GFP peut seulement être mesurée lorsque les deux protéines se retrouvent à une distance de moins de 50 Å. La technique de FRET est semblable à celle de BRET à l'exception de la molécule donatrice d'énergie, qui est ici une variante de la GFP soit la CFP (*Cyant Fluorescent Protein*), qui est excitée par une lumière externe. Ainsi l'énergie émise par la CFP excitée est utilisée pour exciter une autre molécule réceptrice d'énergie,

une autre variante de la GFP soit la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), lorsque les deux molécules se retrouvent à une distance de moins de 100 Å.

Le BRET et FRET sont toutes deux des techniques qui présentent quelques limitations. En effet, elles ne permettent pas d'identifier le compartiment cellulaire où la dimérisation a lieu ni de faire la distinction entre un réarrangement spatial et une dissociation du dimère. De plus, puisque le transfert d'énergie se réalise sur une courte distance, les signaux générés par le BRET et le FRET n'impliquent pas nécessairement une interaction physique entre les deux protéines. La technique de FRET présente aussi un autre problème majeur car l'excitation de la molécule donatrice d'énergie par la source lumineuse externe peut à elle seule entraîner l'excitation indirecte de la molécule réceptrice d'énergie. Ainsi, il est important de soustraire l'énergie causée par l'excitation croisée lors de la quantification de l'énergie libérée par la molécule réceptrice.

1.4.4 Techniques utilisées pour la répression des récepteurs à l'ET

Il est possible de rendre un gène «silencieux» en déstabilisant son ARNm. En effet, cette déstabilisation permet de prévenir la synthèse de la protéine que le gène encode. Les ARN d'interférences (ARNi) et les oligonucléotides (ON) antisens (AS) représentent deux techniques utilisées pour prévenir la synthèse de protéine cible. Dans la prochaine section, nous aborderons seulement les ON-AS puisqu'ils ont été utilisés dans la deuxième étude de cette thèse de doctorat.

1.4.4.1 Oligonucléotides antisens

Le pouvoir antisens des oligodeoxynucléotides a été découvert en 1978 par Zamecnik et Stephenson (Zamecnik et al., 1978). Depuis ce temps, la technologie des ON-AS a été développée et est considérée comme un puissant outil thérapeutique. Théoriquement, les molécules AS pourraient être utilisées dans le traitement de toutes les maladies causées par l'expression d'un gène délétère, telles que les infections virales ou

encore les pathologies inflammatoires. Bien qu'élégante en théorie, l'approche AS s'est avérée beaucoup plus complexe lors de son application pratique.

Les ON-AS sont de courtes séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) synthétiques (15 à 20 nucléotides) chimiquement modifiées et construites pour se lier de façon complémentaire à une région spécifique de l'ARNm du gène que nous souhaitons inhiber. L'affinité du pairage complémentaire des nucléotides par Watson-Crick permet l'interaction de l'ON avec l'ARN ciblé. Un avantage majeur des ON-AS est le potentiel de spécificité obtenu par simple interaction complémentaire. De plus, une connaissance de la fonction, de la structure ainsi que de la localisation de la protéine n'est pas essentielle car la seule information nécessaire à l'utilisation des ON-AS est la séquence d'acide nucléique de la protéine d'intérêt.

1.4.4.1.1 *Phosphorothioate*

Les phosphodiesteres (PD) non-modifiés ont été les premières molécules AS à être synthétisées il y a plus de deux décennies. Ces molécules possèdent généralement un groupe réactif qui permet la liaison irréversible du PD à la séquence spécifique de l'ARN empêchant ainsi la polymérase ou le ribosome de se lier à l'ADN ou à l'ARN ciblé (Belikova et al., 1967;Knorre et al., 1985;Zamecnik et al., 1978). Toutefois, les PD sont rapidement dégradés par les nucléases cytoplasmiques et nucléaires dans le milieu de culture ainsi que dans les fluides biologiques *in vivo* et de plus, leur incorporation cellulaire est difficile (Akhtar et al., 1992). En conséquence, afin de rendre possible l'utilisation des ON-AS à des fins thérapeutiques, il a été nécessaire d'améliorer leur stabilité et leur incorporation cellulaire tout en préservant leur spécificité. Ainsi, plusieurs modifications structurelles ont été apportées à chacune des composantes de la molécule. Une de ces modifications est le remplacement d'un atome d'oxygène non pairé par une molécule de soufre. C'est ainsi que les phosphorothioates (PTO) ont fait leur apparition.

Les PTO représentent la première génération d'ADN analogue et sont considérés aujourd'hui comme étant les plus utilisés et les mieux connus. La résistance des PTO à la dégradation par les nucléases a été établie en 1968 par Matzura et Eckstein (Matzura et al., 1968). Toutefois, la synthèse des PTO à des fins thérapeutiques n'a vu le jour qu'en 1987 (Agrawal et al., 1988). Cette synthèse avait pour but d'augmenter la résistance aux nucléases allongeant ainsi leur demie-vie jusqu'à neuf ou dix heures (sérum humain) comparativement à une heure pour les PD (Campbell et al., 1990;Phillips et al., 2000). En plus de leur grande résistance aux nucléases, les PTO possèdent une charge négative facilitant leur incorporation cellulaire. Les PTO induisent leurs effets via l'activation de la RNaseH (Figure 19) (Cummins et al., 1996;Rait et al., 1999). La RNaseH est une enzyme responsable de la dégradation du brin d'ARN présent dans l'hétéroduplexe ARN-ADN localisé au niveau du cytoplasme et du noyau. Un des désavantages majeurs des PTO est leur capacité de liaison à certaines protéines telles que des protéines de liaison à l'héparine (Brown et al., 1994). Les causes de cette interaction non-spécifique demeurent inconnues toutefois, cette interaction pourrait entraîner une toxicité cellulaire.

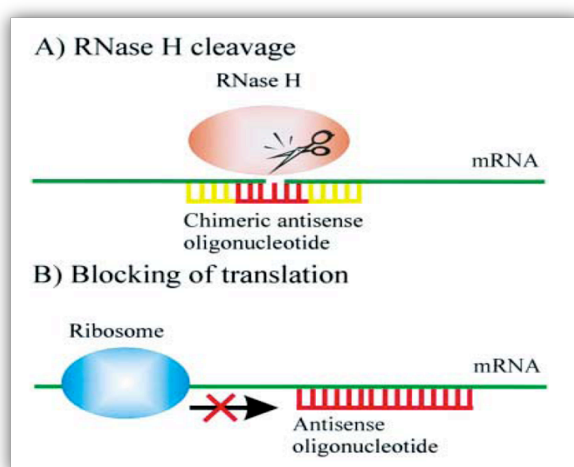


Figure 19. Mécanisme d'action des PTO (Kurreck., 2003)

1.5 Traitements de l'hypertension artérielle pulmonaire

Il est important de noter que les divers traitements présentement disponibles pour les patients souffrant d'HTAP n'ont pas été approuvés en raison de leur capacité à réduire la pression artérielle pulmonaire mais plutôt en raison du fait qu'ils permettent d'améliorer la performance des patients lors d'un test de marche (distance de marche sur 6 minutes, 6MWD). Ainsi, présentement, aucune des approches thérapeutiques utilisées pour le traitement de l'HTAP n'est curative. Toutefois, depuis les vingt dernières années, l'HTAP a évolué d'une maladie sans espoir à une pathologie pour laquelle il est dorénavant possible d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients atteints.

Tout patient souffrant d'HTAP doit subir un test de vasoréactivité aiguë durant lequel on administre un vasodilatateur de courte durée d'action tel que le NO, la PGI₂ ou l'adénosine. La réponse est jugée positive si on obtient une réduction d'au moins 10 mm Hg de la pression artérielle pulmonaire moyenne ou que cette dernière se retrouve à une valeur au-dessous de 40 mm Hg. Une réponse positive indique que le patient pourrait alors bénéficier d'un traitement avec des inhibiteurs des canaux calciques (CCB) (Sitbon et al., 2005).

1.5.1 Inhibiteurs des canaux calciques

Seulement 10 à 15% des patients souffrant d'HTAP obtiennent une réponse positive au test de vasoréactivité aiguë. De ces patients, seulement 50% pourront possiblement bénéficier à long terme de cette thérapie (Sitbon et al., 2005). Ainsi, les patients qui présentent des diminutions de pressions pulmonaires suite à l'administration d'un vasodilatateur ont un excellent pronostic de survie sur 3 ans. Les CCB les plus couramment utilisés sont la nifedipine et le diltiazem (Rich et al., 1992).

Pour tous les autres patients répondant négativement au test de vasoréactivité aiguë, les traitements disponibles ciblent les voies de la PGI₂, du NO et du système ET (Figure 20).

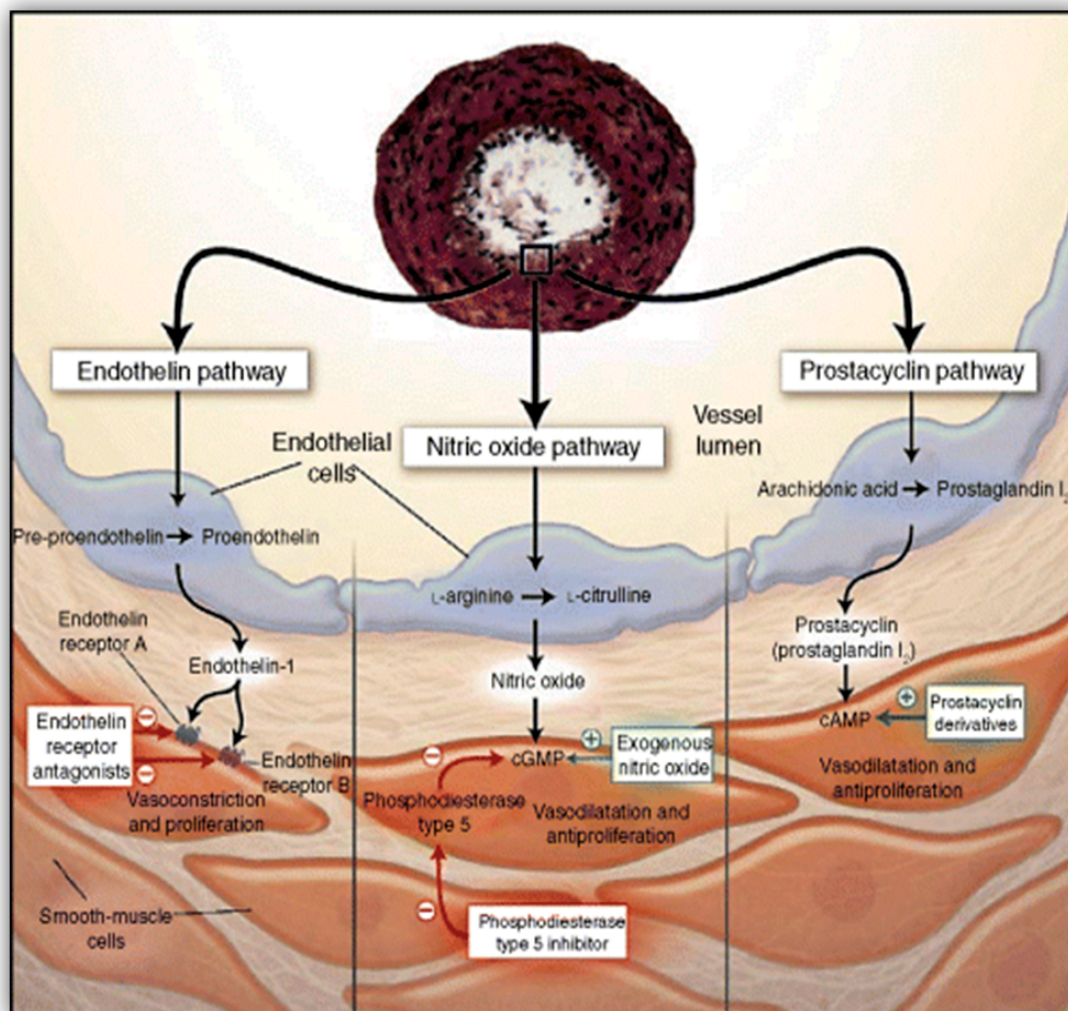


Figure 20. Les cibles thérapeutiques de l'HTAP (Humbert et al., 2004c)

1.5.2 Voie de la PGI₂

L'utilisation thérapeutique de PGI₂ ou d'analogues de la PGI₂ est basée sur le fait qu'une condition d'HTAP provoque un déséquilibre entre la production et la relâche de PGI₂ et de TxA₂ (Christman et al., 1992). Il existe présentement quatre médicaments ciblant la voie de la PGI₂ soit l'époprostenol, le treprostinil, l'iloprost et le beraprost.

En 1995, l'époprostenol a été le premier médicament approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement de l'HTAP. Une thérapie d'administration

chronique de l'époprostenol est indiquée chez les patients répondant négativement au test de vasoréactivité aiguë et démontrant des signes de dysfonction ventriculaire droite. L'époprostenol est administré par voie intraveineuse et semble être efficace chez les patients de classes II à IV. Une étude réalisée chez 81 patients souffrant d'HTAPI de classe III ou VI traités avec l'époprostenol pendant 3 mois a démontré une amélioration des paramètres hémodynamiques ainsi que du pronostic, de la classe fonctionnelle et du test de 6MWD comparativement aux patients qui étaient uniquement sous thérapie conventionnelle (Barst et al., 1996). Malgré ces effets bénéfiques, l'administration parentérale de PGI₂ est extrêmement complexe puisqu'elle requière l'implantation d'un cathéter intraveineux pour l'administration continue du médicament. Aussi, plusieurs effets indésirables ont été rapportés tels que des maux de tête, des nausées et des douleurs aux jambes qui pourraient être directement reliés à la méthode d'administration du médicament. Bien que son efficacité ait été démontrée, l'époprostenol est loin d'être considéré comme la drogue de choix dans le traitement de l'HTAP.

Le treprostinil est un analogue de la PGI₂ administré par infusion sous-cutanée chronique. Il a été développé afin d'éviter les complications résultant de l'utilisation de cathéters intraveineux. Dans une étude clinique réalisée chez 470 patients souffrant d'HTP de diverses étiologies, l'administration de treprostinil a entraîné une amélioration des paramètres hémodynamiques, du test de 6MWD et des symptômes associés à la pathologie (Simonneau et al., 2002). Depuis 2002, ce médicament a été approuvé aux États-Unis et au Canada.

L'iloprost est un analogue inhalé de la PGI₂. La taille de ses particules assure une administration pulmonaire sélective (Lang et al., 2004;Rosenzweig et al., 2004). Toutefois, sa courte durée d'action nécessite des administrations fréquentes (6-12 fois/jour) (Lang et al., 2004). Une étude de 12 semaines avec l'iloprost (2.5 et 5 µg; 6-9 fois/jour) réalisée en Europe chez 207 patients souffrant d'HTP de diverses étiologies a démontré une amélioration de la classe fonctionnelle et du test de 6MWD (Olschewski et al., 2002). Cependant, aucune étude n'a évalué les effets de l'iloprost à long terme et il n'est donc présentement approuvé qu'en Europe et aux États-Unis.

Le beraprost est un analogue oral de la PGI₂. Une étude réalisée en Europe chez 130 patients souffrant d'HTAP de classe II et III a démontré qu'un traitement de 12 semaines avec le beraprost avait seulement entraîné une amélioration du test de 6MWD chez les patients souffrant d'HTAPI alors que les patients souffrant d'HTAP d'autres étiologies n'ont eu aucune amélioration (Galie et al., 2002). Les effets hémodynamiques à long terme n'ont pas encore été complètement évalués. De ce fait, le beraprost n'est présentement approuvé qu'au Japon et en Corée du sud.

Les effets bénéfiques observés avec les différents traitements ciblant la voie de la PGI₂ découlent probablement de leur capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires en plus de leur effet vasodilatateur sur les artérioles pulmonaires.

1.5.3 Voie du NO

Le NO est un puissant agent vasodilatateur qui induit ses effets via l'activation de la GCs du muscle lisse. Cette activation favorise la production de GMPc et entraîne éventuellement la relaxation du muscle lisse vasculaire. En condition physiologique, la phosphodiesterase de type-5 (PDE5) est responsable de la dégradation du GMPc.

Le sildenafil est un inhibiteur sélectif de la PDE5 à administration orale qui a été initialement utilisé dans le traitement de la dysfonction érectile (Mostafa., 2008). Au niveau de la circulation pulmonaire, ce médicament permet de maintenir des concentrations élevées de GMPc favorisant ainsi la vasorelaxation tout en prévenant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Mostafa., 2008). De nombreuses études ont démontré les effets favorables du sildénafil dans le traitement des patients souffrant d'HTAP (Bhatia et al., 2003; Prasad et al., 2000; Sastry et al., 2004). En effet, une étude réalisée chez 278 patients souffrant d'HTAP de classes II et III traités avec le sildenafil (20, 40 et 80 mg; 3 fois/jour) pendant 12 semaines a démontré une amélioration du test de 6MWD ainsi qu'une amélioration de paramètres tels que la vitalité et la santé générale des

patients (Pepke-Zaba et al., 2008). Ce médicament est présentement approuvé aux Etats-Unis et au Canada.

1.5.4 Voie de l'ET

Il existe présentement trois antagonistes des récepteurs à l'ET-1 utilisés pour le traitement de l'HTAP soit le bosentan, le sitaxsentan et l'ambrisentan. Ces trois médicaments diffèrent d'un point de vue de leur pharmacocinétique, de leur structure chimique ainsi que de leur affinité pour les récepteurs à l'ET-1.

1.5.4.1 Bosentan

Le bosentan est un antagoniste double des récepteurs à l'ET-1 et il possède une affinité 40 fois plus élevée pour le R-ET_A que pour le R-ET_B. Depuis sa première approbation en 2001 par la FDA, le bosentan est maintenant approuvé dans diverses parties du monde. Il est présentement approuvé chez les patients souffrant d'HTAP de classe III (Europe) ou III-IV (Etats-Unis/Canada).

Une étude de phase II (AC-351) réalisée chez 32 patients souffrant d'HTAP a démontré qu'un traitement au bosentan améliore les paramètres hémodynamiques, le test de 6MWD en plus d'entraîner une réduction de la RVP. Dans l'étude de phase III BREATHE-1 (*Bosentan randomized Trial of Endothelin Antagonist THERapy*), l'administration du bosentan (125 et 250 mg) pendant 16 semaines chez 213 patients souffrant d'HTAP a favorisé une amélioration du test de 6MWD, de la classe fonctionnelle ainsi que du TCW (*time to clinical worsening*) (Rubin et al., 2002). Toutefois, une augmentation importante des aminotransférases hépatiques a été observée chez le groupe de patient recevant la dose de 250 mg de bosentan. Pour cette raison, la dose thérapeutique acceptée est de 125 mg. Une étude réalisée chez 169 des patients ayant participé aux études BREATHE-1 et AC-351 a démontré que 96% et 89% de ces patients étaient toujours vivants après 1 et 2 ans de traitement, respectivement (McLaughlin et al., 2005). Puisque l'étude BREATHE-1 n'a seulement été réalisée que chez des patients de classe III et IV, aucune donnée sur les

patients de classe II n'était disponible. Depuis, l'étude EARLY (*Endothelin Antagonist tRial in miLdly symptomatic PAH patients*) a été réalisée chez 185 patients souffrant d'HTAP de classe II. Les résultats préliminaires de cette étude ont démontré que le traitement au bosentan entraînait une réduction de la RVP ainsi qu'une augmentation non-significative du test de 6MWD. De façon plus importante, cette étude démontre que de traiter précocement les patients souffrant d'HTAP permet de prolonger le TCW (résultats non-publiés) (Dupuis et al., 2008).

Des études cliniques avec le bosentan ont aussi été réalisées chez des patients souffrant du syndrome de Eisenmenger (BREATHE-5)(Galie et al., 2006), chez des enfants souffrant d'HTAP (BREATHE-3) (Barst et al., 2003) ainsi que chez des patients souffrant d'HTAP secondaire à une infection au HIV (BREATHE-4) (Sitbon et al., 2004). De plus, l'utilisation du bosentan a aussi été évaluée en combinaison avec d'autres médicaments pour le traitement de l'HTAP. En effet, l'étude BREATHE-2 a évalué les effets d'une co-administration de bosentan et d'epoprostenol, mais aucun effet bénéfique significatif supplémentaire n'a été observé (Humbert et al., 2004a). Les études STEP-1 (Hooper et al., 2006) et COMBI (McLaughlin et al., 2006) ont évalué les effets de la co-administration du bosentan et de l'iloprost. Ces deux études ont démontré que cette combinaison était sécuritaire, mais seule l'étude STEP-1 a démontré une amélioration clinique. Des études préliminaires suggèrent que la combinaison du bosentan et du sildenafil est sécuritaire et améliore la capacité à l'exercice des patients souffrant d'HTAPI (Hooper et al., 2004; Mathai et al., 2007).

1.5.4.2 Sitaxsentan

Le sitaxsentan est un antagoniste sélectif des R-ET_A possédant une affinité 6500 fois plus élevée pour ce dernier que pour le R-ET_B. En 2006, le sitaxsentan a été approuvé en Europe pour le traitement des patients de classe III et, en 2007, au Canada et en Australie pour le traitement des patients souffrant d'HTAP des classes II et III. À ce jour, la FDA continue de refuser l'approbation de ce médicament en raison du manque de données démontrant l'efficacité clinique du sitaxsentan.

Une étude pilote a évalué les effets d'un traitement de douze semaines avec le sitaxsentan (100 et 500 mg; 2 fois/jour) chez 20 patients souffrant d'HTAP de classes II, III et VI. Cette étude a démontré une nette amélioration des paramètres hémodynamiques (pression artérielle pulmonaire moyenne et RVP) et de la capacité à l'exercice. Toutefois deux cas de toxicité hépatique sévère dont un fatal ont été rapportés (Barst et al., 2002). Les études STRIDE-1 (*Sitaxsentan To Relieve Impaired Exercise*) et STRIDE-2 ont évalué l'efficacité et la sécurité du sitaxsentan à des doses plus faibles. L'étude STRIDE-1 (100 ou 300 mg) a été réalisée chez 178 patients souffrant d'HTAPI et d'HTAP associées à diverses pathologies (Barst et al., 2004). Après 12 semaines de traitement, des améliorations du test de 6MWD, de la classe fonctionnelle et des paramètres hémodynamiques (index cardiaque et RVP) ont été rapportées dans les deux groupes. Toutefois, une augmentation des enzymes hépatiques a été observée chez 10% des patients traités avec 300 mg de sitaxsentan (Barst et al., 2004). L'étude STRIDE-2 a évalué l'efficacité et la sécurité du sitaxsentan à des doses plus faibles (50 ou 100 mg) chez 248 patients souffrant d'HTAP (Barst et al., 2006). Après 18 semaines de traitement, des améliorations de la classe fonctionnelle et du test de 6MWD ont été notées dans le groupe de patients recevant la dose de 100 mg. Toutefois, aucune différence statistiquement significative n'a été observée chez les patients du groupe de 50 mg. Une augmentation des enzymes hépatiques a été observée chez 5% des patients du groupe recevant la dose de 50 mg et chez 3% des patients du groupe recevant la dose de 100 mg (Barst et al., 2006). En se basant sur ces données, la dose présentant le meilleur ratio risque/bénéfice semble être 100 mg et ce n'est que cette dose qui a été approuvée pour le traitement de l'HTAP. Cette étude incluait aussi un groupe ouvert de 60 patients traités avec le bosentan. Une amélioration du test de 6MWD ainsi qu'une augmentation de 11% des enzymes hépatiques ont été observées dans ce groupe toutefois, ces résultats n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus avec le sitaxsentan (Barst et al., 2006). Il est bien important de considérer le fait que cette étude était ouverte lors de l'interprétation des résultats du groupe traité avec le bosentan.

Des données à plus long terme sont maintenant disponibles grâce à la prolongation de l'étude STRIDE-2 (STRIDE-2X) (Benza et al., 2008). Après 1 an de traitement, le test

de 6MWD n'était pas différent entre le groupe de patients recevant le sitaxsentan et le groupe de patients recevant le bosentan. Une augmentation plus importante des enzymes hépatiques aurait été observée chez le groupe de patients traités avec le bosentan (9%) comparativement à ceux traités avec le sitaxsentan (1%). De plus, en 1 an, le TCW aurait été plus important dans le groupe bosentan.

1.5.4.3 Ambrisentan

L'ambrisentan est un antagoniste sélectif des R-ET_A possédant une affinité 77 fois plus élevée pour ce dernier que pour le R-ET_B. Ce médicament a été approuvé en juin 2007 aux États-Unis pour le traitement des patients souffrant d'HTAP de classes II et III. Son utilisation devrait être approuvée en Europe et ailleurs dans le monde en 2008.

La première étude clinique a été réalisée chez 64 patients souffrant d'HTAP traités à double insu avec des doses de 1, 2.5, 5 et 10 mg d'ambrisentan (Galie et al., 2005). Après 12 semaines de traitement, des améliorations du test de 6MWD, des paramètres hémodynamiques et de la classe fonctionnelle ont été observées dans chacun des groupes traités. Une augmentation des aminotransférases hépatiques a été observé chez seulement 3% des patients traités avec 5 mg d'ambrisentan (Galie et al., 2005). L'étude ARIES-1 (*Ambrisentan in PAH-a phase III, randomised, double blind, placebo controlled, multicenter, efficacy study of ambrisentan in subjects with pulmonary arterial hypertension*) a été réalisée chez 202 patients souffrant d'HTAP (Galie et al., 2008). Les résultats de cette étude ont suggéré qu'un traitement de 12 semaines avec l'ambrisentan (5 ou 10 mg) a entraîné des améliorations du test de 6MWD, de la classe fonctionnelle et de la qualité de vie des patients (Galie et al., 2008). L'étude ARIES-2 a évalué l'efficacité et la sécurité de l'ambrisentan à des doses de 2.5 et 5 mg chez 192 patients souffrant d'HTAP (Galie et al., 2008). Les résultats de cette étude ont démontré des améliorations du test de 6MWD ainsi que de la qualité de vie des patients (Galie et al., 2008).

Les études ARIES-1 et ARIES-2 d'une durée de 12 semaines ont été poursuivies à long terme (ARIES-E) et les données préliminaires de cette prolongation suggèrent, suite à l'analyse des résultats chez les 303 patients, que le taux de survie des patients traités avec

l'ambrisentan est de 95% après un an (résultats non-publiés) (Dupuis et al., 2008). Une augmentation des aminotransférases a été observée chez seulement 8 de ces patients et un seul a été obligé d'arrêter le traitement.

Il semblerait que l'utilisation de l'ambrisentan a aussi été évaluée dans une étude préliminaire chez des patients qui, en raison d'une augmentation des enzymes hépatiques, ont arrêté l'utilisation du bosentan (n=31) et du sitaxsentan (n=5). Après une exposition moyenne d'un an et demi, aucun des patients traités avec l'ambrisentan n'a eu à discontinuer son utilisation conséquemment à une augmentation des enzymes hépatiques (résultats non-publiés).

Les patients qui ne répondent pas aux différents médicaments pharmacologiques disponibles pour le traitement de l'HTAP devront subir une transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire. La transplantation devrait être considérée pour les patients souffrant d'HTAP de classes III et IV présentant une détérioration de leur condition même lorsque traités avec les divers médicaments disponibles.

2 Justification de l'étude

Plusieurs données expérimentales et cliniques ont confirmé l'activation et la contribution persistante de l'ET-1 dans le développement et le maintien de l'HTAP. Plusieurs données expérimentales ont prouvé l'implication du récepteur ET_A dans les effets délétères induits par l'ET-1 tels que la vasoconstriction pulmonaire et la prolifération cellulaire. Toutefois, l'implication et la contribution du récepteur ET_B dans ces effets délétères demeurent à ce jour controversées. Ainsi, les grandes questions qui subsistent concernant le récepteur ET_B dans le cadre de l'HTAP sont: 1) le récepteur ET_B endothélial est-il toujours en mesure d'exercer son rôle protecteur en induisant la vasodilatation et la clairance de l'ET-1? et 2) les effets délétères induits par l'ET-1 tels que la vasoconstriction et la prolifération cellulaire peuvent-ils être la conséquence de l'activation des récepteurs ET_B présents sur les cellules musculaires lisses de la circulation pulmonaire? Si la réponse à la première question est oui, l'antagonisme double des récepteurs à l'ET s'avérerait néfaste puisqu'il empêcherait le récepteur ET_B endothélial d'exercer ses fonctions vasodilatatrices bénéfiques. Par contre, si la réponse à la deuxième question est positive, l'antagonisme double des récepteurs à l'ET-1 serait alors préférable puisque les effets délétères induits par la stimulation des deux sous-types de récepteurs, incluant ceux associés aux récepteurs ET_B présents sur le muscle lisse vasculaire, seraient inhibés.

C'est donc en raison des multiples rôles potentiels du récepteur ET_B que la présente controverse quant à l'utilisation d'antagonistes sélectifs ou doubles dans le traitement de l'HTAP a vu le jour et demeure toujours un important sujet de débat. Depuis les études cliniques de 2001, il a été démontré qu'un blocage double ET_A/ET_B des récepteurs à l'ET-1 par le bosentan s'avérerait un traitement efficace chez les patients souffrant d'HTAP. Toutefois, depuis quelque temps, plusieurs groupes de recherche prônent l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A conséquemment, le sitaxsentan et l'ambrisentan ont été acceptés dans certaines parties du monde comme traitement de l'HTAP. Une meilleure compréhension du rôle joué par le récepteur ET_B pourrait permettre d'apporter des réponses aux questions soulevées par le débat et ainsi permettre de trancher en ce qui concerne l'utilisation d'antagonistes sélectifs ou double dans le traitement de l'HTAP.

2.1 Objectif général de l'étude

L'objectif général de cette thèse de doctorat était de clarifier les rôles joués par les récepteurs ET_A et ET_B dans la vasoconstriction pulmonaire induite par les endothélines 1 et 3 en condition contrôle et en condition d'HTAP, afin d'élucider les questions soulevées par le débat. Plusieurs études pré-cliniques ont tenté d'évaluer les rôles exacts joués par les deux sous-types de récepteur au niveau des effets induits par l'ET-1. Toutefois, la majorité de ces études ont été effectuées sur des artères de gros calibre alors que les artères de résistance sont majoritairement responsables de l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire observée en condition d'HTAP. Conséquemment, les trois études présentées dans cette thèse de doctorat ont toutes été réalisées sur des artères de résistance pulmonaires. L'hypothèse générale de cette étude est que le récepteur ET_B joue un rôle prédominant dans les effets délétères induits par le système ET conséquemment, il est préférable, en condition d'HTAP, d'utiliser un antagoniste double des récepteurs à l'ET.

2.2 Les stratégies expérimentales

- Dans un modèle d'HTAP provoquée par l'administration de monocrotaline, nous avons évalué les modifications locales de la pharmacologie du système ET et nous avons comparé un antagoniste sélectif ET_A et un antagoniste double au niveau de leur efficacité à réduire la vasoconstriction d'artères de résistance pulmonaires de rats induite par l'ET-1.
- Puisque l'une des limitations majeures de l'utilisation d'antagonistes sélectifs est le fait que leur sélectivité est dépendante de la concentration utilisée nous avons réévalué, à l'aide d'un traitement antisens *ex vivo* dirigé contre l'ARNm des deux sous-types de récepteur, les rôles joués par les récepteurs ET_A et ET_B dans la vasoconstriction d'artères de résistance pulmonaires de rats induite par l'ET-1.
- Puisque le système ET est composé de trois membres et que peu de données concernent les effets de l'ET-3, nous avons finalement examiné les rôles joués par les récepteurs ET_A et ET_B dans la réponse vasoconstrictrice à l'ET-3 en plus d'évaluer l'implication potentielle de cette dernière dans l'HTAP. Pour ce faire, nous avons comparé un antagoniste sélectif ET_A et un antagoniste sélectif ET_B au niveau de leur efficacité à réduire la vasoconstriction d'artères de résistance pulmonaires de rats induite par l'ET-3 dans un modèle d'HTAP provoquée par l'administration de MCT.

3 Méthodologie

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

3.1 Modèle animal

Pour effectuer les différentes études, des rats mâles de race Wistar (250-300g) âgés de 7 ou 8 semaines ont été utilisés. Ces animaux provenaient d'un élevage local (Charles River, Saint-Constant, Québec) et étaient manipulés cinq jours après leur arrivée à l'animalerie du centre de recherche afin de leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement.

3.1.1 Modèle monocrotaline

Ce modèle d'hypertension artérielle pulmonaire a été utilisé dans la première et la troisième étude. Les rats ont été divisés en deux groupes, le groupe MCT et le groupe sham. Les rats MCT ont reçu une injection intra-péritonéale de 0.5 ml de MCT (Sigma) à une concentration de 60 mg/kg alors que les rats sham ont reçu une injection de 0.5 ml de solution saline. Cinq semaines suivant l'injection de MCT, les animaux ont été sacrifiés.

3.2 Prise des mesures hémodynamiques

Pour la prise des mesures hémodynamiques, les rats ont été anesthésiés avec un mélange de kétamine et de xylazine (1: 1). La veine jugulaire droite a été isolée, incisée et canulée avec un cathéter Millar (2F courbé, 140 cm) afin de mesurer la tension veineuse centrale et la pression ventriculaire droite. Un deuxième cathéter, similaire au premier, a été inséré dans l'artère carotidienne droite afin de mesurer la pression artérielle systémique et

la pression ventriculaire gauche. Les mesures ont été enregistrées par un polygraphe Gould TA11.

3.3 Dosage des endothélines par ELISA

Le dosage des endothélines par ELISA a été réalisé pour la première (ET-1) et la troisième étude (ET-3). Lors de la prise de mesures hémodynamiques, 3 ml de sang artériel et tous les lobes pulmonaires ont été prélevés chez chacun des animaux sham (n=20) et MCT (n=20). Les tissus pulmonaires ont ensuite été homogénéisés. Enfin, tous les échantillons (pulmonaires et plasmatiques) ont été purifiés par colonne sep-pak C18 pour le dosage subséquent d'ET-1 et d'ET-3.

3.3.1 Homogénéisation tissulaire pulmonaire

Pour ce faire, 200 mg de tissu pulmonaire baignant dans un tampon d'homogénéisation composé de; Tris-HCl 50 mM; β -glycérophosphate 20 mM, sodium fluoride 20 mM, EDTA 5 mM, EGTA 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM, sucrose 300 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases: DTT 5 mM, PMSF 1 mM, Benzamidine 10 mM et leupeptine 10 μ g/ml ont été utilisés. Une alternance de cycles d'homogénéisation (10 secondes) et de cycles de refroidissement à 4°C (20 secondes) a été répétée trois fois par échantillon. L'homogénéisation a été effectuée à l'aide d'un polytron à 8500 RPM. Afin d'éviter toutes contaminations, le polytron était rincé 7 fois avec de l'H₂O et le tampon après l'homogénéisation de chaque échantillon. Après l'homogénéisation, les échantillons étaient mélangés à l'aide d'un vortex et centrifugés pendant 10 minutes à 10 000 RPM. Finalement, la quantification protéique de chaque échantillon a été réalisée en utilisant la technique de Bradford.

3.3.2 Purification des échantillons par colonne Sep-Pak C₁₈

3.3.2.1 ET-1

Les échantillons plasmatiques et tissulaires pulmonaires ont été purifiés à l'aide de colonnes Sep-Pak C₁₈ (Waters, Milford, MA) pour le dosage subséquent d'ET-1. Les colonnes Sep-Pak C₁₈ ont été activées à l'aide de méthanol 100% (2 fois 5 ml) puis lavées avec de l'H₂O (1 fois 9 ml). Par la suite, les échantillons plasmatiques et tissulaires pulmonaires ont été ajoutés aux colonnes Sep-Pak C₁₈ puis lavés avec de l'H₂O (1 fois 9 ml). Les produits ont ensuite été élués avec du méthanol 100% (2.5 ml) et évaporés dans un *speed-vac* pendant 12 heures. Finalement, les échantillons plasmatiques et tissulaires pulmonaires ont été reconstitués à l'aide du tampon fourni dans le *kit* ELISA.

3.3.2.2 ET-3

Les échantillons plasmatiques et tissulaires pulmonaires ont été purifiés à l'aide de colonnes Sep-Pak C₁₈ pour le dosage subséquent d'ET-3. Les colonnes Sep-Pak C₁₈ ont été activées avec du méthanol 100% (1 fois 4 ml) puis lavées avec de l'H₂O (2 fois 2ml) et une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) 0.1%. (2 fois 2ml). Par la suite, les échantillons plasmatiques et tissulaires pulmonaires ont été ajoutés aux colonnes Sep-Pak C₁₈ puis lavés avec de l'H₂O (3 fois 3ml). Pour les échantillons plasmatiques, 1 ml de plasma dans 3 ml d'une solution de CH₃COOH 10% a été utilisé alors que pour les échantillons tissulaires pulmonaires, 1.5 ml d'homogénat tissulaire a été utilisé. Les produits ont été élués (1 ml) à l'aide d'une solution TFA 0.1%/Acetonitrile 60%/H₂O et évaporés dans un *speed-vac* pendant 12 heures. Les échantillons plasmatiques et tissulaires pulmonaires ont été reconstitués avec une solution TFA 0.1%/DMSO/tampon EIA.

3.3.3 Protocole expérimental

Suite à la reconstitution des échantillons plasmatiques et tissulaires pulmonaires, nous avons procédé avec l'ELISA selon les instructions des manufacturiers: ET-1 (Biomedica, distribué par Medicorp, Montréal, PQ, Canada,) et ET-3 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd, Gunma, Japon).

3.4 Études de réactivité vasculaire

Les études de réactivités vasculaires ont été réalisées dans les trois études, à l'aide d'un myographe micro-vasculaire.

3.4.1 Isolation et préparation des artères pulmonaires

Les rats ont premièrement été anesthésiés avec un mélange de kétamine et de xylazine (1:1). Le poumon a ensuite été délicatement retiré de la cage thoracique et le lobe inférieur droit a été préservé dans une solution physiologique (PSS) ayant la composition suivante (mM): NaCl 119; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.18; MgSO₄ 1.17; NaHCO₃ 14.9; CaCl₂ 1.6; EDTA 0.023; glucose 10. Sous un microscope binoculaire (Nikon, modèle SMZ-10A), des petites artères pulmonaires ayant une longueur de 2mm et un diamètre de 150-200 µm ont été disséquées en prenant bien soin de ne pas endommager l'endothélium vasculaire. Deux fils de tungstène de 20 µm ont été insérés dans les segments d'artère puis fixés sur un myographe pour micro-vaisseaux (IMF, University of Vermont). Les artères pulmonaires ont par la suite été étirées en fonction de leur diamètre afin de leur donner une tension optimale telle que décrite par les études de Mulvany. Puisque toutes les artères possédaient un diamètre d'environ 150-200 µm, nous les avons toutes étirées jusqu'à l'obtention d'une tension de base d'environ 80-100 mg. Les protocoles expérimentaux ont été réalisés après

une équilibration de 30 minutes à 37°C, dans du PSS oxygéné avec un mélange gazeux composé de 5% CO₂, de 12% O₂ et d'une balance de N₂.

3.4.2 Protocole expérimental

Les artères ont tout d'abord été soumises à deux contractions subséquentes de 40 mmol/L KCl afin de vérifier leur viabilité. La présence de l'endothélium vasculaire a été vérifiée par l'ajout de 10 µM d'Ach. Nous avons, dans un premier temps, effectué des courbes doses réponses à l'ET-1 (0.1 nM à 0.3 µM) et à l'ET-3 (0.1 nM à 0.3 µM). Les courbes doses réponses à l'ET-1 ont été effectuées en absence et en présence d'un antagoniste sélectif ET_A (A-147627, 10 nM), d'un antagoniste sélectif ET_B (A-192621, 1µM) ainsi qu'en présence d'un antagoniste double (bosentan, 10 µM). Les courbes doses réponses à l'ET-3 ont été effectuées en présence de l'antagoniste sélectif ET_A, de l'antagoniste sélectif ET_B ainsi qu'en présence de la combinaison des deux antagonistes. Un seul protocole expérimental a été réalisé par segment d'artère pulmonaire. Pour chacun des antagonistes, des courbes doses-réponses à diverses concentrations ont été effectuées afin de déterminer la concentration optimale de l'antagoniste à utiliser (Sauvageau et al., 2006). À la fin de chacun des protocoles expérimentaux, l'artère a été stimulée avec une solution physiologique dépolarisante contenant 127 mM de KCl afin d'obtenir la contraction maximale.

3.5 Études d'expression génique par qPCR

L'expression génique de différents gènes (preproET-1, preproET-3, R-ET_A, R-ET_B) a été évaluée par des études de qPCR. L'expression génique de la preproET-1, du R-ET_A et du R-ET_B a été évaluée dans la première étude alors que l'expression génique de la preproET-3 a été évaluée dans la troisième étude.

3.5.1 Extraction d'ARN total

L'ARN total des artères de résistance pulmonaires a été extrait à l'aide d'un *RNeasy mini kit* (Qiagen). Un maximum de 20 mg de tissu a été utilisé et déposé dans un eppendorf (1.5 ml) auquel le tampon RLT (thyocinate de guanidine, 600 µL) a été ajouté. Les tissus pulmonaires ont ensuite été homogénéisés à température ambiante à l'aide d'un mortier. Les échantillons ont été centrifugés afin d'éliminer les débris et le surnageant a été conservé. Un volume d'éthanol 70% a été ajouté au surnageant puis l'échantillon a été centrifugé à travers une colonne *RNeasy*. Par la suite, selon les instructions du *kit*, plusieurs étapes de lavages de l'échantillon à l'aide des tampons RW1 et RPE à travers une colonne *RNeasy* ainsi qu'une digestion de l'ADN avec la DNase I (Qiagen) ont été effectuées. Finalement, l'ARN total a été élué en ajoutant 40 µL d'H₂O *RNase Free* à la colonne *RNeasy spin* qui a ensuite été centrifugée pendant 1 minute à 10 000 RPM. La concentration d'ARN a été estimée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 260/280 nm.

3.5.2 Protocole expérimental

3.5.2.1 Conceptualisation des amorces spécifiques

Quatre amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide du programme *Ensembl* génome (<http://www.ensembl.org>) et leur spécificité ont été vérifiées à l'aide du programme *Blast* disponible à partir du *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Avant de débiter les expériences de qPCR, une courbe standard avait été obtenue, à partir de poumons complets de rat, pour chacune des amorces spécifiques. Une efficacité se situant entre 90 et 110% et un R² égal à 1 étaient nécessaires. La qualité et la spécificité des amorces ont ensuite été évaluées. Pour ce faire, les amorces ont été testées à différentes concentrations (150 à 300 nM) et en présence de différentes

quantités d'ADN complémentaire (1, 2 et 5 ng). Les amorces spécifiques qui ont été utilisées sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Séquences des amorces spécifiques

<i>Gènes (rat)</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>
<i>PréproET-1</i>	CTGGAGACCCCGCAGG TCCAA	GTGGGAAGTAAGTCTTT CAAGGATCGC
<i>PréproET-3</i>	GGGACCAGGAGGAAAA GAGGGTG	ACTGGGAAC TTTCTGGA ACTGG
<i>R-ET_A</i>	TTCCCTCTTCACTTAAG CCGAA	GACAACAGCAACAGAGG CATGA
<i>R-ET_B</i>	CTAGCCATCACTGCGAT CTT	CAGAATCCTGCTGAGGTG AA
<i>Cyclophilin A</i>	AGGTCCTGGCATCTTGTC	TGATCTTCTTGCTGGTCT

3.5.2.2 ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (ADNc) a été obtenu par transcription inverse à l'aide de la MML-V (reverse transcriptase, Invitrogen). La réaction a été effectuée avec 100 µg d'ARN total et a produit 20 µL d'ADNc à une concentration de 5 ng/µL. Les composants suivants

ont été combinés dans un même tube *RNase free*: ARN total (5 μL), H_2O DEPC (4 μL), dNTP (1 μL), amorce anti-sens spécifique (2 μL à 4 pM). Le mélange a été chauffé pendant 15 minutes à 65 °C et refroidit sur la glace. Les composants suivants ont ensuite été ajoutés à chacun des échantillons soit: tampon 5X (4 μL), DTT (0.1 M, 2 μL), RNase (1 μL) et MMLV (1 μL) pour un volume total de 20 μL . Finalement, les échantillons ont été transformés en ADNc (20 μL à 5 ng/ μL) à l'aide d'un protocole expérimental d'une durée totale de 1 heure 15 minutes: 25°C (10 minutes), 37°C (50 minutes), 70°C (15 minutes), 4°C.

3.5.2.3 qPCR

Les réactions ont été réalisées avec 1 ng d'ADNc. Les concentrations d'amorces utilisées ont varié selon le gène étudié: preproET-1 (150 nM), preproET-3 (300 nM), R-ET_A (150 nM), R-ET_B (200 nM) et cyclophilin A (150 nM). Dans un même puits, les composants suivants ont été ajoutés: l'ADNc, les amorces spécifiques (*forward et reverse*), le ROX, le SYBR Green PCR master mix (Stratagene) pour un volume total de 25 μL . Les réactions ont été réalisées et analysées à l'aide de l'appareil MX300P (Stratagene). Pour chacun des gènes étudiés, un contrôle négatif dans lequel l'ADNc avait été remplacé par de l' H_2O *RNase Free* a été inclus. Les produits du PCR obtenus avec chacune des amorces spécifiques ont été purifiés, séquencés et confirmés comme étant les gènes d'intérêts.

3.6 Immunobuvardage de type Western Blot

Les études d'immunobuvardage de type Western ont été réalisées pour la première, la deuxième et la troisième étude. Dans la première étude, l'expression protéique des récepteurs ET_A et ET_B a été comparée en conditions contrôle et d'HTAP. Dans la deuxième étude, la dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B a été visualisée à l'aide du Western Blot.

Finalement, dans la troisième étude, l'efficacité des antisens à réduire l'expression protéique des récepteurs ciblés a été évaluée par Western Blot.

3.6.1 Protocole expérimental

Pour chaque condition expérimentale, des artères de résistance pulmonaires ont été disséquées et rassemblées (n=5 rats). Par la suite, l'extraction standard de protéines a été effectuée avec un tampon de lyse dénaturant composé de Tris-HCl pH 7.5 50 mM, β -glycérophosphate 20 mM, Sodium fluoride 20 mM, EDTA 5 mM, EGTA 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, triton 1% v/v, cocktail d'inhibiteur de protéases: microcystéine 1 μM , DTT 5 mM, leuptyne 10 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 0.5mM et benzamidine 10 mM. Une quantification protéique à l'aide de la technique de Bradford a ensuite été réalisée. Pour chacun des échantillons, une quantité de 50 μg de protéine a été utilisée.

Les protéines ont été séparées sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE avec un gradient 10-20% (w/v). Par la suite, les échantillons ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (R-ET_A) ou de PVDF (R-ET_B) à 100 V pendant 90 minutes à 4°C dans un tampon composé de (mM): Tris base 25, glycine 192 et 5% de méthanol. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 2 heures avec du lait 5% (Sigma) dans une solution de TBST (R-ET_A) composée de (mM): Tris-HCl (25, pH 7.5), NaCl 150 et 0.05% de Tween 20 ou dans une solution de PBST (R-ET_B) composée de (mM): NaCl 137, KCl 2.7, Na_2HPO_4 4.3, KH_2PO_4 1.4 et 0.05% de Tween 20. Les membranes ont été incubées pendant 16 heures à 4°C avec les anticorps primaires dirigés contre le R-ET_A (rat R-ET_A, 1:1000, Abcam) ou le R-ET_B (rat R-ET_B, 1:500, Alomone) dilués dans du lait 5% (R-ET_A) ou de la BSA 5 % (*bovine serum albumine*, Fisher Bioreagent) (R-ET_B). Les membranes ont par la suite été lavées (3 fois 10 minutes) avec du TBST (nitrocellulose) ou du PBST (PVDF) et rebloquées dans une solution de TBST ou de PBST contenant 5% de lait (1 fois 10 min). Les membranes ont ensuite été incubées pendant 2 heures avec leur anticorps secondaire respectif dilué dans du lait 5% (*horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit*,

1:20 000, Jackson ImmunoResearch laboratories inc). Suite à un lavage intensif avec du TBST (R-ET_A) ou du PBST (R-ET_B), les bandes ont été visualisées par chemiluminescence (Renaissance Plus, Perkin-Elmer Life Sciences) sur des films Bio-Max selon les instructions du manufacturier.

3.7 Études d'Immunofluorescence confocale

Les études d'immunofluorescence confocale ont été réalisées pour la troisième étude. La localisation de l'ET-3 a été évaluée en condition contrôle et en condition d'HTAP induite par la MCT.

3.7.1 Prélèvement et préparation des tissus

Les poumons des rats MCT et sham ont été prélevés et immergés dans du 2-methyl-butane (Sigma) pour être congelés dans l'azote liquide à -80°C jusqu'au jour des coupes. Pour cette étude, des coupes d'artères de résistance pulmonaires d'une épaisseur de 8 µm ont été effectuées. Pour ce faire, les bronches ont été retirées et le lobe pulmonaire inférieur droit a été orienté de façon à couper transversalement les artères de résistance pulmonaires.

3.7.2 Protocole expérimental

Les cryo-coupes pulmonaires ont été fixées avec du paraformaldéhyde (4%, pH 7.2) pendant 20 minutes pour ensuite être lavées (3 fois 10 minutes) avec un tampon phosphate (PBS) composé de (mM) NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 4.3, et KH₂PO₄ 1.4. Les cryo-coupes pulmonaires ont ensuite été bloquées avec une solution de PBS contenant 2% de BSA et 0.5% de Triton X-100. Suite au blocage, les coupes d'artères pulmonaires ont été incubées avec les anticorps primaires dirigés contre l'ET-3 (lapin, 1:200, Phoenix Pharmaceuticals Inc) et l'alpha-actine spécifique au muscle lisse (SMA, 1:200, souris, Sigma). Les coupes pulmonaires ont été incubées en présence de l'anticorps primaire

pendant 16 heures à 4°C. Les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 0.1% de Triton X-100. Puis, les coupes pulmonaires ont été lavées (3 X 10 minutes) et incubées en présence des anticorps secondaires dirigés contre le lapin (1:800, Alexa555, âne, Molecular Probes) et la souris (1:800, Alexa 647, âne, Molecular Probes) pendant 1 heure dans le noir à température ambiante. Les anticorps secondaires ont été dilués dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 0.1% de Triton X-100. Finalement, les tissus pulmonaires ont été montés sur des lamelles de verre en utilisant une solution de glycérol (1 pour 5) et de DABCO (0.2%, 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]-octane, Sigma) et scellées avec du vernis à ongle.

Les coupes pulmonaires ont été visualisées avec un microscope confocal LSM 510 (Zeiss) muni d'un objectif 63x/1.4 à immersion (Zeiss). Des séries d'images en Z ont été captées. Les séries en Z ont ensuite été déconvoluées et finalement, des projections (vue de face) en 3 dimensions ont été produites à l'aide du logiciel LSM 510.

3.8 Dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B

3.8.1 Études de co-immunoprécipitation

Les études de co-immunoprécipitation ont été réalisées pour la deuxième étude. Pour chaque condition expérimentale, des petites artères pulmonaires ont été disséquées et rassemblées (n=5 rats). Par la suite, une quantification protéique en utilisant la technique de Bradford a été réalisée avec un tampon de lyse dénaturant composé de (mM) Tris-HCl pH 7.5 50, β-glycérophosphate 20, Sodium fluoride 20, EDTA 5, EGTA 10, Na₃VO₄ 1, triton 1% v/v, et cocktail d'inhibiteur de protéases: microcystéine 1 μM, DTT 5 mM, leuptine 10 μg/ml, PMSF 0.5mM et benzamidine 10 mM. Ces expériences ont aussi été réalisées en condition non-dénaturante avec le même tampon de lyse sans ajout de DTT. Pour chacun des échantillons, une quantité de 100 μg de protéine a été utilisée à laquelle ont été ajoutés le tampon de lyse (volume total de 100 μl) et l'anticorps dirigé contre le R-ET_B (rat, 1:100,

Biogenesis) ou le R-ET_A (rat, 1:100, Abcam). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 2 heures à 4°C avec agitation. Avant leur incubation avec chacun des échantillons, des billes d'agarose (protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology) ont été lavées (3 fois) avec un tampon de lavage composé de Tris 1.5 mM, triton 10% et H₂O. Ensuite, les billes ont été incubées avec les échantillons (20µl/échantillons) pendant 1 heure à 4°C avec agitation. Après l'incubation, les échantillons ont été lavés (3 fois) avant l'ajout du *sample buffer* pour le Western blot.

Nous avons par la suite visualisé la présence des dimères ET_A et ET_B à l'aide d'un immunobuvardage de type Western Blot. Cette technique a été décrite dans une section antérieure (3.6). Les anticorps dirigés contre les récepteurs ET_A (rat, Abcam, séquence d'acides aminés 31-45: SSHVEDFTPFPGTEF) et ET_B (mouton, Biogenesis, séquences d'acides aminés 405-417, QTFEEKQSLEEKQ) ont été synthétisés pour réagir avec des épitopes spécifiques et différents.

3.9 Traitement aux oligonucléotides antisens

Dans la deuxième étude, les effets d'un traitement antisens *ex vivo* dirigé contre l'ARNm des récepteurs ET_A et ET_B dans la vasoconstriction d'artères de résistance pulmonaire induite par l'ET-1 ont été évalués. Dans un premier temps, l'efficacité du traitement antisens à réduire l'expression protéique du récepteur ciblé a été vérifiée par immunobuvardage de type Western Blot. Finalement, la réactivité vasculaire des artères pulmonaires à l'ET-1, suite à l'incubation avec les antisens, a été évaluée à l'aide d'un myographe micro vasculaire.

3.9.1 Conceptualisation des séquences antisens

Deux séquences antisens ont été dessinées à l'aide du programme *Ensembl* genome (<http://www.ensembl.org>). La spécificité des séquences antisens a été vérifiée à l'aide du programme *Blast* disponible à partir du *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Deux séquences antisens ont été utilisées, une dirigée contre l'ARNm du R-ET_A (ET_A-AS) et l'autre dirigée contre l'ARNm du R-ET_B (ET_B-AS). Pour chacun des AS utilisés, une séquence *scrambled* (Sc-ET_A; Sc-ET_B) a été dessinée. Ces séquences *scrambled* sont constituées des mêmes nucléotides mais intervertis afin de s'assurer de la spécificité des effets observés.

Tableau 3. Séquences des antisens et *scrambled* utilisés

	<i>Séquence Antisens</i>	<i>Séquence scrambled</i>
<i>R-ET_A</i>	5'CCACACTGAGA GCGCAGAGA 3'	5'CAGGACGAATG ACCCAGACG3'
<i>R-ET_B</i>	5'GTGCGGAGGAA CGCATCAGA 3'	5'GCAGTAGCGTA GCAGAAG 3'

3.9.2 Exposition des artères de résistance pulmonaires aux antisens

Les artères de résistance pulmonaires ont été isolées comme décrit précédemment (section 3.4.1).

Pour chacun des antisens, deux concentrations (1 et 10 μ M) et trois temps d'incubation (24, 48 et 72 heures) ont été testés afin de déterminer les conditions optimales d'incubation et ainsi maximiser l'effet du traitement antisens. Pour le R-ET_A, une

concentration de 1 μM et un temps d'incubation de 24 heures sont les conditions expérimentales idéales. Pour le R-ET_B, une concentration de 1 μM et d'un temps d'incubation de 72 heures sont optimales.

3.9.2.1 Récepteur ET_A

Les artères de résistance pulmonaires ont été incubées à 37°C, dans un incubateur de cellule contenant 5% de CO₂, pendant 24 heures dans des plaques de 24 puits contenant 400 μL de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Sigma) supplémenté de 0.5% de FBS (*Fetal bovine serum*, Gibco), 2% pénicilline/streptomycine (Gibco) et 0.1% de fungisone (Gibco) avec ou sans 1 μM d'antisens dirigé contre le R-ET_A.

3.9.2.2 Récepteur ET_B

Les artères de résistance pulmonaires ont été incubées à 37°C pendant 72 heures dans des plaques de 24 puits contenant 400 μL de DMEM supplémenté de 0.5% de FBS, 2% pénicilline/streptomycine et 0.1% de fungisone avec ou sans 1 μM d'antisens dirigé contre le R-ET_B. Du milieu de culture frais a été ajouté à 24 et 48 heures.

3.9.3 Vérification de l'efficacité des séquences antisens utilisées

L'efficacité des antisens à réduire l'expression protéique de leurs récepteurs ciblés a été évaluée par immunobuvardage de type Western Blot. Une extraction standard de protéines avec un tampon de lyse dénaturant (même composition que 3.6.1) et une quantification des protéines avec la technique de Bradford ont été effectuées. Par la suite,

nous avons procédé à un immunobuvardage de type Western blot. Cette technique a été décrite dans une section antérieure (3.6).

3.9.4 Études de réactivité vasculaire

Suite à l'incubation avec les antisens (ET_A-AS; ET_B-AS, Sc-ET_A, Sc-ET_B), la réactivité vasculaire des artères de résistance pulmonaires à l'ET-1 a été évaluée. Le même protocole expérimental qui a été décrit antérieurement (3.4) a été utilisé, mais dans ce cas, seules des courbes doses réponses à l'ET-1 (0.1 nM à 0.3 µM) ont été effectuées.

3.10 Composés utilisés

Le bosentan nous a été gracieusement fourni par la compagnie pharmaceutique Actelion alors que les antagonistes sélectif ET_A (A-147627) et ET_B (A-192621) nous ont été gracieusement fournis par Abott.

3.11 Évaluations statistiques

Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne ± E.S.M. Les différences entre les groupes sham et MCT en ce qui concerne les paramètres morphométriques et hémodynamiques, les dosages ELISA (ET-1 et ET-3) de même que les résultats d'expressions protéique et génique ont été analysés par des tests *t* de student non-pairés (two-tailed). Pour les études de réactivité vasculaire, les courbes doses-réponses de chaque condition pharmacologique ont été analysées avec une formule à cinq paramètres afin de déterminer la réponse maximale (E_{max}) ainsi que la valeur de l'EC₅₀. Les différences entre les groupes, pour ces paramètres, ont aussi été analysées par des tests *t* de Student non-pairés.

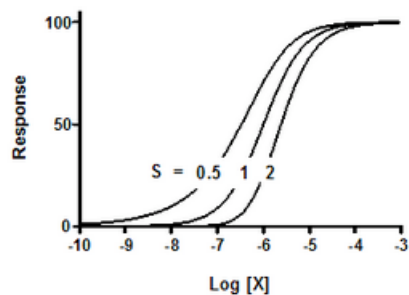
3.11.1 Modèle logistique à 5 paramètres

Une courbe dose-réponse standard est définie par quatre paramètres soit, le bas de la courbe, l' E_{max} , l' EC_{50} et la pente. Ainsi lorsque nous lisons une courbe dose-réponse qui est dite standard nous utilisons un modèle logistique à quatre paramètres (Équation de Hill's). Toutefois, certaines courbes doses-réponses sont asymétriques ainsi un cinquième paramètre soit l'asymétrie de la courbe se doit d'être inclut. Pour ce type de courbe, nous utilisons un modèle logistique à 5 paramètres (Équation de Richards). La formule du modèle logistique à 5 paramètres est présentée ci-dessous.

$$\text{Response} = \text{bottom} + (\text{Top} - \text{bottom}) / [1 + 10^{(\text{Log} X - X) \text{HillSlope}}]^S$$

S = paramètre asymétrique

Le S représente le paramètre asymétrique ainsi, si S est égal à zéro nous avons alors un modèle logistique à quatre paramètres. Toutefois si S n'est pas égal à zéro alors nous avons une courbe asymétrique et nous utilisons donc un modèle logistique à 5 paramètres.



3.12 Éthique de recherche

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

4 Articles

4.1 Étude #1

Apport original et contribution des co-auteurs

La contribution du premier auteur Stéphanie Sauvageau est majoritaire puisqu'elle a réalisée toutes manipulations techniques relatives à l'étude et a rédigée le manuscrit. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescences et de microscopie confocale. Le Dr Jocelyn Dupuis et le Dr Eric Thorin ont supervisé l'étude et ont participé à la rédaction/révision du manuscrit.

ACCORD DES CO-AUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Stéphanie Sauvageau 3-525-1-0 Ph.D. Physiologie

2. Description de l'article

Stephanie Sauvageau, Eric Thorin, Louis Villeneuve, Jocelyn Dupuis.

Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary arterial hypertension. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics. 2008

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

À titre de co-auteur de l'article présenté ci-dessus, je suis d'accord pour que Stéphanie Sauvageau inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «*Implication des endothélines et de leurs récepteurs vasculaires dans la circulation pulmonaire en condition contrôlée et pathophysiologique*»

Eric Thorin

Co-auteur

signature

date

Louis Villeneuve

Co-auteur

signature

date

Jocelyn Dupuis

Co-auteur

signature

date

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1 Identification de la revue ou du livre

Pulmonary Pharmacology and Therapeutics

2 Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Prof C. Page

3 Identification de l'article

Stephanie Sauvageau, Eric Thorin, Louis Villeneuve, Jocelyn Dupuis. Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary hypertension: Role of ET_B-receptor expression levels. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2009, YPUPT-S-08-00189

L'étudiant, Stéphanie Sauvageau, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «*Implication des endothélines et de leurs récepteurs vasculaires dans la circulation pulmonaire en condition contrôlée et pathophysiologique*»

Prof C. Page

Éditeur

signature

date

Change in Pharmacological Effect of Endothelin Receptor Antagonists in Rats with Pulmonary Hypertension: Role of ET_B-receptor Expression Levels

Stéphanie Sauvageau^a, Eric Thorin^{a,b}, Louis Villeneuve^a, Jocelyn Dupuis^{a,c*}

Departments of ^aResearch Center, ^bSurgery, and ^cMedicine, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8

Running Title: Endothelin Receptor Antagonists

Type of contribution: Original Research Paper

Date of preparation: January 20, 2009

Number of text pages: 14

Number of tables: 0

Number of figures: 5

*Corresponding author (Dupuis J). Tel.: (514) 376-3330 Ext.3542; Fax: (514) 376-1355.

A B S T R A C T

Background and purpose: The endothelin (ET) system is activated in pulmonary arterial hypertension (PAH). The therapeutic value of pharmacological blockade of ET receptors has been demonstrated in various animal models and led to the current approval and continued development of these drugs for the therapy of human PAH. However, we currently incompletely comprehend what local modifications of this system occur as a consequence of PAH, particularly in small resistance arteries, and how this could affect the pharmacological response to ET receptor antagonists with various selectivities for the receptor subtypes. Therefore, the purposes of this study were to evaluate potential modifications of the pharmacology of the ET system in rat pulmonary resistance arteries from monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension.

Experimental approach: ET-1 levels were quantified by ELISA. PreproET-1, ET_A and ET_B receptors mRNA expression were quantified in pulmonary resistance arteries using Q-PCR, while protein expression was evaluated by Western blots. Reactivity to ET-1 of isolated pulmonary resistance arteries was measured in the presence of ET_A (A-147627), ET_B (A-192621) and dual ET_{A/B} (bosentan) receptor antagonists.

Key results: In rats with PAH, plasma ET-1 increased ($p < 0.001$) while pulmonary levels were reduced ($p < 0.05$). In PAH arteries, preproET-1 ($p < 0.05$) and ET_B receptor ($p < 0.001$) genes expressions were reduced, as were ET_B receptor protein levels ($p < 0.05$). ET-1 induced similar vasoconstrictions in both groups. In arteries from sham animals, neither bosentan nor the ET_A or the ET_B receptor antagonists modified the response. In arteries

from PAH rats, however, bosentan and the ET_A receptor antagonist potently reduced the maximal contraction, while bosentan also reduced sensitivity ($p < 0.01$).

Conclusions and implications: The effectiveness of both selective ET_A and dual ET_{A/B} receptor antagonists are markedly increased in PAH. Down-regulation of pulmonary resistance arteries ET_B receptor may contribute to this finding.

Keywords:

Endothelin

Endothelin receptor antagonists

Lung

Pathophysiology

Pharmacology

Pulmonary hypertension

Receptors

1. Introduction

The endothelin (ET) system is activated in pulmonary arterial hypertension (PAH) [1]. Increased plasma levels of ET-1 were detected in patients with various forms of PAH [1] and in various experimental models [2,3]. Among the chief actions of ET-1 is its ability to modulate pulmonary vascular reactivity. Although ET-1 is a strong and potent pulmonary vasoconstrictor, this peptide also has the ability to cause mild vasodilation. This complex biology derives from the existence of two different ET receptor subtypes [4]. The ET_A receptor was characterized from bovine lungs [5] and the ET_B receptor was cloned from rat lungs [6] where the proportion of these receptors is ~60% ET_A and ~40% ET_B [3]. The ET_A receptor demonstrates higher affinity for ET-1 and ET-2 than ET-3, while the ET_B receptor associates equally with all 3 isoforms. Both the ET_A and ET_B receptors are present on vascular smooth muscle cells and induce direct vasoconstriction and proliferation when stimulated [7,8]. On the other hand, endothelial ET_B receptors have been demonstrated to play a dual role. They can induce vasodilation through the release of nitric oxide and prostacyclin [9], but can also cause the release of the potent pulmonary vasoconstrictor thromboxane A₂ [10].

The therapeutic value of pharmacological blockade of ET receptors has been demonstrated in various animal models and led to the current approval and continued development of these drugs for the therapy of human PAH [11]. Although the ET system contributes to PAH, we currently incompletely comprehend what local modifications of this system occur as a consequence of PAH, particularly in small resistance arteries. Indeed, previous studies that have evaluated the modified pharmacology of the ET system in PAH

were performed on either whole lung homogenate or large pulmonary arteries. However, the increase pulmonary vascular resistance occurs in small pulmonary resistance arteries. Therefore, the purposes of this study were to re-evaluate potential modifications of the pharmacology of the ET system in rat pulmonary resistance arteries from monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension, as these results might contribute to the optimization of treatments of PAH. Our results reveal marked changes in pulmonary vasculature sensitivity to ET receptor antagonism in PAH that may be related to a reduction in ET_B receptor expression.

2. Methods

This study was approved by the animal research committee of the Montreal Heart Institute and conducted according to the guidelines from the Canadian Council of Animal Care.

2.1. *Drugs*

MCT was purchased from Sigma Chemical Co. ET-1 was purchased from American Peptide. The ET_A receptor antagonist A-147627 and the ET_B receptor antagonist A-192621 were kindly provided by Abbott Laboratories whereas bosentan was kindly provided by Actelion.

2.2. *Monocrotaline induced PAH*

Male Wistar rats (325 ± 10 g) received a single intra-peritoneal injection of either 0.5 ml 0.9% saline ($n = 58$) or 0.5 ml 60 mg kg^{-1} MCT ($n = 74$) [3,12-14]. Five weeks later, rats were anesthetized for hemodynamic measurements as previously described in detail [15]. The pulmonary and cerebral resistance arteries were harvested for vascular reactivity. In addition, pulmonary arteries were snap frozen for RNA and protein extraction.

2.3. *ET-1 levels*

Plasma and whole lung tissue homogenate samples were passed on Sep-Pak C₁₈ columns (Waters, Milford, MA) before determination of ET-1 levels by ELISA according to the manufacturer's instructions (Biomedica, Medicorp, Montreal, Quebec, Canada) [15].

2.4. *Quantification of gene expression of preproET-1, ET_A and ET_B receptors by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)*

Total RNA was extracted from pulmonary resistance arteries isolated from the pulmonary right inferior lobe using an RNeasy mini-kit (Qiagen Inc.). The reverse transcriptase reaction contained 5 ng per μ l total RNA (each sample), M-MLV reverse transcriptase (800 U, Invitrogen), RNaseOUT (40 U, Invitrogen), reverse primer (4 pmol l^{-1} , Invitrogen), dNTPs (0.5 mmol l^{-1} , MBI Fermentas), and supplied optimal buffers. PCR was performed with 1 ng of cDNA template containing the appropriate primer concentration; preproET-1 (150 nmol l^{-1}); ET_A receptor (150 nmol l^{-1}); ET_B receptor (200 nmol l^{-1}) and SYBR Green PCR master mix (Applied BioSystems). The primers were as follow:

Rat preproET-1	forward	5'CTGGAGACCCCGCAGGTCCAA 3'
	reverse	5'GTGGGAAGTAAGTCTTTCAAGGATCGC 3'
Rat ET _A receptor	forward	5'TTCCCTCTTCACTTAAGC CGAA 3'
	reverse	5'GACAACAGCAACAGAGGC ATGA 3'
Rat ET _B receptor	forward	5'CTAGCCATCACTGCGATCTT3'
	reverse	5'CAG AAT CCT GCT GAG GTG AA 3'
Rat Cyclophilin A	forward	5'AGGTCCTGGCATCTTGTC-3
	reverse	5'TGATCTTCTTGCTGGTCT-3'

PCR products were purified, sequenced and confirmed to be the genes of interest. Cyclophilin A was chosen as the housekeeping gene as the expression did not change with MCT treatment.

2.5. *Quantification of protein expression of the ET_A and ET_B receptors by Western Blot*

Small pulmonary resistance arteries from the pulmonary right inferior lobe were obtained and pooled for each experimental condition. Standard protein extraction was assessed followed by protein quantification using the Bradford technique. Proteins (50 µg per lane) were separated on 10% acrylamide SDS-PAGE. Following SDS-PAGE, samples were transferred onto either nitrocellulose (ET_A receptor) or PVDF (ET_B receptor) membranes. Membranes were incubated overnight with the primary antibody for the ET_A receptor (Abcam, anti-rabbit, 1:1000) or for the ET_B receptor (Alomone, anti-rabbit, 1:500). Equal protein loading was verified by Red Ponceau.

2.6. *Vascular reactivity studies*

Experiments were conducted on isolated pulmonary arteries and on the basilar artery using a wire myograph as previously described [16,17]. The general contractile capacities of pulmonary arteries from both groups were evaluated with: a high potassium solution (127 mmol l⁻¹), a concentration response curve to ET-1 (0.1 nmol l⁻¹ to 0.3 µmol l⁻¹) in both absolute values (mg of tension) and as percentage of the maximal vasoconstriction (127 mmol l⁻¹ KCl). Preparations of pulmonary arteries were subjected to ET-1 (0.1 nmol l⁻¹ to 0.3 µmol l⁻¹) either in the presence of the ET_A receptor antagonist (A-147627, 10 nmol l⁻¹,

ET_A:ET_B ~1800:1), the ET_B receptor antagonist (A-192621, 1 μmol l⁻¹, ET_A:ET_B ~1:1400) or the dual antagonist bosentan (10 μmol l⁻¹, ET_A:ET_B ~40:1). In order to test potential improvement in efficacy of the ET receptor antagonists in PAH, the concentrations of the antagonists were chosen based on concentration-response curves for normal pulmonary resistance arteries [17,18] as these concentrations caused no or minimal effects on the normal response. The basilar arteries were subjected to ET-1 induced vasoconstriction in the absence and presence of the dual antagonist bosentan.

2.7. *Immunofluorescence of ET receptors in pulmonary and basilar arteries*

The lungs (n = 3) and the basilar artery (n = 3) were oriented to cross-section the arteries of interest and 8 μmol l⁻¹ cryocuts were performed. The ET_B receptor antibody (Alomone, rabbit 1:200) was incubated with α-smooth muscle actin antibody (Sigma, mouse, 1:200). Anti-rabbit Alexa 555 and anti-mouse Alexa 647 (Molecular Probes, donkey, 1:800) antibodies were diluted in their respective antibody diluents and applied. Each experimental condition was performed in triplicates. Confocal imaging and deconvolution were performed as previously described in detail [15].

2.8. *Statistical analysis*

All values are expressed as mean ± SEM. The concentration-response curves were fitted using a 5-parameter logistic fit to determine the maximal responses as well as the EC₅₀ values. When maximal constriction could not be fitted with the 5-parameter logistic, we used the experimental data maximal response (E_{max}) to perform our statistics. At the

end of the protocol, the maximal vasoconstriction was determined by changing the PSS with a high potassium solution (127 mmol l⁻¹KCl). ET-1 induced vasoconstrictions are expressed as a percentage of the maximal response. The differences between groups were evaluated with unpaired two-tailed student *t* tests. Statistical significance was assumed when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *Effect of MCT treatment on hemodynamics parameters*

Five weeks following the injection of MCT, the animals developed severe PAH as evidenced by higher right ventricular systolic pressure (77 ± 3 mm Hg, $n = 58$, $p < 0.001$) when compared to sham rats (26 ± 1 mm Hg, $n = 74$).

3.2. *ET-1 levels*

As shown in Fig. 1A, arterial ET-1 levels were significantly higher in MCT-treated rats ($p < 0.001$) compared to sham-treated rats. ET-1 pulmonary tissue levels were, however, strongly reduced in MCT ($p < 0.001$) compared to sham rats (Fig. 1B). This was associated with a reduction in preproET-1 mRNA levels in pulmonary arteries of MCT rats ($p < 0.05$, Fig. 1C).

3.3. *Quantification of gene expression of ET_A and ET_B receptors in pulmonary resistance arteries*

ET_B receptor mRNA levels was reduced in PAH ($p < 0.001$) compared to normotensive rats (Fig. 2B). In contrast, MCT treatment did not significantly modify the genomic expression of the ET_A receptor (Fig. 2A).

3.4. *Quantification of protein expression of the ET_A and ET_B receptors*

ET_B receptor protein expression was also reduced in MCT-treated rats ($p < 0.05$, Fig. 3B) while that of the ET_A receptor tended to increase but was however non-significant (Fig. 3A).

3.5. *Vascular reactivity studies*

The maximal contraction induced by a high external K⁺ solution (127 mmol l⁻¹) was significantly reduced in pulmonary arteries isolated from MCT rats (279 ± 16 mg, $p < 0.01$) when compared to sham-treated rats (377 ± 20 mg). Similarly, the maximal response induced by ET-1 in absolute values (mg of tension) was also significantly reduced in isolated vessels from MCT (350 ± 10 mg, $p < 0.001$) when compared to sham (560 ± 8 mg) rats. When expressed as a % of the maximal contraction induced by high external K⁺ solution, however, the vasoconstriction induced by ET-1 was preserved in arteries isolated from MCT-treated rats when compared to those from sham-treated rats (Fig. 4A), without change in vascular sensitivity (pEC_{50} 8.2 ± 0.2 and pEC_{50} 8.4 ± 0.3 , respectively). In pulmonary arteries isolated from sham animals, none of the antagonists diminished the contractile response induced by ET-1 (Fig. 4B) or the vascular sensitivity to ET-1 at the concentrations used (pEC_{50} ; ET_A receptor antagonist: 8.2 ± 0.2 , ET_B receptor antagonist: 8.3 ± 0.2 , bosentan: 8.2 ± 0.1). In PAH and when used at the same concentrations, the selective ET_A receptor antagonist and the dual ET_{A/B} receptor antagonist strongly limited ET-1-induced contraction ($p < 0.001$). Only bosentan, however, reduced the vascular sensitivity to ET-1 (7.2 ± 0.2 , $p < 0.01$) (Fig. 4C). The ET_B receptor antagonist A-192621

alone had no significant effect on the contraction induced by ET-1 in arteries isolated from either sham-treated or MCT animals. In isolated cerebral arteries from control animals, ET-1 induced vasoconstriction ($E_{max} 94 \pm 3\%$, $pEC_{50} 8.4 \pm 0.1$) was completely abolished by bosentan at the same concentration ($10 \mu\text{mol/l}$) used in pulmonary arteries ($E_{max} 40 \pm 3\%$, $p < 0.001$, pEC_{50} not measurable) (Fig. 4D), revealing the uniqueness of pulmonary artery sensitivity to ET-1 and antagonism.

3.6. *Immunohistology of ET receptors in pulmonary and basilar arteries*

Examples of composite Z-stack images obtained with ET_B receptor and α -smooth muscle actin antibodies in pulmonary arteries isolated from sham- and MCT-treated rats, and in the basilar artery from control rats, are presented in Fig. 5. Auto-fluorescence of the internal elastic lamina and external elastic lamina (in green) enables easy delineation of the endothelium. We can notice a significant reduction in the fluorescence intensity of both the endothelial and smooth muscle ET_B receptors in the MCT-treated rats when compared to controls. Moreover, the fluorescence intensity of the ET_B receptor in the basilar artery is comparable to the fluorescence intensity of this receptor in pulmonary arteries isolated from MCT-treated rats.

4. Discussion and conclusions

This study was designed to evaluate the local modifications of the ET system in pulmonary resistance arteries from rats with MCT-induced PAH and assess how these modifications could affect the response to ET receptor antagonist with various selectivity. Our main findings in the MCT model of PAH are that: (1) although plasma levels of ET-1 are increased, there is reduced local pulmonary production of this peptide; (2) there is a significant down-regulation of the ET_B receptor in the pulmonary resistance arteries from PAH rats; (3) the relative pulmonary vasoconstriction to ET-1 is not modified by PAH; and finally (4) the inhibitory effect of the selective ET_A receptor antagonist and the dual ET_{A/B} receptor antagonist bosentan on the ET-1 response, is greatly increased in isolated pulmonary resistance arteries from PAH rats. These results reveal pathophysiological events that could be potentially responsible for the effectiveness of ET receptor antagonists in the treatment of PAH.

This study confirms that, in the MCT-induced model of PAH; there is an increase in ET-1 plasma levels and a decrease in pulmonary tissue level of this peptide. Hills et al. [24] have suggested that regional variations in lung ET-1 production decrease whole lung homogenate concentrations but increase local concentration, such as those adjacent to the vascular smooth muscle. We found a reduction in preproET-1 mRNA expression in pulmonary resistance arteries, which therefore excludes the possible regional variation in lung ET-1 production, but confirms that in this particular model pulmonary production of ET-1 is reduced. Hence, despite lower pulmonary levels of the peptide, there is nevertheless proven benefit in blockade of this system in PAH. The increased plasma levels could

therefore come from other tissues such as the kidney and the heart, where an increased expression of preproET-1 mRNA has been observed in this model [2]. Importantly, a reduced pulmonary clearance likely contributes to the observed increase in plasma ET-1, the pulmonary circulation playing a major role in the removal of circulating ET-1, and a reduced pulmonary clearance of this peptide contributes to the hyperendothelinemia observed in both human and animal model of PAH [24-27]. Our group has previously reported a reduction in ET_B-receptor-dependent clearance in the MCT model of PAH [28]. Reduced pulmonary clearance is likely explained by the marked down-regulation of the ET_B receptor in this pathological model.

PAH could modify the expression profile of ET receptors on pulmonary resistance arteries. Therefore, we evaluated gene and protein expressions of ET receptors in pulmonary resistance arteries. ET_A receptor mRNA expression was not modified by PAH. Although the protein expression of the ET_A receptor tended to increase in MCT rats, these results were however non-significant. ET_B receptor mRNA expression was reduced by approximately 45% in PAH, confirming therefore results obtained from whole lung homogenates [20-22]. Likewise, ET_B receptor protein levels were reduced. The reduced expression of the ET_B receptor could modify the ET-1-induced pulmonary vasoconstriction. In fact, it has been previously reported that the main pulmonary artery vascular responsiveness to ET-1 was reduced after 25 days in the MCT model of PAH [2]. Using isolated pulmonary resistance arteries, we established that the relative ET-1 responsiveness is maintained 5 weeks after MCT injury, despite overall reduced smooth muscle contractility. This therefore demonstrates that in small pulmonary resistance arteries, PAH

does not specifically target the ET-1-induced smooth muscle contractile potential. More so, this study demonstrates that the reduced expression of the ET_B receptor did not modify ET-1 induced vasoconstriction. This suggests that the ET_A receptor compensates for the reduction in ET_B receptors to maintain normal contractility to ET-1.

The reduced expression of the ET_B receptor in pulmonary resistance arteries could also modify the response to endothelin receptor antagonists. To investigate this possibility, we compared the effects of selective and dual ET receptor antagonists on the contractile response in both sham and PAH rats. In pulmonary arteries isolated from sham animals, selective ET_A, selective ET_B and dual ET_{A/B} (bosentan) receptor antagonists had no significant effect on ET-1 induced response. We have previously demonstrated that at these concentrations, the selective ET_A and ET_B receptor antagonists had little effect on ET-1-dependent response [17]. It is difficult, however, to reconcile the lack of effect of the dual antagonist bosentan as this antagonist simultaneously blocks both receptors (ET_A/ET_B) responsible for ET-1-induced pulmonary vasoconstriction. Similar results were reported in a previous study in which, this dual antagonist could reduce ET-1-induced vasoconstriction in both tail and mesenteric arteries isolated from the rat but not in pulmonary vessels [19]. In the present study, we also evaluated the effect of a similar concentration of bosentan in rat cerebral arteries. In the isolated basilar artery, bosentan completely abolished the response induced by ET-1, thus corroborating that the pharmacology observed in the pulmonary vascular bed is unique. Most interestingly, bosentan potently inhibited the contraction induced by ET-1 in pulmonary arteries isolated from rats with PAH. Bosentan reduced the maximal response as well as the vascular sensitivity to ET-1. The selective ET_A

receptor antagonist also greatly reduced the maximal vasoconstriction induced by ET-1 without, however, affecting vascular sensitivity.

In PAH rats, bosentan efficiently inhibits ET-1-induced contraction as in isolated cerebral arteries from control rats. We performed immunofluorescence studies in both types of arteries, which qualitatively confirm that the proportion of the ET_B receptor in cerebral artery of control animals is comparable to that in the pulmonary arteries of MCT-treated rats. Consequently, the fact that the basilar arteries exhibit little ET_B receptor at basal level, likely explains the inhibitory effects of bosentan in these vessels and in pulmonary arteries isolated from PAH rats. The immunofluorescence studies also allow us to appreciate the fact that both the endothelial and the smooth muscle ET_B receptors seem to be reduced in pulmonary arteries from PAH rats. It is well known that the endothelial ET_B receptor can affect pulmonary vascular reactivity by releasing nitric oxide and prostacycline [10]. Previous investigators such as Ivy et al. have demonstrated that the ET_B receptor plays a protective role in rats with PAH induced by chronic hypoxia. Indeed, they have demonstrated that ET_B receptor deficient rats display an exaggerated response to hypoxic pulmonary hypertension [31]. Hence, if the endothelial ET_B receptor has a protective role and its expression is reduced in PAH, this could have functional consequences on pulmonary vascular reactivity of MCT treated rats. Indeed, this would imply that the vasodilator role of the ET_B receptor is compromised in PAH and therefore could favour increase pulmonary vasoconstriction via the stimulation of the ET_B receptor present on vascular smooth muscle cells. However, we have demonstrated, in a previous publication, that the endothelial ET_B receptor plays a minor vasodilator role in the ET-1 induced

vasoconstriction of rat's small pulmonary arteries. Indeed, we have demonstrated that removal of the endothelium does not modify the maximal response or the vascular sensitivity to ET-1 or sarafotoxin 6c [17].

It is intriguing that only bosentan was able to reduce the vascular sensitivity to ET-1 in PAH while the selective ET_A receptor antagonist was only able to reduce the maximal vasoconstriction to ET-1. It is tempting to speculate that there is an inter-play between the two ET receptor subtypes that determine the pharmacological response of the antagonists. By blocking both receptor subtypes, bosentan may preserve the interplay, while selective ET_A receptor inhibition unbalances it. Previous investigators such as Mickley [29] and Adner [30] have previously reported the existence of an interaction between the two receptor sub-types in small mesenteric arteries. We have also recently demonstrated the existence of an interaction between the ET_A and ET_B receptor to induce the ET-1 vasoconstriction in pulmonary resistance arteries [17]. Whether this inter-play between the two receptors occurs post-receptor or takes place at the receptor level, remains to be determined. It is known, however, that ET receptors can form heterodimers in cultured transfected HEK cells [23] as well as in rat pulmonary arteries as we previously reported [16]. The functional significance of the dimerization needs to be investigated.

There is a marked down-regulation of the ET_B receptor in pulmonary resistance arteries from rats with MCT-induced PAH. This reduced expression of the ET_B-receptor explains the inhibitory effects of the selective ET_A (A-147627) and a dual ET_A/ET_B receptor antagonist (bosentan) on ET-1-induced constriction of pulmonary resistance

arteries in the MCT model of PAH. Above all, this study provides a functional rationale for using ET antagonists in PAH.

Acknowledgments

Dr. Jocelyn Dupuis is a National Researcher from the «Fonds de la recherche en santé du Québec». Stéphanie Sauvageau is supported by a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

References

- [1] Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:542-554.
- [2] Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993; 73:887-897.
- [3] Jasmin JF, Cernacek P, Dupuis J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105:647-653.
- [4] Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors And Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* 2008; 153 (Suppl 2): S1-S209.
- [5] Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:730-732.
- [6] Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:732-735.
- [7] Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:398-405.
- [8] MacLean MR, McCulloch KM, Baird M. Endothelin ETA- and ETB-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23:838-845.
- [9] De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1988; 85:9797-9800.
- [10] D'Orleans-Juste P, Claing A, Telemaque S, Maurice MC, Yano M, Gratton JP. 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* 1994; 113:1257-1262.
- [11] Channick RN, Sitbon O, Barst RJ, Manes A, Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:62S-67S.
- [12] Dupuis J, Prie S. The ET(A)-receptor antagonist LU 135252 prevents the progression of established pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1999; 4:33-39.
- [13] Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 103:314-318.
- [14] Prie S, Stewart DJ, Dupuis J. EndothelinA receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 1998; 97:2169-2174.
- [15] Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N, Dupuis J. Chronically elevated endothelin levels reduce pulmonary vascular reactivity to nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 506-513.
- [16] Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J. Evaluation of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction following myocardial infarction. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231:840-846.
- [17] Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J. Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. *J Vasc Res* 2007; 44:375-381.
- [18] Wessale JL, Adler AL, Novosad EI, Calzadilla SV, Dayton BD, Marsh KC, Winn M, Jae H-S, Von Geldern TW, Opgenorth TJ and Wu-Wong JR. Pharmacology of endothelin receptor antagonists ABT-627, ABT-546, A-182086 and A-192621: *ex vivo* and *in vivo* studies. *Clinical Science* 2002; 103(suppl 48): 112S-117S.

- [19] Angus J, Wright C. Endothelin and the sympathetic nervous system; in: Friedrich Reinhardt Verlag (eds); *The endothelin system in cardiopulmonary diseases*. Allschwil, Switzerland, 2002, pp 97-125.
- [20] Gosselin R, Gutkowska J, Baribeau J, Perreault T. Endothelin receptor changes in hypoxia-induced pulmonary hypertension in the newborn piglet. *Am J Physiol* 1997; 273:L72-L79.
- [21] Ivy DD, Le Cras TD, Horan MP, Abman SH. Increased lung preproET-1 and decreased ETB-receptor gene expression in fetal pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1998; 274: L535-L541.
- [22] Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Altered expression of ETB-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(Suppl 8):S336-S338.
- [23] Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W, Oksche A. Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:S30-S33.
- [24] Hill NS, Warburton RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997; 83:1209-1215.
- [24] Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996a; 81:1510-1515.
- [26] Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 1996b; 94: 1578-1584.
- [27] Langleben D, Dupuis J, Langleben I, Hirsch AM, Baron M, Senécal JL, Giovinazzo M. Etiology-specific endothelin-1 clearance in human precapillary pulmonary hypertension. *Chest* 2006; 129:689-695.

- [28] Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ET(B) receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Ther* 2000; 13:135-140.
- [29] Mickley EJ, Gray GA, Webb DJ. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 1997; 120:1376-1382.
- [30] Adner M, Shankley N, Edvinsson L. Evidence that ET-1, but not ET-3 and S6b, ET(A)-receptor mediated contractions in isolated rat mesenteric arteries are modulated by co-activation of ET(B) receptors. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 927-935.
- [31] Ivy DD, Yanagisawa M, Gariepy CE, Gebb SA, Colvin KL, McMurtry IF. Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282:L703-L712.

Figure Legends

Figure 1 ET-1 levels and gene expression.

(A) Arterial plasma ET-1 levels in sham (n = 17) and MCT rats (n = 18). (B) Pulmonary ET-1 levels in sham (n = 16) and MCT rats (n = 19). (C) PreproET-1 gene expression in pulmonary resistance arteries normalized with cyclophilin A. Values are expressed as relative quantity (dRn). * p < 0.001, # p < 0.05.

Figure 2 ET receptor gene expression.

Gene expression of the ET_A (A) and ET_B (B) receptors in pulmonary resistance arteries of sham (n = 6) and MCT-treated rats (n = 4) normalized with cyclophilin A. Values are expressed as relative quantity (dRn). * p < 0.001.

Figure 3 ET Receptor protein expression.

Protein expression of the ET_A (A) and ET_B (B) receptors in pulmonary resistance arteries of both sham (n = 3) and MCT-treated rats (n = 3). Blots illustrated represent 3 experiments and the bar graph represents the summarized results of the 3 experiments in which blot intensities were normalized with Ponceau red. # p < 0.05.

Figure 4 Vascular reactivity.

Endothelin-1 induced pulmonary vasoconstriction in sham and MCT-treated rats (A). Endothelin-1 induced-pulmonary vasoconstriction in the presence of an ET_A-R antagonist (open triangle, 10 nmol l⁻¹) an ET_B-R antagonist (filled

circles, $1 \mu\text{mol l}^{-1}$) and the dual antagonist Bosentan (filled diamond, $10 \mu\text{mol l}^{-1}$) in both sham (B) and MCT rats (C). $n = 6-8/\text{group}$. (D) Endothelin-1 induced vasoconstriction of basilar arteries in the absence and presence of bosentan (filled diamond, $10 \mu\text{mol l}^{-1}$). $n = 6-8/\text{group}$. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.001$, # $p < 0.05$.

Figure 5 Immunofluorescence and confocal imaging.

Confocal imaging representing the distribution of the ET_B receptor in transverse $8 \mu\text{mol l}^{-1}$ thick sections of small pulmonary arteries of both sham (A) and MCT rats (B) and in the basilar artery of control rats (C). The first row of figures (from left to right) displays the fluorescence of the ET_B (in red) and both the internal elastic lamina (IEL) and external elastic lamina (EEL) (in green), which enables easy demarcation of the endothelium from the media. The second row displays the fluorescence of smooth muscle actin (in blue), which is limited to the media. The third row represents the co-localisation of the ET_B and smooth muscle actin.

Figure 1

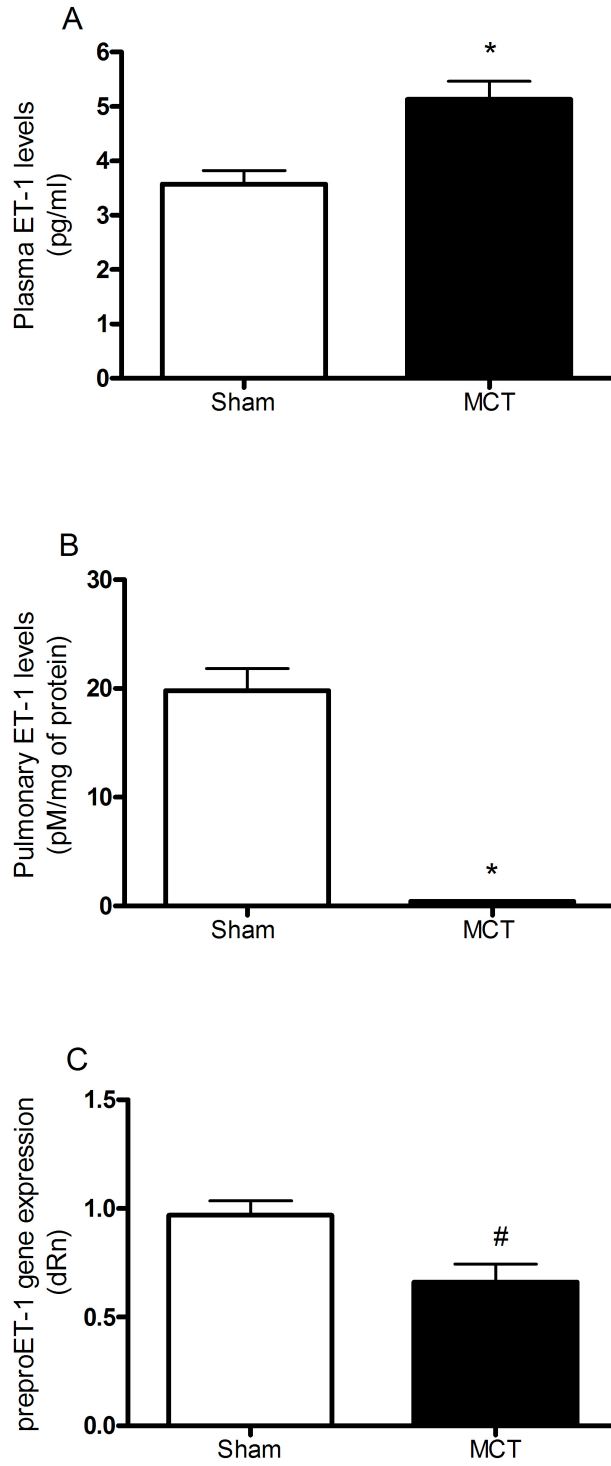


Figure 2

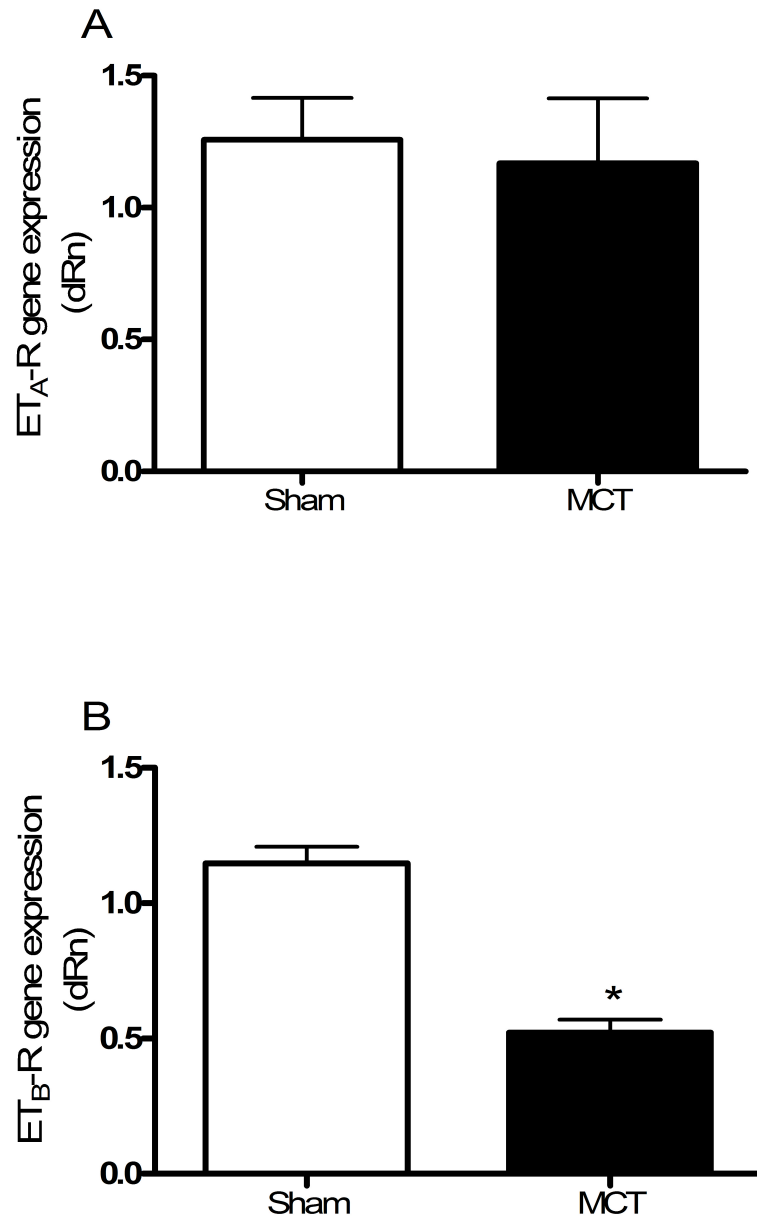


Figure 3

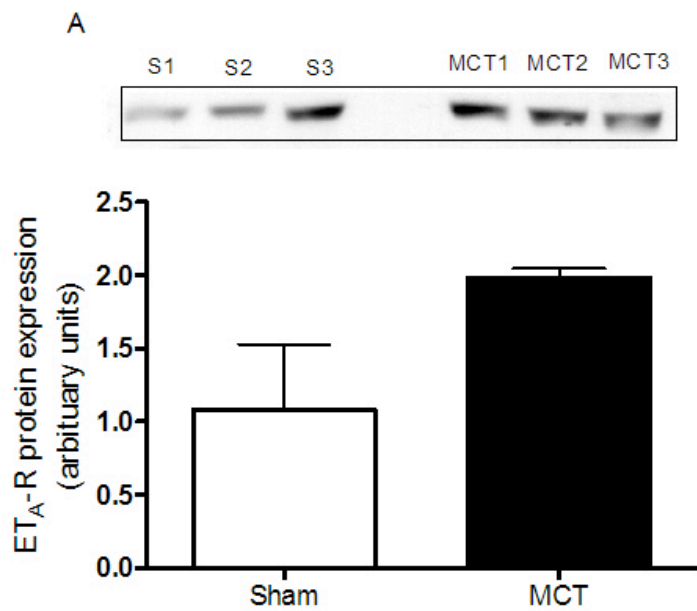
ET_A receptor protein expression

Figure 3

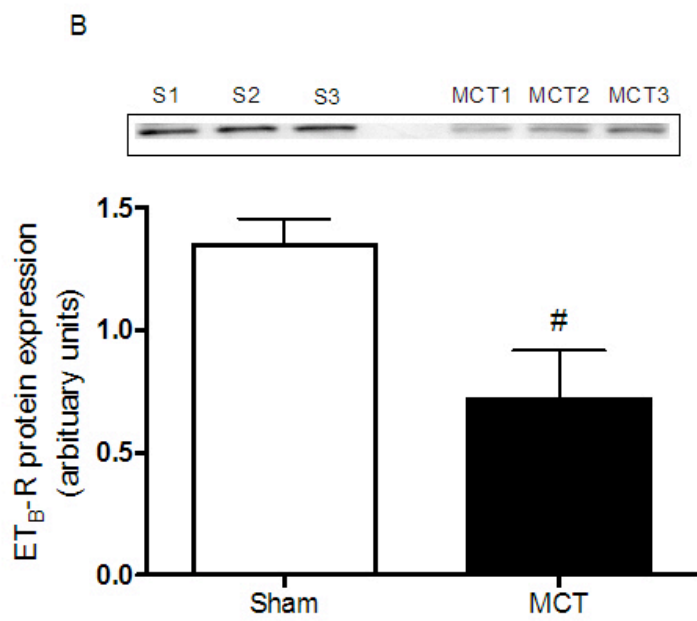
ET_B receptor protein expression

Figure 4

Vascular reactivity studies

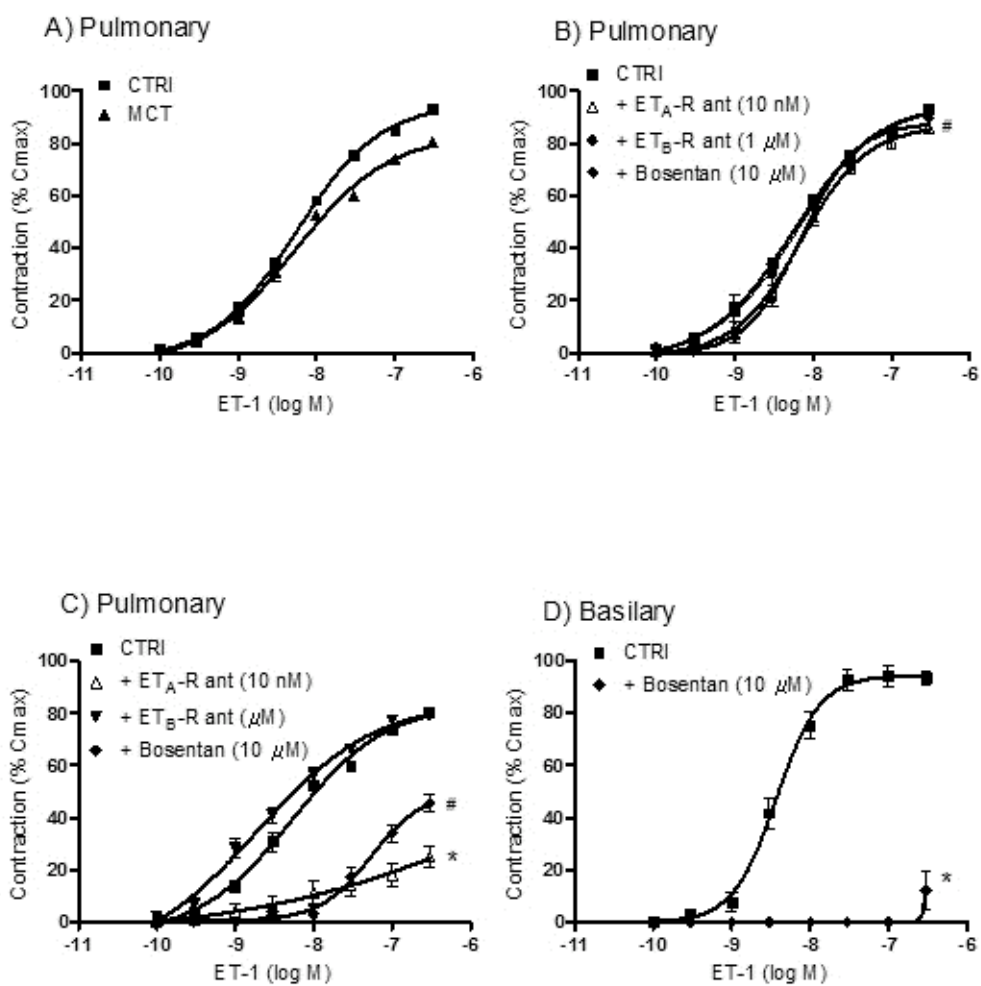


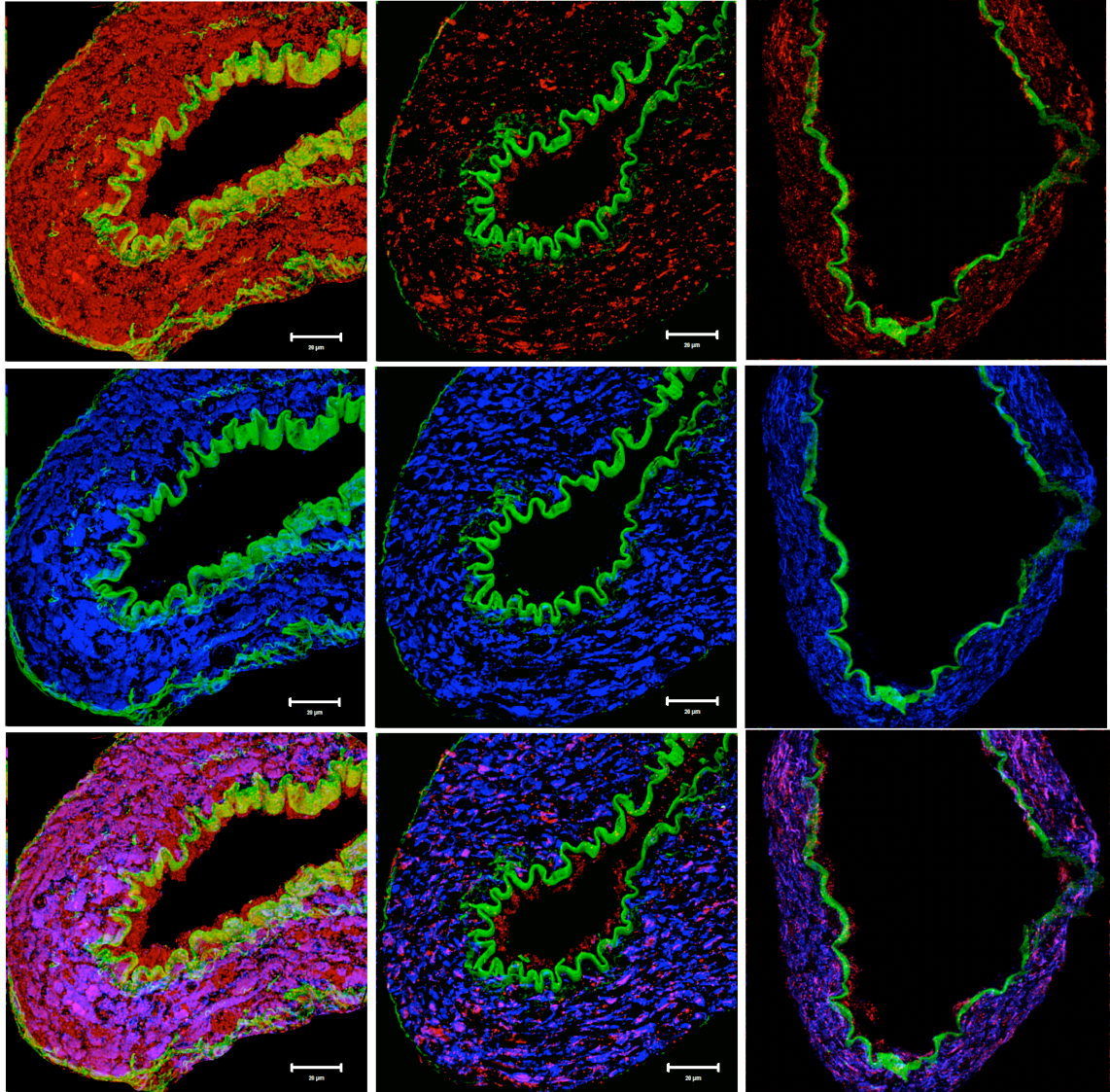
Figure 5

Immunofluorescence

A) Pulmonary

B) Pulmonary

C) Basilar



4.2 Étude #2

Apport original et contribution des co-auteurs

La contribution du premier auteur Stéphanie Sauvageau est majoritaire puisqu'elle a réalisée toutes manipulations techniques relatives à l'étude et a rédigée le manuscrit. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescences et de microscopie confocale. Le Dr Jocelyn Dupuis et le Dr Eric Thorin ont supervisé l'étude et ont participé à la rédaction/révision du manuscrit.

ACCORD DES CO-AUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Stéphanie Sauvageau 3-525-1-0 Ph.D. Physiologie

2. Description de l'article

Stephanie Sauvageau, Jocelyn Dupuis, Eric Thorin.

Disruption of endothelin receptor heterodimer alters pulmonary vascular reactivity to endothelin-1. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics. 2008

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

À titre de co-auteur de l'article présenté ci-dessus, je suis d'accord pour que Stéphanie Sauvageau inclue cet article dans thèse de doctorat qui a pour titre «*Implication des endothélines et de leurs récepteurs vasculaires dans la circulation pulmonaire en condition contrôlé et pathophysiologique*»

Jocelyn Dupuis

Co-auteur

signature

date

Eric Thorin

Co-auteur

signature

date

Disruption of Endothelin Receptor Heterodimers Alters Pulmonary Vascular Reactivity to Endothelin-1

S Sauvageau^a, J Dupuis^{a, c}, E Thorin^{a, b*}

From the Departments of Medicine^a and Surgery^b, University of Montreal, and the Research Center^c of the Montreal Heart Institute, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8 Canada.

Running Title: Endothelin Receptor Heterodimers

Type of contribution: Original Research Paper

Date of preparation: January 26, 2009

Number of text pages: 12

Number of tables: 0

Number of figures: 4

Corresponding author (Thorin E). Tel.: (514) 376-3330/3590; fax: (514) 376-1355.

A B S T R A C T

Background and purpose: Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoconstrictor of pulmonary arteries that induces its effects via the activation of ET_A (ET_A) and ET_B receptors (ET_B). The respective role played by both receptors is however questioned by evidence that they can form functional heterodimers. Disruption of ET_A/ET_B heterodimers could shed light on the roles played by each receptor in vasoconstriction of pulmonary arteries.

Experimental approach: Heterodimerization of ET_A and ET_B was evaluated by co-immunoprecipitation studies. Disruption of heterodimers was carried out by selectively reducing protein expression of ET_A or ET_B. Pulmonary arteries were isolated and incubated in the presence of selective antisense (AS) targeting either the rat ET_A (ET_A-AS) or ET_B (ET_B-AS) mRNA sequences. Following AS treatment, pulmonary arteries were mounted on a myograph to evaluate ET-1-induced constriction.

Key results: Heterodimerization of both receptors was observed. Each AS reduced the protein expression of its targeted receptor. The use of ET_A-AS significantly increased the vascular sensitivity and the maximal vasoconstriction induced by ET-1. In contrast, the ET_B-AS significantly reduced the sensitivity to ET-1 without affecting the E_{max}.

Conclusions and Implications: With suppression of the ET_B, the ET_A still induces maximal pulmonary vasoconstriction to ET-1 but with a reduction in sensitivity. In contrast, suppression of ET_A increased both vascular sensitivity and maximal constriction (E_{max}) to ET-1, suggesting that the ET_A limits ET_B-dependent contraction. This study suggests functional significance of heterodimerisation of ET receptors in pulmonary arteries.

Keywords:

Endothelin-1

Endothelin receptors

Heterodimerisation

Pulmonary arteries

1. Introduction

Endothelin-1 (ET-1) is an important pulmonary vasoconstrictor which induce its effect by the activation of two G protein coupled receptors, the ET_A (ET_A) and ET_B receptors (ET_B). These two receptors where initially characterized from bovine [1] and rat lungs [2], respectively. The distribution of both receptors varies along the pulmonary circulation. The ET_A is predominantly expressed on large pulmonary vessels whereas the ET_B is mainly expressed in small pulmonary vessels. The ET_A and ET_B receptors are both present on vascular smooth muscle cells and induce important vasoconstriction [3;4] however, the ET_B that are present on the endothelial cell can have a dual action. They can induce a vasodilation by the release of nitric oxide and prostacyclin [5] or vasoconstriction by the release of thromboxane A₂ [6].

The ET receptors are two G protein coupled receptors that have the ability to form homo and heterodimers. Indeed, Harada *et al* have demonstrated by a quantitative receptor autoradiography technique, the existence of ET_A-ET_B heterodimers in the anterior pituitary gland [7]. A few years later, Gregan *et al* have demonstrated by immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer experiments that both ET_A and ET_B could form functional heterodimers in transfected HEK293 cells [8]. Furthermore, we have recently demonstrated by co-immunoprecipitation studies that the endothelin receptors could form heterodimers on pulmonary resistance arteries of both sham and myocardial infarct rats [9].

In a previous study, using selective antagonists, we have demonstrated that it was necessary to block both receptors to reduce the ET-1 induced vasoconstriction of pulmonary arteries suggesting that there is an interaction between ET_A and ET_B[10]. We

speculated that the presence of ET_A/ET_B heterodimers on pulmonary resistance arteries could explain the necessity to block both receptors to reduce the ET-1 response. Heterodimerisation of the ET_A and ET_B could influence the role played by the ET_A and ET_B in the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction. Therefore, the aim of the present study was to re-evaluate the role played by both receptors in the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction by disrupting the ET_A/ET_B heterodimer using a non-pharmacological vessel culture approach based on antisense (AS) oligonucleotide (ON) treatment. This study demonstrates the functional importance of the heterodimerisation of the ET_A and ET_B to induce the ET-1 response. Indeed, without ET_B, ET_A is only able to induce the maximal response to ET-1. In contrast, without ET_A the ET_B facilitates the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction.

2. Methods

The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). This study was approved by the Animal Research Committee of the Montreal Heart Institute and conducted according to the guidelines from the Canadian Council of Animal Care.

2.1 Preparation of pulmonary arteries

Male wistar rats weighting between 200 and 250g were anesthetized by a mixture of ketamine and xylazine (1:1) administered intramuscularly. The right inferior lobe was harvested and washed twice with PBS (phosphate buffered solution). Five to six pulmonary resistance arteries per animal were dissected and used either for co-immunoprecipitation or vessel culture studies.

2.2 Co-Immunoprecipitation studies

Small pulmonary arteries from the pulmonary right inferior lobe were obtained as described above and pooled (n=24 arteries) for each experimental condition. Standard protein extraction was assessed using 2 different lysis buffers. The denaturing buffer had the following composition (mM): Tris-HCl pH 7.5 50, β -glycerophosphate 20, sodium fluoride 20, EDTA 5, EGTA 10, Na_3VO_4 1, triton 1% v/v, protease inhibitor cocktail: microcystin 1 μM , DTT 5 mM, leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PMSF 0.5 mM and benzamide 10

mM. The non-denaturing buffer had similar composition but without the addition of DTT. A total of 100 µg proteins from each sample were incubated with ET_B antibody (1:100, Biogenesis, Ontario, Canada) or ET_A antibody (1:100, Abcam, Cambridge, MA) at 4°C for 2 hours with agitation. Three washings of agarose beads (protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology, USA) were carried out before incubation with each sample (20 µl/sample) at 4°C for 1 hour with agitation. The samples were then washed thrice before the addition of sample buffer (containing no beta-mercaptoethanol for the non-denaturing samples) and preparation for immunoblotting.

Proteins were separated on 10% acrylamide SDS-PAGE. Following SDS-PAGE, samples were transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight with the primary antibody for ET_A (anti-rabbit, 1:1000, Abcam, Cambridge, MA) or for ET_B (anti-rabbit, 1:500, Alomone, Jerusalem, Israel).

2.3 Antisense Oligonucleotides

Two different antisense (AS) oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate (ON) (MWG biothech) sequences were used targeting either the rat ET_A or the rat ET_B mRNA sequences and two scrambled (Sc) AS sequences were used as negative controls. These sequences were selected on the basis that they had no more than three consecutive guanosines and had no capacity or minimal capacity to dimerize or form hairpins. The oligonucleotides were resuspended in sterile water.

	<i>Antisense sequences (5'-3')</i>	<i>Scrambled sequences (5'-3')</i>
<i>ET_A</i>	CCACACTGAGAGCGCAGAGA	CAGGACGAATGACCCAGACG
<i>ET_B</i>	GTGCGGAGGAACGCATCAGA	GCAGTAGCGTAGCAGAAG

2.4 Antisense oligonucleotides treatment and vessel culture

Pulmonary resistance arteries were placed into 24 wells plates in 400 μ l of DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) containing 0.5 % FBS (Fetal bovine serum; Invitrogen, Grand Island, USA), 2% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Grand Island, USA), 0.1% fungizone (Invitrogen, Grand Island, USA) with (1 μ M) or without antisense (control) and placed in an incubator maintained at 37°C with 5% CO₂ for either 24 (ET_A) or 72 hours (ET_B). In preliminary experiments, 24 hours exposition to ET_A-AS prevented expression of the ET_A however, longer exposure resulted in re-expression of the ET_A which seemed to have escaped AS treatment. In contrast, ET_B-AS exposure for 72 hours was necessary to prevent ET_B expression. For the 72 hours incubation time, the culture medium was changed and fresh ON-AS was added after 24 and 48 hours. Following the incubation period arteries were used either for protein extraction or vascular reactivity study. The time difference in the incubation period for the ET_A (24 hours) and ET_B (72 hours) did not allow us to evaluate the effect of a simultaneous incubation of both antisenses on the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction. The

efficacy of incorporation of antisense in pulmonary resistance arteries was a success in 60% of cases when we take into account the fact that not all arteries survived the incubation period. However, when the incorporation was a success it reduced the protein expression and the related function of the targeted receptor.

2.5 Western blot analysis of ET_A and ET_B expression in pulmonary arteries following antisense treatment

Pulmonary arteries were rinsed with PBS and spin down by centrifugation at 10 000 RPM for 5 seconds. Standard protein extraction was assessed using the denaturing buffer. Proteins (50µg/lane) were separated on 10% acrylamide SDS-PAGE. Membranes were incubated overnight with the primary antibody for ET_A (anti-rabbit, 1:1000, Abcam, Cambridge, MA) or for the ET_B (anti-rabbit, 1:500, Alomone, Jerusalem, Israel). To verify that the ET_A-AS had no effect on the expression of ET_B the membranes were stripped and incubated overnight with the primary antibody for ET_B. To verify that ET_B-AS had no effect on the expression of ET_A the membranes were stripped and incubated overnight with the primary antibody for ET_A. Equal protein loading was corrected by GAPDH (Abcam, Cambridge, USA) expression.

2.6 Pulmonary vascular reactivity to ET-1 following antisense treatment.

Pulmonary resistance arteries were set up on a wire myograph with a resting tension of 80-100 mg and bathed in a physiological salt solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 119; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.18; MgSO₄ 1.17; NaHCO₃ 14.9; CaCl₂

1.6; EDTA 0.023; glucose 10. The arteries were equilibrated for 30 minutes at 37°C in PSS and bubbled with 5% CO₂, 12% O₂ and 83% N₂ at pH 7.4. Each preparation from each group (Control 24 hours, ET_A-AS, Sc-ET_A-AS; Control 72 hrs, ET_B-AS, Sc-ET_B-AS) was subjected to cumulative concentration-response curves to ET-1 (American peptides, Sunnyvale, CA) (0.1 nM to 0.3 μM). At the end of the protocol, maximal vasoconstriction was determined by changing the PSS with a high potassium solution (127 mmol/l KCl). ET-1 induced vasoconstrictions are expressed as a percentage of the maximal response.

3. Results

3.2 Co-Immunoprecipitation studies

In denaturing conditions (Figure 1), when the ET_A was immunoprecipitated, the immunoblot for ET_A expression revealed a large and elongated band indicative of the abundance of receptor protein (middle lane). When the ET_B was immunoprecipitated, a narrow band for the putative ET_A was expressed at 48 kDa, demonstrating that ET_A co-immunoprecipitated with ET_B (right lane). A negative control experiment carried out in porcine aortic endothelial cells lacking ET_A confirmed the absence of detectable ET_A after immunoprecipitation of ET_B (left lane). Additionally, we excluded the possibility that the observed band for ET_A could represent the heavy chain of the immunoprecipitation antibody (data not shown). The same experiments were performed in non-denaturing conditions (Figure 2A), revealing the higher molecular weight (100 kDa) of ET_A and ET_B heterodimers (right lane). A negative control experiment carried out in porcine aortic endothelial cells revealed again no detectable band confirming the absence of heterodimers in these cells (left lane). To verify the efficacy of the immunoprecipitation of ET_B, we stripped our membrane and incubated it with an ET_B antibody (Figure 2B). In the endothelial preparation a band at 44 kDa reveals the presence of ET_B (left lane). Moreover, the detectable band at 100 kDa confirms the presence of ET_B in the ET_A and ET_B heterodimers (right lane).

3.5 Western blot analysis of ET_A and ET_B expression in pulmonary arteries following antisense treatment

The use of ET_A-AS markedly reduced the protein expression of ET_A in pulmonary resistance arteries when compared to control (Figure 3A). In addition, the use of the specific antisense for ET_A did not modify the protein expression of ET_B (Figure 3A). The use of ET_B-AS markedly reduced the protein expression of ET_B in pulmonary resistance arteries when compared to control (Figure 3B) and did not modify the protein expression of ET_A (figure 3A). The negative controls Sc-ET_A-AS or Sc-ET_B-AS had no effect on the protein expression of either ET_A or ET_B (Figure 3A and 3B).

3.6 Pulmonary vascular reactivity to ET-1 following antisense treatment

As presented in Figure 4A, the use of ET_A-AS significantly increased the vascular sensitivity (-9.90 ± 0.60 , $\log EC_{25} \pm SEM$, $p < 0.05$) and the maximal vasoconstriction induced by ET-1 (100 ± 3 , $E_{max} \pm SEM$, $p < 0.05$) when compared to controls (-8.61 ± 0.26 , $89 \pm 3\%$). The use of the negative control Sc-ET_A-AS did not modify the E_{max} ($81 \pm 6\%$) or the vascular sensitivity (-7.9 ± 0.1) when compared to controls (-7.83 ± 0.05 , $89 \pm 3\%$). In contrast, the use of ET_B-AS significantly reduced the sensitivity to ET-1 (-7.90 ± 0.09 ; $\log EC_{25} \pm SEM$, $p < 0.05$) compared to control vessels (-8.59 ± 0.17) without affecting the E_{max} . The negative control Sc-ET_B-AS neither modified the E_{max} ($88 \pm 5\%$), nor the vascular sensitivity to ET-1 (-8.68 ± 1.20) when compared to controls ($83 \pm 2\%$; -8.59 ± 0.17).

4. Discussion and conclusions

Endothelin-1 induces its effect by the activation of the ET_A and ET_B receptor. Both the ET_A and ET_B receptors are present on the vascular smooth muscle cell and induce important vasoconstriction [3;4] however, the ET_B that are present on the endothelial cell can have a dual action. They can induce a vasodilation by the release of nitric oxide and prostacyclin [5] or vasoconstriction by the release of thromboxane A₂ [6]. The role played by each receptor in the ET-1 response is also questioned by the fact that they can form functional heterodimers. In this study, we have demonstrated the functional existence of ET_A and ET_B heterodimers in pulmonary resistance arteries. Furthermore, by reducing the expression of the ET_A receptor, thus revealing ET_B, we have demonstrated that the ET_B potentiates ET-1-induced response in pulmonary resistance arteries. These results confirm the prominent role of ET_B in inducing ET-1 vasoconstriction in small pulmonary arteries.

In a previous publication, we established the existence of an interaction between the ET_A and ET_B to induce ET-1 pulmonary vasoconstriction[10]. In fact, we reported that the use of either selective ET_A or ET_B antagonists could not reduce the pulmonary contraction induced by ET-1. The combination of both antagonists, however, completely abolished constriction, suggestive of an interaction between the two receptor subtypes. It has become widely accepted that many members of the 7-TM receptor family have the capacity to homo- and heterodimerize with important functional consequences on receptor pharmacology, signalling and regulation. Therefore, we hypothesized that ET_A and ET_B could form heterodimers on pulmonary arteries and interact to induce the ET-1

vasoconstriction and that this dimerisation could explain the necessity to block both receptors to inhibit the ET-1 response.

In the present study, we confirmed by co-immunoprecipitation that ET_A and ET_B form heterodimers in pulmonary resistance arteries. Indeed, the fact that the ET_A could be immunoprecipitated with the ET_B in denaturing conditions suggests that the two receptors could be associated. Moreover, the fact that in non-denaturing conditions we visualise the higher molecular weight of the heterodimer strongly supports this hypothesis. Others investigators such as Gregan, Harada, Walker and their collaborators have also demonstrated that the ET-1 receptors could form heterodimers using various methodological approach such as FRET [8;11], or quantitative receptor autoradiography techniques [7]. However, when studies are performed in heterologous systems, the main concern is that 7-TM receptor heterodimerization may be an artefact of receptor overexpression and/or a result of the techniques used to study receptor interactions. In our study, we have confirmed the existence of heterodimers directly on pulmonary resistance arteries.

The use of antisense selectively prevented the expression of either ET_A or ET_B, which allowed us to evaluate separately the contribution of ET_A and ET_B to ET-1-induced pulmonary vasoconstriction. If we admit the concept that ET_A and ET_B form heterodimers, the use of selective AS directed against one of the receptor should reveal the role played by the other receptor. The use of an ON-AS directed against ET_A, thus isolating ET_B, increased both the vascular sensitivity and the maximal vasoconstriction to ET-1. These data suggest that in the presence of ET_A, the ET_B-dependent pulmonary vasoconstriction is

reduced. Looking at the angiotensin receptors, similar results have been obtained by the group of Quitterer. In their study, they demonstrated that angiotensin 2 receptor (AT_2) bind to AT_1 and inhibit AT_1 signalling in foetal fibroblasts [12]. Furthermore, McCulloch *et al* have suggested in the past the possibility of the existence of an inhibitory ET_A in rat pulmonary resistance arteries that would inhibit ET-1 activation of ET_B receptors [13]. The fact that ET_A -AS potentiated ET-1 responses further demonstrates the functional importance of ET_B in the vasoconstriction of pulmonary resistance arteries induced by ET-1. In the past, the ET_B has always been thought to be a vasodilator however, in the last few years a number of data has suggested that this receptor is involved in regulating many of the effects of ET-1, including vasoconstriction. In isolated rat lungs, ET_B activation was able to induce pulmonary vasoconstriction and pulmonary oedema [14]. It was also established that this receptor is implicated in the vasoconstriction of human [15], rats [10] and rabbit [16] pulmonary resistance arteries. On the other hand, the use of an ET_B -AS significantly reduced the vascular sensitivity to ET-1 without affecting the maximal vasoconstriction suggesting that ET_B are responsible for regulating the vascular sensitivity to ET-1. Thus, ET_A activation alone triggers the maximal vasoconstriction to ET-1, while ET_B can increase the vascular sensitivity to ET-1. Other investigators such as Adner *et al* demonstrated that the use of an ET_A -AS induced a significant attenuation of the ET-1-induced contraction of the circular segments of the human superficial temporal artery and that the use of an ET_B -AS had no effect on ET-1 response [17]. More so, another study demonstrated that, at the highest concentration tested, ETR-p1/f1 (ET_A -AS) markedly suppressed ET-1 response in the rat renal arcuate artery [18]. These contradictory results

could be explained by the fact that in these preparations, and in contrast to pulmonary arteries, the ET-1 response is solely mediated by the activation of ET_A [18-20]. Indeed, in the pulmonary circulation, many studies have demonstrated that both the ET_A and ET_B induce the ET-1 vasoconstriction of resistance arteries [4;10;13].

The use of specific antisense induced quite different results on the ET-1 response than those obtained with the use of selective antagonists. We have demonstrated that the use of either a selective ET_A or ET_B antagonist had no effect on the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction [10]. However, the use of specific antisense directed against either the ET_A or ET_B increased or reduced the ET-1 response, respectively. The modulation of the number of dimers on pulmonary resistance arteries could explain these contradictory results. The use of selective antagonists does not modify the number of ET_A/ET_B heterodimers present on the smooth muscle cell and therefore, the receptor that is not targeted by the antagonist is able to compensate and induce the ET-1 pulmonary vasoconstriction. However, the use of a specific antisense reduces the protein expression of its targeted receptor; consequently there are essentially monomers left of the receptor not targeted by the antisense. The disruption of the heterodimers allowed us to evaluate separately the role played by each receptor in the ET-1 induced pulmonary vasoconstriction.

Some limitations need to be noted. The ET-AS did not reduce by 100% ET_A and ET_B protein expression and it is possible that some functional heterodimers remained. The importance of appropriate controls in antisense experiments cannot be overemphasized, and a number of controls are necessary. Briefly, at the very least, one should (1) demonstrate a

reduction in targeted protein, (2) determine the effect of the active oligonucleotide on another gene product, and (3) determine the effects of mismatched oligonucleotides on the targeted protein. In this study we have (1) demonstrated that ET_A and ET_B AS selectively reduced the protein expression of its expected target, (2) without affecting that of the other, while (3) the scrambled sequences of these AS had no effect on ET_A and ET_B protein expression. We are therefore confident that the AS used in this study were highly selective.

In conclusion, suppression of ET_A expression increased the vascular sensitivity and the maximal constriction to ET-1, suggesting that in control conditions the ET_A limits ET_B-dependent contraction. These results demonstrates the functional significance of ET_B in ET-1 induced vasoconstriction and suggests that the heterodimerization of ET_A and ET_B as important functional consequences.

Conflicts of interest

None

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Dr. Jocelyn Dupuis is a National Researcher form the "Fonds de la recherche en santé du Québec". Stéphanie Sauvageau is supported by a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

Reference List

- [1] Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 12-20-1990;348:730-732.
- [2] Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 12-20-1990;348:732-735.
- [3] Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J: ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2-1-2002;165:398-405.
- [4] MacLean MR, McCulloch KM, Baird M: Endothelin ETA- and ETB-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23:838-845.
- [5] De Nucci G, Thomas R, Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9797-9800.
- [6] D'Orleans-Juste P, Claing A, Telemaque S, Maurice MC, Yano M, Gratton JP: 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* 1994;113:1257-1262.
- [7] Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M: Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:207-226.
- [8] Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A: Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 6-25-2004;279:27679-27687.
- [9] Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J: Evaluation of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction following myocardial infarction. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:840-846.
- [10] Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J: Endothelin-1-Induced Pulmonary Vasoreactivity Is Regulated by ET(A) and ET(B) Receptor Interactions. *J Vasc Res* 5-8-2007;44:375-381.

- [11] Evans NJ, Walker JW: Endothelin receptor dimers evaluated by FRET, ligand binding, and calcium mobilization. *Biophys J* 2008;95:483-492.
- [12] bdAlla S, Lothar H, bdel-tawab AM, Quitterer U: The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 10-26-2001;276:39721-39726.
- [13] McCulloch KM, MacLean MR: EndothelinB receptor-mediated contraction of human and rat pulmonary resistance arteries and the effect of pulmonary hypertension on endothelin responses in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 3:S169-S176.
- [14] Sato K, Oka M, Hasunuma K, Ohnishi M, Sato K, Kira S: Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1995;269:L668-L672.
- [15] MacLean MR, Docherty CC, McCulloch KM, Morecroft I: Effect of novel mixed ETA/ETB antagonists on responses to ET-1 in human small muscular pulmonary arteries. *Pulm Pharmacol Ther* 1998;11:147-149.
- [16] LaDouceur DM, Flynn MA, Keiser JA, Reynolds E, Haleen SJ: ETA and ETB receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 10-15-1993;196:209-215.
- [17] Adner M, Erlinge D, Salford LG, Yee F, Wahlestedt C, Edvinsson L: Human endothelin ETA receptor antisense oligodeoxynucleotides inhibit endothelin-1 evoked vasoconstriction. *Eur J Pharmacol* 8-22-1994;261:281-284.
- [18] Wu X, Richards NT, Johns EJ, Kohsaka T, Nakamura A, Okada H: Influence of ETR-p1/fl antisense peptide on endothelin-induced constriction in rat renal arcuate arteries. *Br J Pharmacol* 1997;122:316-320.
- [19] Pierre LN, Davenport AP: Autoradiographic study of endothelin receptors in human cerebral arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 3:S326-S328.
- [20] Pierre LN, Davenport AP: Relative contribution of endothelin A and endothelin B receptors to vasoconstriction in small arteries from human heart and brain. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1:S74-S76.

Figures Legends

Figure 1. ET heterodimers

Heterodimerization of endothelin receptors in rat pulmonary resistance arteries. Western Blotting for ET_A was performed after immunoprecipitation of the ET_A or the ET_B in denaturing conditions. Endothelial cells (EC) were used as a negative control (left lane). Immunoprecipitation of ET_A and Western Blotting for the expression of the ET_A (positive control, middle lane). Immunoprecipitation of the ET_B and Western Blotting for the expression of ET_A (right lane).

Figure 2 ET heterodimers

Heterodimerization of endothelin receptors in rat pulmonary resistance arteries. Immunoblot for ET_A receptor was performed after immunoprecipitation of ET_A or ET_B in non denaturing conditions (A). Endothelial cells (EC) were used as a negative control (left lane). Immunoprecipitation of ET_B and Western Blotting for the expression of ET_A (right lane). (B) The membrane used in A was stripped and incubated with ET_B antibody.

Figure 3 ET receptor protein expression

Western blot analysis of ET_A and ET_B expression in pulmonary arteries following antisense treatment. (A) Pulmonary arteries treated with ET_A-AS. The use of ET_A-AS reduced the protein expression of ET_A (first row second column) and had no effect on the protein expression of ET_B (second row

second column). The Sc-ET_A-AS had no effect on ET_A (first row fourth column) or ET_B (first row fourth column). (B) Pulmonary arteries treated with ET_B-AS. The use of ET_B-AS reduced the protein expression of ET_B (first row second column) and had no effect on the protein expression of ET_A (second row second column). The Sc-ET_B-AS had no effect on ET_A (first row fourth column) or ET_B (first row fourth column). Ctrl (control), AS (antisense), Sc-AS (scrambled antisense). Equal protein loading was corrected with GAPDH.

Figure 4 Pulmonary vascular reactivity study.

Pulmonary vascular reactivity to ET-1 following antisense treatment. (A). ET-1 induced pulmonary vasoconstriction following treatment with ET_A-AS (upward triangle) or Sc-ET_A-AS (downward triangle). (B) ET-1 induced pulmonary vasoconstriction following treatment with the ET_B-AS (upward triangle) or the Sc-ET_B-AS (downward triangle). $n = 6-8/\text{group}$ Values are mean \pm SEM. * $P < 0.001$, # $P < 0.05$.

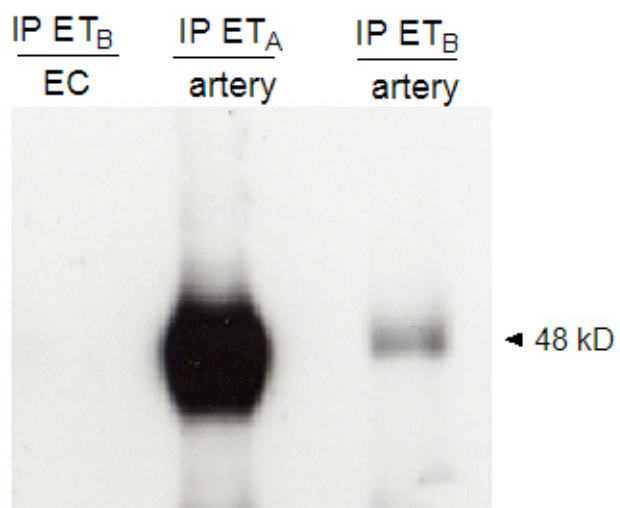
Figure 1Immunoblot for ET_A in denaturing conditions

Figure 2

Immunoblot in non-denaturing condition

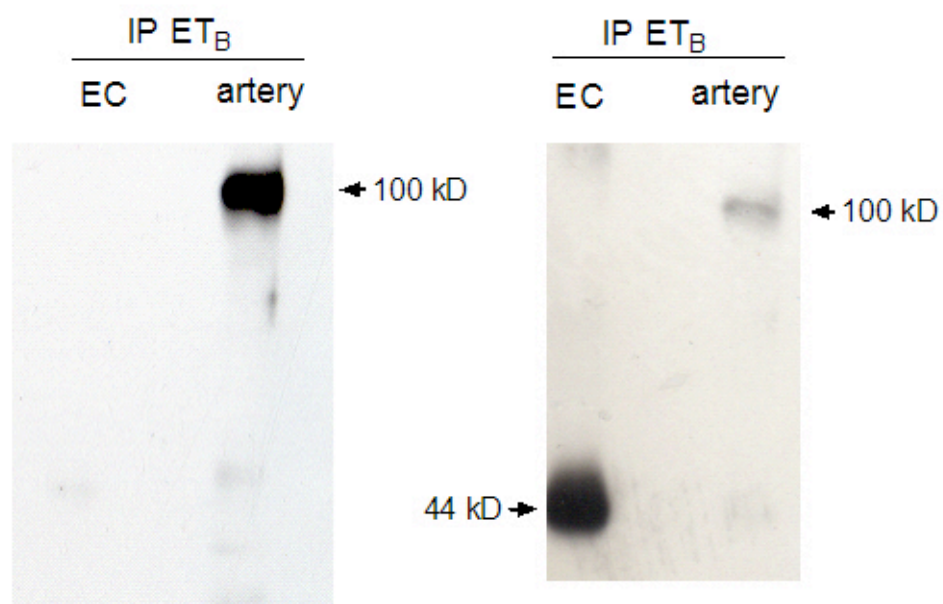
A ET_A receptor**B** ET_B receptor

Figure 3

Immunoblot following antisens treatment

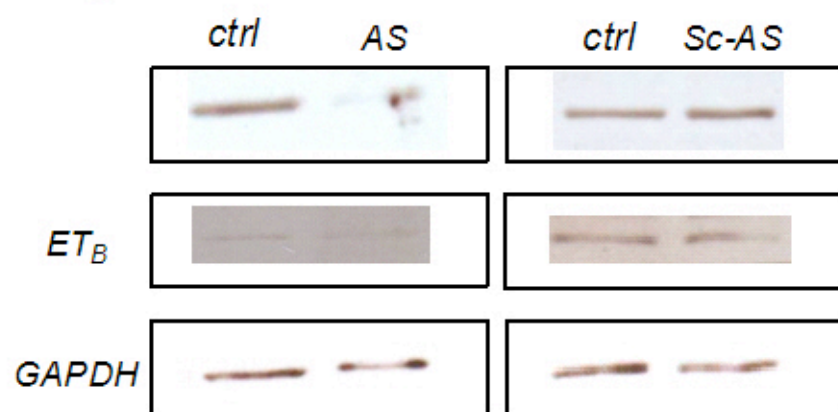
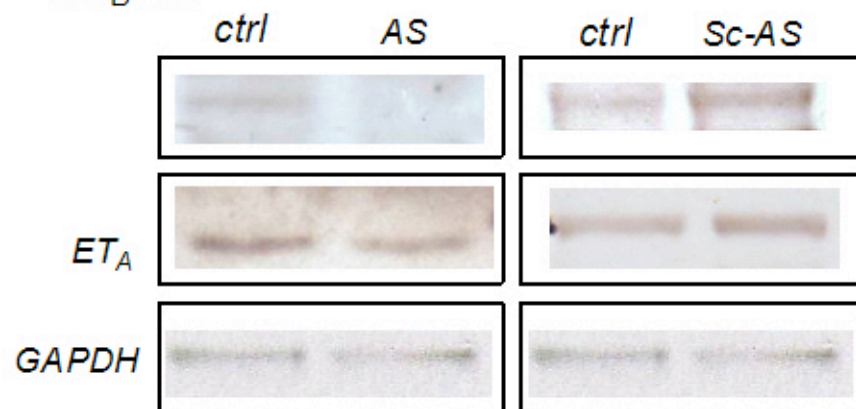
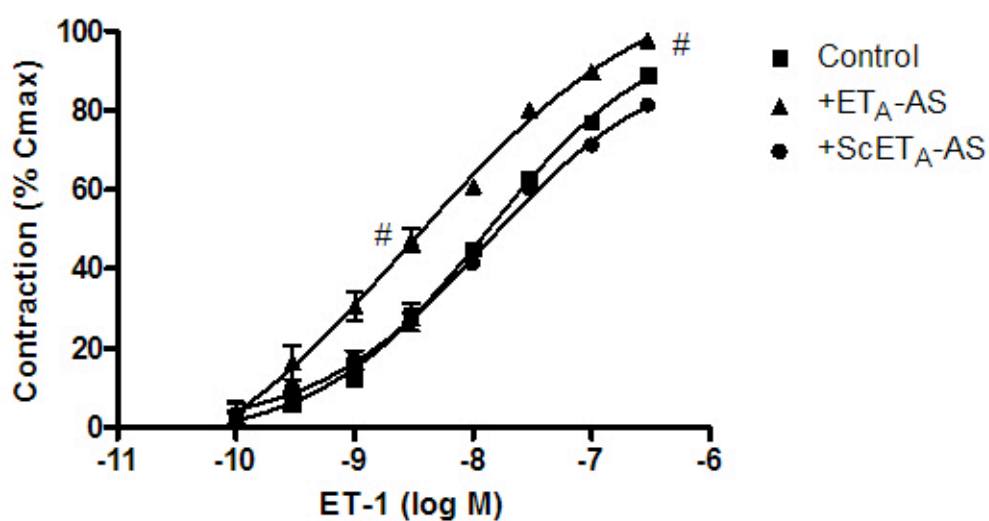
A ET_A -AS**B** ET_B -AS

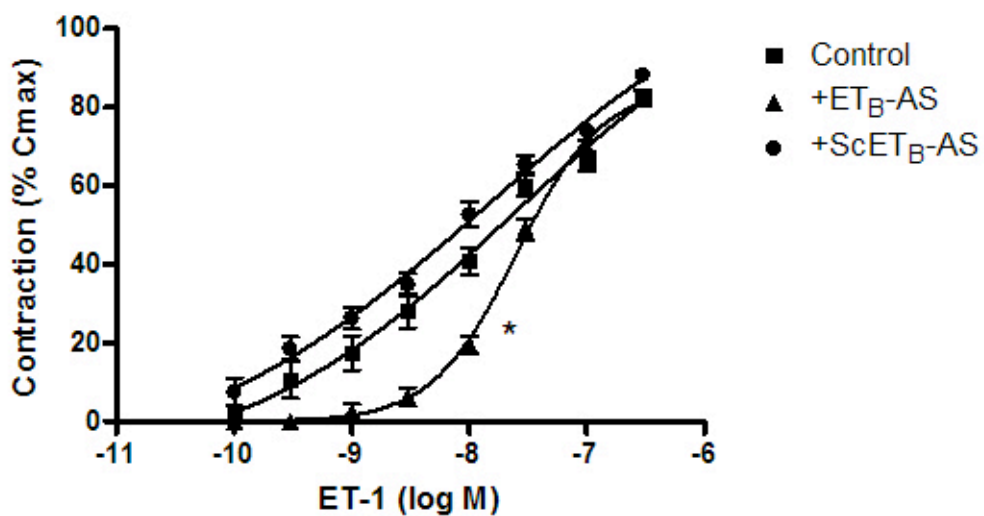
Figure 4

Pulmonary vascular reactivity

A



B



4.3 Étude #3

Apport original et contribution des co-auteurs

La contribution du premier auteur Stéphanie Sauvageau est majoritaire puisqu'elle a réalisée toutes les manipulations techniques relatives à l'étude et a rédigée le manuscrit. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescences et de microscopie confocale. Le Dr Eric Thorin et le Dr Jocelyn Dupuis ont supervisé l'étude et ont participé à la rédaction/révision du manuscrit.

ACCORD DES CO-AUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Stéphanie Sauvageau 3-525-1-0 Ph.D. Physiologie

2. Description de l'article

Stephanie Sauvageau, Eric Thorin, Louis Villeneuve, Jocelyn Dupuis.

Endothelin-3-dependent pulmonary vasoconstriction in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension. Peptides Journal. 2008 (publié)

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

À titre de co-auteur de l'article présenté ci-dessus, je suis d'accord pour que Stéphanie Sauvageau inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «*Implication des endothélines et de leurs récepteurs vasculaires dans la circulation pulmonaire en condition contrôlé et pathophysiologique*»

Eric Thorin

Co-auteur

signature

date

Louis Villeneuve

Co-auteur

signature

date

Jocelyn Dupuis

Co-auteur

signature

date

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1 Identification de la revue ou du livre

Peptides Journal

2 Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Abba J. Kastin

3 Identification de l'article

Stephanie Sauvageau, Eric Thorin, Louis Villeneuve, Jocelyn Dupuis. Endothelin-3 dependant pulmonary vasoconstriction in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Peptides* 2008, doi: 10.1016/j.peptides.2008.08.003

L'étudiant, Stéphanie Sauvageau, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «*Implication des endothélines et de leurs récepteurs vasculaires dans la circulation pulmonaire en condition contrôle et pathophysiologique*»

Abba J. Kastin

Éditeur

signature

date

Endothelin-3-dependent pulmonary vasoconstriction in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension

Stéphanie Sauvageau^a, Eric Thorin^{a,b}, Louis Villeneuve^a, Jocelyn Dupuis^{a,c,*}

^aResearch Center, Departments of ^bSurgery and ^cMedicine, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada

Running Head: ET-3 and pulmonary hypertension

Word Count: 3,124 (text)

*Corresponding author. Jocelyn Dupuis, MD, PhD, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada.

Tel.: (514) 376-3330; Fax: (514) 376-1355

Abstract

Blockade of the endothelin(ET) system is beneficial in pulmonary arterial hypertension(PAH). The contribution of ET-3 and its interactions with ET receptors have never been evaluated in the monocrotaline -induced model of PAH. Vasoreactivity of pulmonary arteries was investigated; ET-3 localization was determined by confocal imaging and gene expression of prepro-ET-3 quantified using RT-PCR. ET-3 plasma levels tended to increase in PAH. ET-3 localized in the media of pulmonary arteries, where gene expression of prepro-ET-3 was reduced in PAH. ET-3 induced similar pulmonary vasoconstrictions in sham and PAH rats. In sham rats, the ET_A antagonist A-147627 (10 nmol/l) significantly reduced the maximal response to ET-3 (E_{max} 77±1% to 46±2%, mean±SEM, $P<0.001$), while the ET_B antagonist A-192621 (1 µmol/l) reduced the sensitivity (EC_{50} 21±7 nmol/l to 59±16 nmol/l, $P<0.05$) without affecting E_{max} . The combination of both antagonists completely abolished ET-3-induced pulmonary vasoconstriction. In PAH, the ET_A antagonist further reduced the maximal response to ET-3 and shifted the EC_{50} (E_{max} 23±2%, $P<0.001$, EC_{50} 104±24 nmol/l, $P<0.05$), while the ET_B antagonist only shifted the EC_{50} (123±36 nmol/l, $P<0.05$) without affecting the E_{max} . In PAH, dual ET receptor inhibition did not further reduce constriction compared to selective ET_A inhibition. ET-3 significantly contributes to pulmonary vasoconstriction by activating the ET_B at low concentration, and the ET_A at high concentration. The increased inhibitory effect of the ET_A antagonist in PAH suggests that the contribution of ET_B to ET-3-induced vasoconstriction is reduced. Although ET-3 is a potent pulmonary vasoconstrictor in PAH, its potential pathophysiologic contribution remains uncertain.

Keywords: Endothelial receptors; Endothelins; Pulmonary circulation; Vasoactive agents

Glossary/Nomenclature

EEL = external elastic lamina

IEL = internal elastic lamina

ET = endothelins

ERA = ET receptor antagonists

MCT = monocrotaline

PSS = physiological salt solution

1. Introduction

Endothelins are a family of three related peptides. Mammals, including humans, produce three distinct isoforms of the ET peptide family, ET-1, ET-2 and ET-3, which may have different profiles of biological activity on vascular and non-vascular tissues [11]. These three isopeptides show different pharmacological profiles of pressor/vasoconstrictor activities [11]. ET-3 differs from ET-1 by six amino acid substitutions. ET-3 is highly expressed in the brain, but is also present in the gut, pancreas, liver, kidneys and lungs. Two receptor subtypes for ET have been identified in mammals. The ET_A recognizes ET-1 with high affinity and ET-3 with low affinity [2]. The ET_B recognizes the different ET with similar and high affinity [20].

Among the known physiological properties of ET-3 is its interaction with ET_B that is crucial for the development of melanocytes [1]. Moreover, the expression of ET-3 by the mesenchymal cells of the colon is necessary for successful development of the distal enteric nervous system [3,10]. Elevated plasma ET-3 levels have been demonstrated in patients undergoing haemodialysis [23], in patients with cirrhosis [24] and glomerulonephritis [25].

The ET system is activated in pulmonary arterial hypertension (PAH) [14] and ET receptor antagonists (ERA) have demonstrated their effectiveness and have been approved for the therapy of this condition [9]. A recent study by Montani et al. has demonstrated for the first time that ET-3 plasma concentration decreased in patients suffering from PAH with various ethiology and that these levels correlated with clinical parameters of severity of PAH. Moreover, they have demonstrated that the ratio ET-1/ET-3 might bring more information than the measurement of ET-1 alone [17]. Although the deleterious effects of

ET-1 on the pulmonary circulation are well established, only few studies have focused on ET-3 in PAH. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the potential implication of ET-3 in MCT-induced PAH and evaluate the roles of ET_A and ET_B on ET-3-induced pulmonary vascular reactivity. We have: 1) measured ET-3 levels in both plasma and whole lung tissue homogenates; 2) investigated ET-3 localization in pulmonary vessels using confocal imaging; 3) measured gene expression of preproET-3 in pulmonary resistance arteries; 4) evaluated the roles of ET_A and ET_B in ET-3-induced vasoconstriction of pulmonary resistance arteries.

2. Experimental/Materials and methods

The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). This study was approved by the Animal Research Committee of the Montreal Heart Institute and conducted according to the guidelines from the Canadian Council of Animal Care.

2.1. Monocrotaline-induced PAH

Male Wistar rats weighting between 300 and 350 g received an intraperitoneal (IP) injection of either 0.5 ml 0.9% saline or 0.5 ml 60 mg/kg monocrotaline (MCT) [6,12,19]. Five weeks later, rats were anesthetized for hemodynamic measurements as previously described in detail [15]. Briefly, the right jugular vein and right carotid artery were isolated, incised and cannulated with Millar catheters to measure central venous, right ventricular, systemic arterial and left ventricular pressures. The right inferior lobe was then snap frozen for either confocal imaging or ET-3 quantification. The pulmonary resistance arteries were harvested for vascular reactivity or snap frozen for RNA extraction.

2.2. ET-3 levels

Plasma and pulmonary tissue homogenate samples were passed on Sep-Pak C₁₈ columns (Waters, Milford, MA, USA) before determination of ET-3 levels by ELISA according to the manufacturer's instructions (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd, Gunma, Japan). The ET-3 antibody used was directed primarily towards ET-3 with 7.5% cross-reactivity

with ET-1. Cross-reactivity for ET-1 (1-31) and ET-2 (1-31) were 0.1% each. The intra and interassay coefficient was 7.1% and 3.4% respectively.

2.3. Quantification of gene expression of preproET-3 by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from small intralobar pulmonary arteries from the pulmonary right inferior lobe using an RNeasy mini-kit (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada). The reverse transcriptase reaction contained 5 ng/ μ L total RNA (each sample), M-MLV reverse transcriptase (800 U, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), RNaseOUT (40 U, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), anti-sens primer (4 pM, Invitrogen, Burlington, ON, Canada), dNTPs (0.5 mmol/l, MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada), and supplied optimal buffers. The reaction protocol consisted of 3 successive incubation steps: 1) 25°C for 10 minutes; 2) 37°C for 50 minutes; and 3) 70°C for 15 minutes. RT-PCR was performed with 1 ng of cDNA template containing the appropriate primer concentration; preproET-3 (300 nmol/l) and SYBR Green PCR master mix (Applied BioSystems, Foster City, California, USA). Primers for each gene were obtained from distinct exons that spanned an intron by using the Ensembl Genome Browser program (<http://www.ensembl.org>). The sequence specificity of each primer was verified with the Blast program derived from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primers used were as follows:

Rat preproET-3	Forward	5'GGGACCAGGAGGAAAAGAGGGTG3'
	Reverse	5'ACTGGGAACCTTTCTGGAAGCTGG-3'
Rat cyclophilin A	Forward	5'AGGTCCTGGCATCTTGTC3'
	Reverse	5'TGATCTTCTTGCTGGTCT3'

For each primer set, the PCR conditions were optimized to obtain only the specific product with an efficiency calculated from dilution curves of between 95-105%. Each sample was measured in duplicate and each plate contained negative and positive controls. PCR product was purified, sequenced and confirmed to be the gene of interest. Cyclophilin A was chosen as the house keeping gene which did not change with MCT treatment.

2.4. *ET-3 staining in small pulmonary arteries*

Immunofluorescence and confocal imaging were performed as recently described in detail [15]. Briefly the lungs were oriented to cross-section the arteries of interest and 8 $\mu\text{mol/l}$ cryocuts were performed. ET-3 antibody (1/200, rabbit, Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, California, USA) was incubated with alpha smooth muscle actin antibody (1/200, mouse, Sigma, St-Louis, Missouri, USA). Anti-rabbit Alexa 555 antibody (1/800, donkey, Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) and anti-mouse Alexa 647 antibody (1/800, donkey, Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) antibodies were diluted in their respective antibody diluents and applied. In order to identify the limits of the media and of

the endothelium we used the internal elastic lamina (IEL) and external elastic lamina (EEL) auto-fluorescence.

2.5. *Confocal imaging and deconvolution*

Slides were analyzed using a Zeiss LSM 510 confocal microscope. We used a plan Apo-Chromat 63×/1.4 oil DIC objective. HeNe1 (543 nm) and HeNe2 (633 nm) lasers were used for excitation of the anti-rabbit Alexa 555 and anti-mouse Alexa 647 antibodies respectively. IEL and EEL auto fluorescence was obtained with the Argon laser line (488 nm) and collected between 505 and 530 nm. Z-stacks of each tissue were performed and images were taken at every 0.8 μm (top to bottom) in order to respect the Nyquist criteria in z-sampling. Z-stacks were *deconvolved* using the Maximum Likelihood Estimation (MLE) algorithm of the Huygens Pro software (version 2.4.1, Scientific Volume Imaging). Transparent projections (in face view) were applied to each z-stack using the Projection tool of the LSM 510 software.

2.6. *Vascular reactivity studies*

Experiments were conducted on fifth generation pulmonary arteries of 1 to 2 mm long and 150 to 200 μm diameters using a micro-vascular myograph. Approximately five to six arteries were harvested from each animal. Only one reactivity protocol per artery coming from different animals was undertaken such that for each stimulation protocol, the number of arteries corresponds to the number of different animals studied. They were set up on a myograph with a resting tension of 80 to 100 mg and bathed in a physiological salt solution

(PSS) containing the following composition (mmol/l): NaCl 119; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.18; MgSO₄ 1.17; NaHCO₃ 1.17; CaCl₂ 1.16; EDTA 0.023; glucose 10. The arteries were equilibrated for 30 min at 37°C in PSS and bubbled with 5% CO₂, 12% O₂ and balance in N₂. For each vessel, the integrity of the endothelium was determined by testing endothelium-dependent vaso-relaxation to acetylcholine (100 µmol/l). The general contractile capacities of pulmonary arteries from both groups were evaluated with: a high potassium solution (127 mM), a concentration response curve to ET-3 and ET-1 (0.1 nmol/l to 0.3 µmol/l) in both absolute values (mg of tension) and as percentage of the maximal vasoconstriction (127 mM KCl). The ET-3 concentration-response curve was assessed in the presence and absence of an ET_A antagonist (A-147627, 10 nmol/l, ET_A:ET_B ~1800:1), an ET_B antagonist (A-192621, 1 µmol/l, ET_A:ET_B ~1:1400) or the combination of both antagonists. The concentrations of antagonists that were used in these experiments were based on previous experiments [21].

2.7. *Drugs*

The MCT was purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, Missouri, USA). The MCT was dissolved in 1.0N HCl, and the pH was adjusted to 7.4 with 1.0N NaOH. ET-3 was purchased from American Peptide (Sunnyvale, California, USA). The ET_A-R antagonist A-147627 and ET_B-R antagonist A-192621 were kindly provided by Abbott Laboratories (USA).

2.8. *Statistical analysis*

All values are expressed as mean±SEM. For each pharmacological condition on each isolated artery, the isometric recording of the concentration-response curves were fitted using a 5-parameter logistic fit to determine the maximal responses as well as the EC₅₀ values. At the end of the protocol, the maximal vasoconstriction was determined by changing the PSS with a high potassium solution (127 mmol/l KCl). ET-3 induced vasoconstrictions are expressed as a percentage of the maximal response. The differences between groups were evaluated with an unpaired student *t* test. Statistical significance was assumed when $P<0.05$.

3. **Results**

3.1. *Effect of MCT treatment*

Five weeks following the injection of MCT, the animals developed severe PAH as evidenced by higher right ventricular systolic pressure (77 ± 3 mmHg, $n=58$, vs. 26 ± 1 mmHg, $n=74$, $P<0.001$) and the presence of right ventricular hypertrophy as measured from the ratio of right over left ventricular weight (0.64 ± 0.013 vs. 0.27 ± 0.004 , $P<0.001$).

3.2. *ET-3 levels*

As shown in Fig. 1A, plasma ET-3 levels tended to increase in PAH rats (0.96 ± 0.09 pg/ml, $n=20$, $P=0.0549$) when compared to sham rats (0.81 ± 0.09 pg/ml, $n=19$). We found an increase ET-1/ET-3 plasma ratio between sham (4.09 ± 0.34 , Mean±SEM) and MCT rats (6.16 ± 0.72 , $P<0.05$). There were no correlation between ET-3 levels and the severity of

pulmonary hypertension ($R^2 = 0.01$, $P=0.65$) or with right ventricular hypertrophy ($R^2 = 0.08$, $P=0.24$). Figure 1B shows that ET-3 pulmonary tissue levels were significantly reduced in PAH (0.31 ± 0.04 pmol/l/mg of protein, $n=20$, $P<0.05$) when compared to sham rats (0.43 ± 0.04 pmol/l/mg of protein, $n=19$).

3.3. *Quantification of gene expression of preproET-3 in pulmonary resistance arteries*

The preproET-3 mRNA levels in pulmonary resistance arteries were reduced in PAH (0.82 ± 0.10 dRn, $P<0.05$) compared to sham animals (1.20 ± 0.10 dRn; Fig. 1C).

3.4. *Immunofluorescence of ET receptors in small pulmonary arteries*

Examples of composite Z-stack images obtained with the ET-3 and alpha smooth muscle actin antibodies are shown in Fig. 2. Auto-fluorescence of the IEL and EEL enables easy delineation of the endothelium. ET-3 immunostaining is only evident in the media of pulmonary resistance arteries from both sham (Fig. 2A) and PAH rats (Fig. 2B).

3.5. *Vascular reactivity studies*

The maximal depolarization induced by a high K^+ solution was significantly reduced in MCT rats (279 ± 16 mg, $P<0.01$) when compared to sham rats (377 ± 20 mg). Similarly, the response induced by ET-3 and ET-1 was also significantly reduced in MCT rats (223 ± 10 mg, $P<0.001$, 350 ± 10 mg, $P<0.001$) when compared to sham rats (406 ± 14 mg, 560 ± 8 mg). However, when expressed as the percentage of the maximal vasoconstriction induced by high K^+ , the vasoconstriction induced by ET-3 is preserved in MCT rats (E_{max} $68\pm 2\%$, EC_{50}

33±9 nmol/l, Fig. 3B) when compared to sham rats (E_{\max} 77±1%, EC_{50} 21±7 nmol/l, Fig 3A). In sham animals, the ET_A antagonist greatly reduced the maximal response to ET-3 (E_{\max} 46±2%, $P<0.001$, EC_{50} 41±29 nmol/l), while the ET_B antagonist shifted the EC_{50} without affecting E_{\max} (E_{\max} 68±2%, EC_{50} 59±16 nmol/l, $P<0.05$). The combination of both antagonists, to achieve dual ET receptor blockade, completely abolished ET-3-induced vasoconstriction ($P<0.001$). In PAH, the effect of ET_A inhibition was increased, with a marked reduction of the maximal response and a shift of the EC_{50} (E_{\max} 23±2%, $P<0.001$, EC_{50} 104±24 nmol/l, $P<0.05$). In arteries isolated from PAH animals, inhibition of ET_B only shifted the EC_{50} without affecting the maximal response (E_{\max} 52±3%, EC_{50} 123±36 nmol/l, $P<0.05$). However, dual ET receptor blockade did not further reduce constriction compared to ET_A inhibition alone (E_{\max} 23±7%, $P<0.001$, EC_{50} 36±21 nmol/l).

4. Discussion

Among the isoforms of ET, ET-1 is generally considered the most important in the pathogenesis of PAH. Although the predominant ET isoform in the lungs is ET-1, there is also evidence of ET-3 expression, while that of ET-2 is non-detectable [7]. Both ET-1 and ET-3 induce constriction of pulmonary resistance arteries from humans and rats preparations [2] and both are able to stimulate lung fibroblasts [18]. These previous data would suggest the ET-3 as well as ET-1 could be implicated in the development of PAH. The interactions of ET-3 with ET receptors and their modification in the MCT model of PAH have never been evaluated. We therefore studied the implication of ET-3 in this model of PAH.

Following MCT treatment, there is a slight non-significant increase in ET-3 plasma levels when compared to controls while pulmonary tissue levels are reduced, suggesting that the increased plasma levels may not originate from the lungs. This is supported by our finding of a reduction in preproET-3 mRNA levels in pulmonary resistance vessels of MCT rats. Miyauchi et al. [16] have demonstrated that following MCT treatment, ET-1 levels are increased in plasma while they are reduced in the lungs. They suggested that the increase in plasma levels may originate from other organ such as the kidney and the heart. We would like to propose likewise, that the increase plasma levels of ET-3 may originate from other organs. This may be associated with a reduced clearance of ET-3 from the plasma, as we demonstrated that pulmonary ET clearance is reduced in this model of PAH [6]. Previous studies have shown that porcine aortic endothelial cells do not produce ET-3 [4]. Our results using confocal imaging are in agreement and demonstrate that ET-3 is mainly

localized in the smooth muscle layer of pulmonary resistance arteries of both control and MCT rats. Therefore, ET-3 is likely produced by a specific endothelin converting enzyme localized in the smooth muscle cells [8] and exerts its effects locally.

Here, we demonstrate that the overall reactivity of pulmonary resistance arteries is reduced in PAH as evidenced by a reduced response to maximal depolarization by a high K^+ solution. As illustrated in Figure 2, with the alpha smooth muscle staining (blue), pulmonary arteries from MCT treated rats undergo an important remodeling process, which leads to a thicker media and therefore could potentially explain the reduced overall reactivity of pulmonary arteries. However, the vasoconstriction induced by ET-3 (when expressed as a percentage of the maximal vasoconstrictive capacity of the artery) is preserved in MCT rats. We also evaluated the contribution of ET_A and ET_B during ET-3-induced constriction of pulmonary vessels. In sham rats, the ET_B antagonist reduced the sensitivity to ET-3 without affecting the maximal response. These results suggest that at low concentration ET-3 preferentially binds to ET_B . The ET_A antagonist however, greatly reduced the maximal response without modifying the sensitivity to ET-3 suggesting that at high concentration ET-3 is able to bind to ET_A . Not surprisingly, the combination of both antagonists completely abolished the ET-3 induced pulmonary vasoconstriction. This is different from ET-1 induced vasoconstriction, which is entirely dependent on interactions between both receptor subtypes since the use of either the selective ET_A antagonist or the ET_B antagonist alone and at similar concentrations, had no significant effect on the ET-1 response [21]. This difference may be the result of a greater affinity of the ET_B receptor for ET-3. In PAH, the ET_A antagonist was able to reduce ET-3-induced contraction that was

comparable to the combination of both antagonists, suggesting a reduction of the ET_B-dependent effect. In agreement, we previously reported that the balance of ET_B to ET_A receptors was altered in MCT rats, with a trend toward a lower percentage of ET_B when compared to control rats [12]. Thus, the increased inhibitory effect of the ET_A antagonist in PAH could partially be ascribed to the reduced expression of ET_B, revealing a predominant role of ET_A in ET-3-induced pulmonary vasoconstriction. Others such as McCulloch et al. have previously evaluated ET-3-induced pulmonary vasoconstriction in PAH rats induced by chronic hypoxia [13]. Similarly, they found no modification of the ET-3 induced vasoconstriction of pulmonary arteries following chronic hypoxia. Moreover, Shi et al. have also evaluated ET-3-induced pulmonary vasoconstriction in the post-obstructive pulmonary vasculopathy model using explanted lung tissues [22]. Although the methodological approach was substantially different, they found an increase ET-3-induced pulmonary vasoconstriction in their model that was associated with a probable reduction in ET_B receptor-mediated effects.

Although it is well accepted that activation of the endothelin system contributes to the pathophysiology of PAH, the possible role of ET-3 in this pathologic process is currently unknown. Increased plasma levels of ET-1 are detected in patients with various forms of PAH [14] and in various experimental models [12,16] and, based on the effectiveness of ET receptor antagonists it is generally accepted that ET-1 contributes to the disease process. However, few studies have evaluated ET-3 levels in human PH. In patients with valvular heart disease and PH, ET-3 levels, like in the current study, were not elevated [5]. In a recent study, Montani et al. measured plasma ET-3 levels in 33 PAH

subjects in comparison to 9 controls. They found that plasma ET-3 levels were significantly reduced and interestingly, that increased ET-1/ET-3 ratio seemed to be a prognostic factor in human PAH [17]. The current pre-clinical study further demonstrates the complex interplay between endothelin isoforms and their receptors in normal and disease states. The exact role of ET-3 and its modifications in various forms of PH will require further experimentation.

5. Conclusion

This study demonstrates a potential implication of another member of the ET family in PAH. In physiological conditions, we have demonstrated that at low concentration ET-3 preferentially binds to ET_B, although at high concentration it can also bind ET_A. Combination of both ET_A and ET_B antagonists is necessary to completely abolish ET-3-induced pulmonary vasoconstriction. Following MCT treatment and the development of PAH, the use of the ET_A antagonist by itself is sufficient to reduce the ET-3-dependent response as efficiently as the combination of both antagonists. Our results demonstrate that although ET-3 is a potent pulmonary vasoconstrictor in PAH, its potential pathophysiologic contribution remains uncertain.

6. Limitation of this study

As usual, the salient findings of this pre-clinical study cannot be readily extrapolated to human PAH, as this animal model may not reproduce the pathologic modifications of pulmonary vessels found in the various forms of human PAH.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Dr. Jocelyn Dupuis is a National Researcher. Stéphanie Sauvageau is supported by a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

References

- [1] Aoki H, Motohashi T, Yoshimura N, Yamazaki H, Yamane T, Panthier JJ, Kunisada T. Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development. *Dev Dyn* 2005;233:407-17.
- [2] Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990;348:730-2.
- [3] Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994;79:1277-85.
- [4] Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Biol Chem* 1989;264:18156-61.
- [5] Chang H, Wu GJ, Wang SM, Hung CR. Plasma endothelin levels and surgically correctable pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 1993;55:450-8.
- [6] Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ET(B)Receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Ther* 2000;13:135-40.
- [7] Firth JD, Ratcliffe PJ. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* 1992;90:1023-31.
- [8] Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa, S, et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 1998;428:304-8.

- [9] Hoeper M, Dupuis J. Endothelin Receptor Antagonists in Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J* 2008;31:407-15.
- [10] Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994;79:1267-76.
- [11] Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct iso-peptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2863-7.
- [12] Jasmin JF, Cernacek P, Dupuis J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:647-53.
- [13] McCulloch KM, MacLean MR. EndothelinB receptor-mediated contraction of human and rat pulmonary resistance arteries and the effect of pulmonary hypertension on endothelin responses in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 3:S169-76.
- [14] Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:542-54.
- [15] Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N, Dupuis J. Chronically elevated endothelin levels reduce pulmonary vascular reactivity to nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:506-13.
- [16] Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993;73:887-97.

- [17] Montani D, Souza R, Binkert C, Fischli W, Simonneau G, Clozel M, et al. Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2007;131:101-8.
- [18] Peacock AJ, Dawes KE, Shock 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
- [19] Prie S, Stewart DJ, Dupuis J. EndothelinA receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 1998;97:2169-74.
- [20] Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348:732-5.
- [21] Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J. Endothelin-1-Induced Pulmonary Vasoreactivity Is Regulated by ET(A) and ET(B) Receptor Interactions. *J Vasc Res* 2007;44:375-81.
- [22] Shi W, Cernacek P, Hu F, Michel RP. Endothelin reactivity and receptor profile of pulmonary vessels in postobstructive pulmonary vasculopathy. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 2):H2558-64.
- [23] Suzuki N, Matsumoto H, Miyauchi T, Goto K, Masaki T, Tsuda M, Fujino M. Endothelin-3 concentrations in human plasma: the increased concentrations in patients undergoing haemodialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;169:809-15.
- [24] Tsai YT, Lin HC, Yang MC, Lee FY, Hou MC, Chen LS, Lee SD. Plasma endothelin levels in patients with cirrhosis and their relationships to the severity of cirrhosis and renal function. *J Hepatol* 1995;23:681-8.

- [25] Wolf SC, Smolczyk H, Brehm BR, Erley CM, Risler T. Endothelin-1 and endothelin-3 levels in different types of glomerulonephritis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1:S482-5.

Figure legends

Figure 1. ET-3 levels. A. Arterial plasma ET-3 levels in sham (n=19) and MCT rats (n=20). B. Pulmonary ET-3 levels in sham (n=19) and MCT rats (n=20) C. PreproET-3 gene expression in pulmonary resistance arteries normalized with cyclophilin A. Values are expressed as relative quantity (dRn). # $P < 0.05$.

Figure 2. Immunofluorescence. Confocal imaging representing the distribution of ET-3 in transverse 8 $\mu\text{mol/l}$ -thick sections of small pulmonary arteries of both sham (A) and MCT rats (B). The images represent examples of composite Z-stacks that were deconvolved and projected with the LSM 510 software. The first row of figures (from left to right) displays the fluorescence of ET-3 (in red) and both the IEL and EEL (in green) which enables easy demarcation of the endothelium from the media. The second row displays the fluorescence of smooth muscle actin (in blue), which is limited to the media. The third row represents the co-localization of ET-3 and smooth muscle actin. The bar/scale represents 20 μm .

Figure 3. Vasoreactivity studies. Endothelin-3 induced pulmonary vasoconstriction in both sham (A) and MCT treated rats (B) in the presence of an ET_A antagonist (open circles, 10 nmol/l) an ET_B antagonist (open triangle, 1 $\mu\text{mol/l}$) and the combination of both (filled diamond). n=6-8/group. Values are mean \pm SEM.

ET-3 induced vasoconstrictions are expressed as a percentage of the maximal response.* $P < 0.001$.

Figure 1

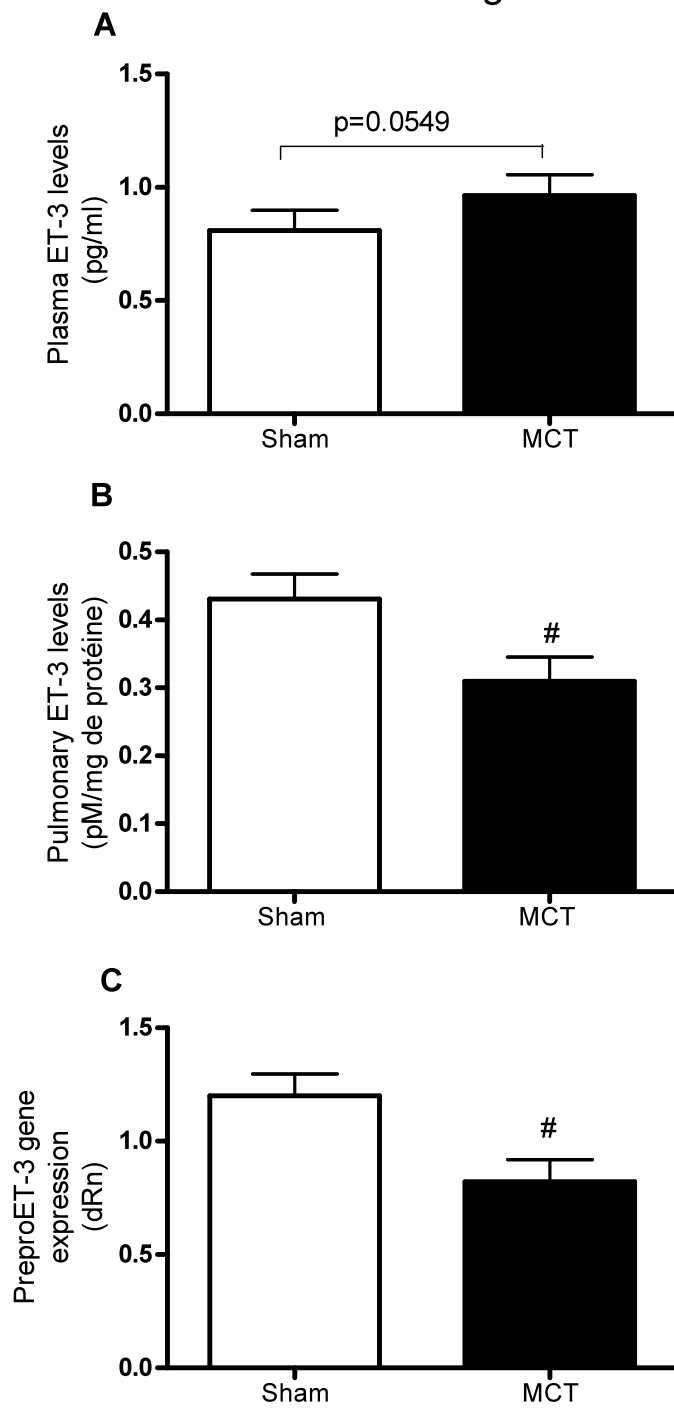


Figure 2

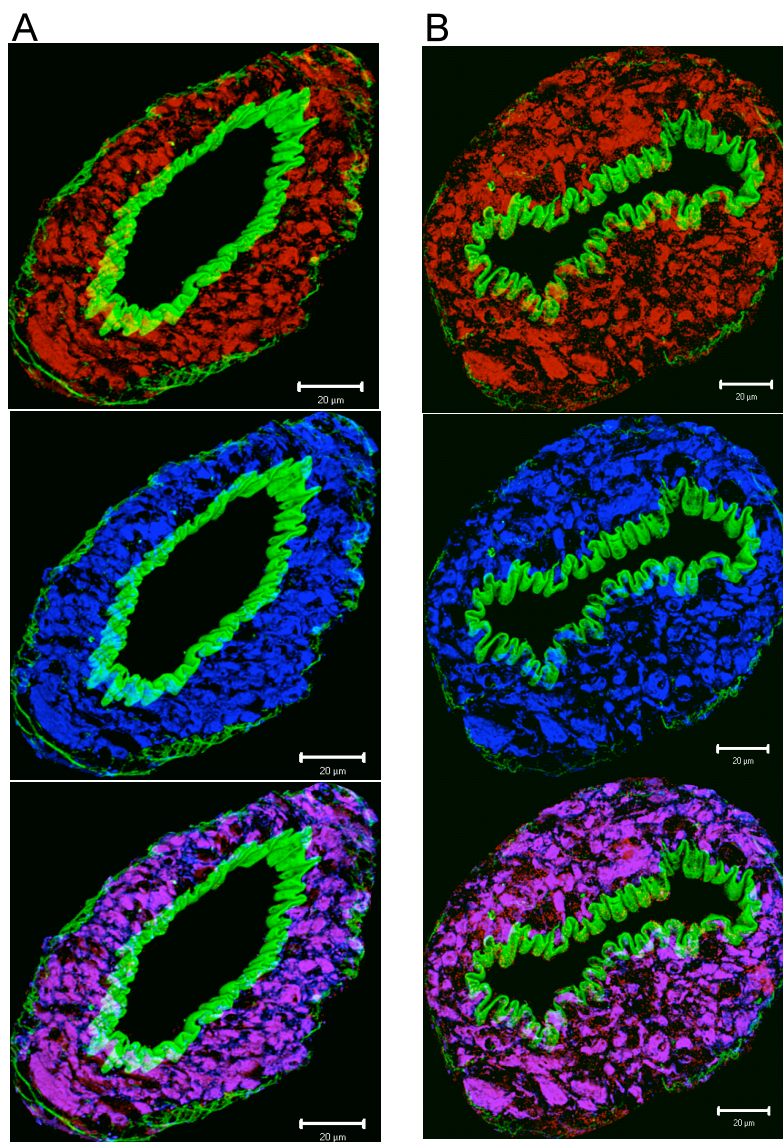
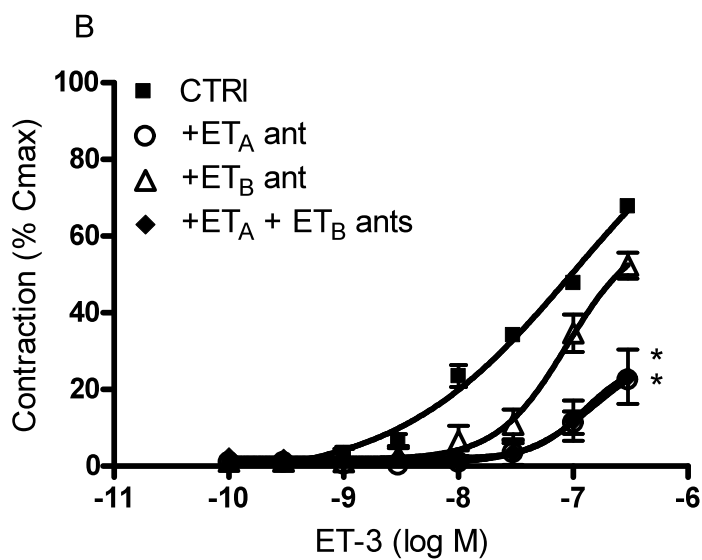
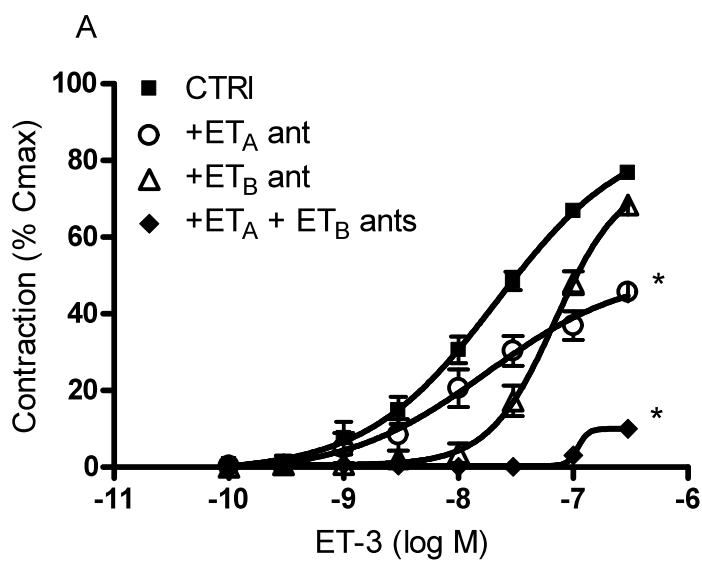


Figure 3



5 Discussion

Plusieurs données expérimentales et cliniques ont confirmé l'activation et la contribution persistante de l'ET-1 dans le développement et le maintien de l'HTAP. L'utilisation d'antagonistes sélectif ET_A ou double ET_A/ET_B dans le traitement de cette pathologie demeure toujours un important sujet de débat. Néanmoins, des antagonistes sélectifs ET_A (sitaxsentan et ambrisentan) et double ET_A/ET_B (bosentan) sont dorénavant approuvés pour le traitement de cette maladie offrant désormais plusieurs alternatives thérapeutiques aux cliniciens. Nous croyons qu'une meilleure compréhension des rôles joués par les récepteurs ET_A et ET_B au niveau des artères de résistance pulmonaires ainsi que des modifications locales de la pharmacologie du système ET induites par l'HTAP pourrait permettre d'optimiser les approches thérapeutiques de cette pathologie. Les trois études présentées dans cette thèse de doctorat ont été élaborées et réalisées dans le but de tenter de répondre au grand débat concernant l'utilisation des antagonistes des récepteurs à l'ET.

5.1 Antagoniste sélectif ET_A ou double ET_A/ET_B?

Plusieurs études précliniques ont démontré l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les récepteurs ET_A et ET_B nécessitant l'utilisation d'un antagoniste double ou d'une combinaison d'antagonistes sélectifs ET_A et ET_B afin de réduire la contraction induite par l'ET-1. Clozel *et al* ont montré que l'inhibition sélective du récepteur ET_A avec le BQ-123 était insuffisante pour supprimer la constriction de la trachée induite par l'ET-1 car le récepteur ET_B était alors en mesure de prendre la relève (Clozel *et al.*, 1995). Des résultats similaires ont été obtenus au niveau des bronches humaines (Fukuroda *et al.*, 1996; Hay *et al.*, 1998) et de moutons (Henry *et al.*, 1999). Dans une récente publication, nous avons également démontré l'existence d'une interaction entre les récepteurs ET_A et ET_B nécessitant le blocage simultané des deux récepteurs afin de réduire la vasoconstriction d'artères de résistance pulmonaires de rats induite par l'ET-1

(Sauvageau et al., 2007). Deux explications de ces résultats nous semblent envisageables, l'existence d'une régulation croisée (*cross-talk*) entre la signalisation intracellulaire activés par les deux sous-types de récepteur ou la dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B (Figure 21).

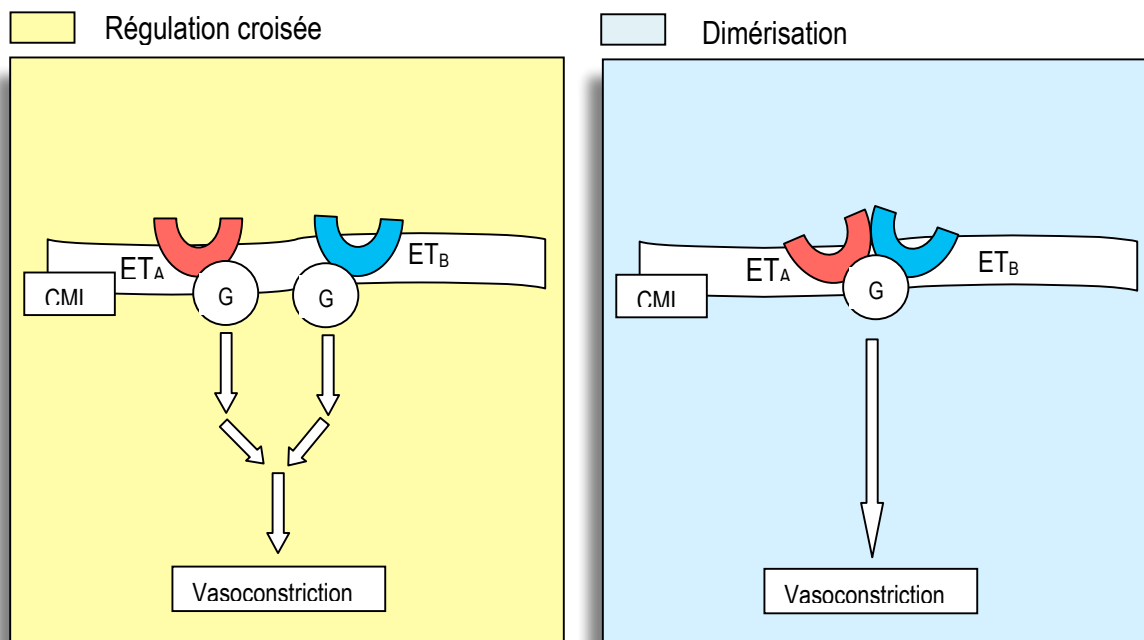


Figure 21. Schématisation des concepts de régulation croisée et de dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B

5.1.1 Est-ce que les hétérodimères ET_A/ET_B existent?

Bien que les récepteurs ET_A et ET_B partagent 59% d'homologie, les deux types de récepteur diffèrent au niveau de leur couplage aux protéines G, de leur mode d'internalisation et de leur transit intracellulaire. Ainsi, le récepteur ET_A peut stimuler les protéines G des familles $G_{q/11}$ et $G_{12/13}$ alors que le récepteur ET_B active principalement les protéines G des familles G_i et $G_{q/11}$ (Cramer et al., 2001; Eguchi et al., 1993). La possibilité

de couplage entre le récepteur ET_B et la protéine $G_{12/13}$ demeure toujours un sujet de controverse et pourrait en fait dépendre du niveau d'expression des récepteurs et du type de cellules étudié. L'existence d'une régulation croisée entre la signalisation intracellulaire activée par les récepteurs ET_A et ET_B a été suggérée dans le passé par différents investigateurs (Fukuroda et al., 1994c; Fukuroda et al., 1996; Mickley et al., 1997). Pourtant, aucune étude n'a à ce jour tenté de mieux caractériser les mécanismes intracellulaires activés par ces deux types de récepteur. Ainsi, afin d'évaluer la possibilité d'une régulation croisée entre la signalisation intracellulaire activée par les récepteurs ET_A et ET_B , il serait intéressant de comparer les intermédiaires intracellulaires activés par les récepteurs ET_A et ET_B lorsque ceux-ci sont exprimés seuls dans des cellules musculaires lisses aux intermédiaires intracellulaires activés lorsque les deux types de récepteur sont co-exprimés. De cette façon il serait possible de vérifier s'il existe une convergence entre les modes de signalisation intracellulaire activés par les deux types de récepteur. Toutefois, s'il existait une régulation croisée entre la signalisation intracellulaire activée par les deux types de récepteur alors l'utilisation d'antisens spécifiques contre l'un ou l'autre des deux récepteurs n'aurait pas entraîné de modifications de la vasoconstrictrice pulmonaire à l'ET-1. En effet, le récepteur non-ciblé par l'antisens aurait été en mesure d'activer à lui seul la voie de signalisation intracellulaire et ainsi induire la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1. Pourtant, nous avons démontré dans la deuxième étude que l'utilisation de l'antisens dirigé contre le récepteur ET_A a induit une augmentation de la vasoconstriction pulmonaire à l'ET-1 alors que l'utilisation de l'antisens dirigé contre le récepteur ET_B a plutôt favorisé une réduction de cette réponse. Les résultats de cette étude suggèrent qu'il est peu probable que la nécessité de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin de réduire la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 soit la conséquence d'une régulation croisée entre la signalisation intracellulaire activée par les deux sous-types de récepteurs.

La dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B pourrait expliquer la nécessité de bloquer simultanément les deux récepteurs afin de réduire les effets induits par l'ET-1. En effet, le blocage sélectif d'un seul des deux récepteurs de l'hétérodimère pourrait toujours induire la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 puisque le récepteur qui n'est pas ciblé par l'antagoniste

pourrait activer la signalisation intracellulaire (figure 21). La première démonstration de l'existence de dimères fonctionnels ET_A/ET_B provient d'une étude réalisée au niveau de l'hypophyse antérieure de rats. Dans cette étude, Harada et ses collaborateurs ont proposé que l'ET-1 entraînait la formation d'un hétérodimère ET_A/ET_B en se liant à la portion N-terminale du récepteur ET_A et à la portion C-terminale du récepteur ET_B (Harada et al., 2002). Quelques années plus tard, le groupe de recherche de Gregan a démontré, à l'aide d'études de co-immunoprécipitation et de FRET, que les récepteurs ET_A et ET_B formaient des dimères dans les cellules HEK293 (Gregan et al., 2004). Plus récemment, Walker et ses collaborateurs ont confirmé que les récepteurs ET_A et ET_B pouvaient former des dimères dans les cellules HEK293 en plus de démontrer que l'hétérodimérisation de ces deux récepteurs induisait une augmentation soutenue des concentrations de Ca²⁺ intracellulaire qui ne pouvait être inhibée que par l'utilisation d'une combinaison d'antagonistes sélectifs ET_A et ET_B (Evans et al., 2008a). Cependant, il est important de mentionner que les différentes techniques utilisées par ces divers groupes de recherche présentent quelques limitations. En effet, ces études ont été réalisées à l'aide de cellules n'exprimant pas les deux types de récepteur de façon endogène. La co-expression artificielle de récepteurs qui ne sont pas co-exprimés *in vivo* pourrait mener à des conclusions erronées. De plus, les niveaux élevés d'expression de la plupart de ces systèmes peuvent entraîner la formation d'interactions artéfactuelles. D'autre part, puisque pour les études de FRET le transfert d'énergie se réalise sur une courte distance, les signaux générés par cette technique ne permettent pas d'affirmer avec certitude que les deux protéines interagissent physiquement et forment des dimères. Puisque la majorité des études qui ont évalué la dimérisation des récepteurs ET ont été réalisées à l'aide de systèmes d'expression hétérologue ceci soulève la question fondamentale à savoir si les dimères existent *in vivo*.

À ce jour, aucune étude n'avait encore évalué la possibilité de la présence de dimères ET_A/ET_B au niveau de la circulation pulmonaire. Pourtant cette dimérisation pourrait avoir d'importantes répercussions pharmacologiques. Les résultats des études de co-immunoprécipitation présentés dans notre deuxième étude suggèrent que les récepteurs ET_A et ET_B peuvent former des dimères au niveau des artères de résistance pulmonaires.

Bien que nous ne répondions pas directement à la question à savoir si les dimères existent *in vivo*, nous avons du moins démontré que ceux-ci existaient *ex vivo* dans un tissu qui exprime les deux types de récepteur de façon endogène. Ainsi, la présence d'hétérodimères ET_A/ET_B au niveau des artères de résistance pulmonaires nécessite le blocage des deux types de récepteurs afin d'inhiber les effets délétères induits par l'ET-1.

Bien que les diverses approches méthodologiques utilisées à ce jour pour évaluer la dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B soient discutables, les données expérimentales suggèrent fortement l'existence de dimères ET_A/ET_B . Toutefois, il n'existe encore aucune technique biochimique (co-immunoprécipitation) ou biophysique (BRET et FRET) qui puisse permettre d'affirmer avec certitude que les deux protéines interagissent physiquement pour former des dimères. Ainsi, il est indispensable de développer une technique extrêmement sensible afin d'observer les interactions protéine-protéine *in vivo* en plus d'évaluer les effets de divers agonistes et antagonistes sur l'état oligomérique des dimères.

5.1.1.1 Concept de dimérisation et utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'ET

La dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B pourrait affecter la réponse des artères de résistance pulmonaires aux antagonistes des récepteurs à l'ET. Nous avons donc réévalué dans notre première étude les modifications locales de la pharmacologie du système ET au niveau des artères de résistance pulmonaires et évalué l'efficacité d'antagonistes sélectifs et double dans la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1.

Un résultat surprenant de cette étude est que l'utilisation de l'antagoniste double bosentan n'a eu aucun effet sur la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-1 en condition contrôle alors que son utilisation, en condition d'HTAP, a complètement bloqué cette réponse. Il est difficile de concevoir que l'utilisation d'un antagoniste double bloquant simultanément les deux récepteurs responsables de la réponse

vasoconstrictrice à l'ET-1 n'ait eu aucun effet en condition contrôle. Des résultats similaires ont toutefois été observés dans le passé. En effet, Angus et ses collaborateurs ont démontré que bien que l'utilisation du bosentan induisait une réduction de la vasoconstriction des artères de résistance mésentériques et de l'artère de la queue du rat, elle ne pouvait bloquer la vasoconstriction des artères pulmonaires (Angus et al., 2002). De plus, McCulloch *et al* ont proposé que l'utilisation du bosentan entraînait une potentialisation de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 chez des rats contrôles (McCulloch et al., 1998). En condition d'HTAP, nous avons toutefois démontré que l'utilisation du bosentan inhibait complètement la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-1. Deux hypothèses nous semblent possibles, une modification du profil d'expression des récepteurs ET_A et ET_B et/ou une modification de l'état dimérique des récepteurs ET en condition d'HTAP. En effet, nous avons observé une réduction de moitié des expressions génique et protéique du récepteur ET_B en condition d'HTAP. Ainsi, puisque le bosentan bloque 40 fois plus de récepteurs ET_A que de récepteurs ET_B et qu'en condition d'HTAP les récepteurs ET_A sont majoritairement responsables de la contraction induite par l'ET-1, le bosentan est en mesure de réduire la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'en condition d'HTAP, l'antagoniste sélectif ET_A est en mesure de réduire la vasoconstriction pulmonaire à l'ET-1 alors qu'en condition contrôle il est inefficace.

La deuxième hypothèse pouvant expliquer l'inefficacité du bosentan en condition contrôle et l'efficacité de ce dernier en condition d'HTAP est la dimérisation des récepteurs ET_A et ET_B. En effet, il est possible qu'en condition contrôle, l'hétérodimérisation des récepteurs ET_A et ET_B masque le site de liaison du bosentan (Figure 22). Le fait que l'utilisation d'une combinaison d'antagonistes sélectif ET_A et ET_B ait été en mesure de réduire la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-1 semble concorder avec cette hypothèse (Sauvageau et al., 2007). Les antagonistes sélectifs ET_A et ET_B sont sans doute en mesure de se lier à leurs sites de liaison respectifs même lorsqu'il y a dimérisation des récepteurs ET_A/ET_B alors que le bosentan lui en est incapable. En condition d'HTAP il existe sans doute une dissociation ou une réorientation spatiale du

dimère ET_A/ET_B , pouvant être possiblement lié à la réduction de l'expression protéique du récepteur ET_B , permettant ainsi au bosentan de se lier à son site de liaison et de réduire la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 (Figure 22). Dans cette première étude nous avons aussi évalué les effets du bosentan dans la circulation cérébrale de rats contrôles. Nous avons démontré que le bosentan était en mesure d'inhiber complètement la vasoconstriction de l'artère basilaire induite par l'ET-1. À l'aide d'études d'immunofluorescence en microscopie confocale, nous avons démontré dans notre première étude que l'artère basilaire présentait peu de récepteurs ET_B . Ainsi, l'efficacité du bosentan à réduire la contraction basilaire induite par l'ET-1 pourrait être expliquée soit par le fait que la circulation cérébrale présente peu de récepteurs ET_B en condition contrôle ou par le fait que cette circulation possède peu ou pas d'hétérodimères ET_A/ET_B . Néanmoins, ces résultats suggèrent que la circulation pulmonaire présente une pharmacologie unique.

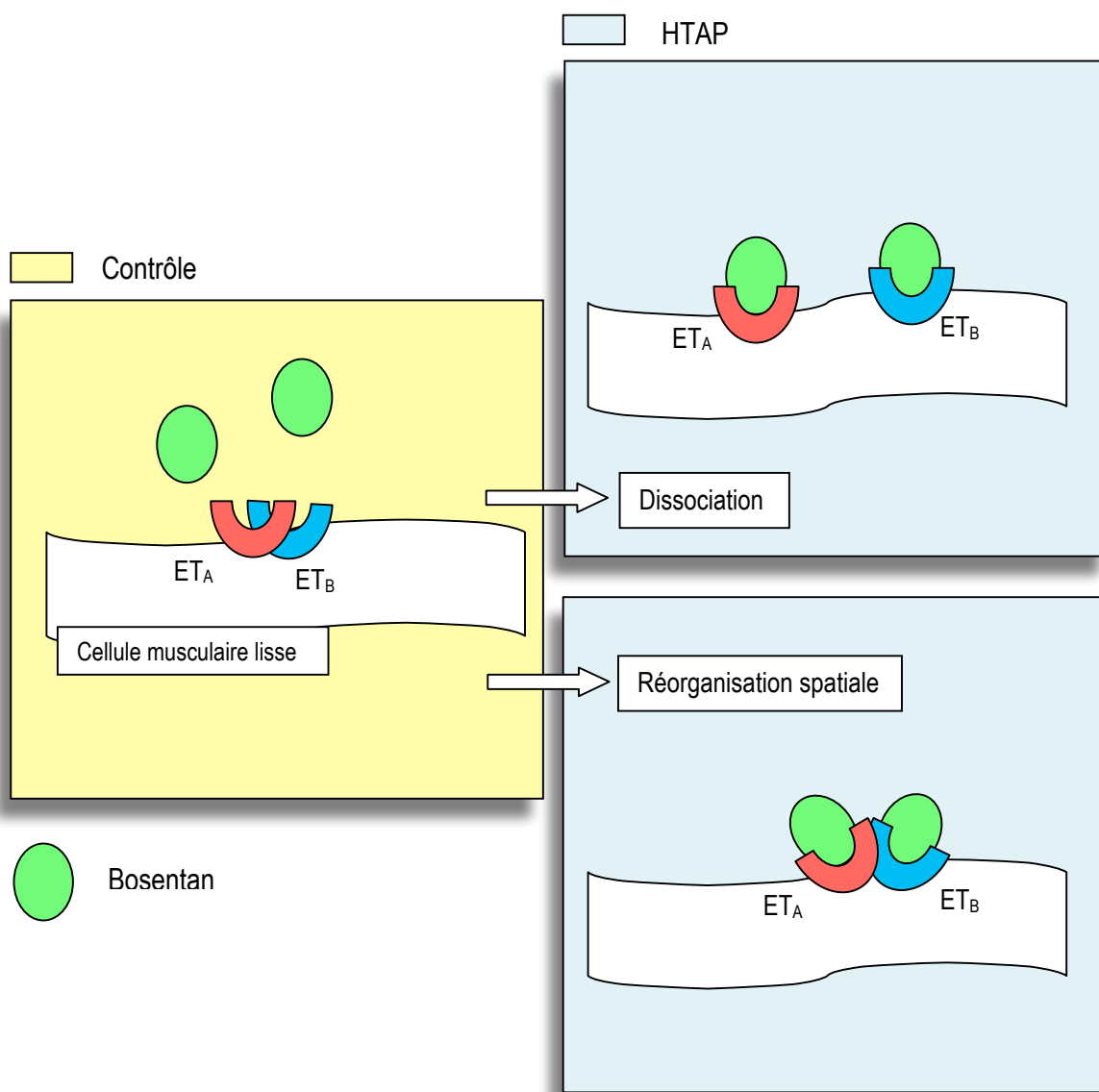


Figure 22. Schématisation de l'hypothèse expliquant l'inefficacité du bosentan en condition contrôle et son efficacité en condition d'HTAP

5.1.2 Rôle prédominant du récepteur ET_B dans la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1

Plusieurs données expérimentales ont démontré l'implication du récepteur ET_A dans la vasoconstriction et la prolifération cellulaire induites par l'ET-1. Par contre, le récepteur ET_B a longtemps été considéré comme un récepteur entraînant une vasodilatation du muscle lisse par la relâche endothéliale de NO et de PGI₂. Pourtant, depuis un certain temps déjà, ce rôle vasodilatateur a été remis en question par plusieurs études qui suggèrent son implication dans les effets délétères induits par l'ET-1. Ainsi, nous avons récemment évalué, à l'aide d'antagonistes sélectifs, le rôle joué par les récepteurs ET_A et ET_B dans la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires de rats contrôles induite par l'ET-1 (Sauvageau et al., 2007). Nous avons démontré qu'il est nécessaire de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin de réduire la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1. Toutefois, une des limitations majeures de l'utilisation d'antagonistes sélectifs est le fait que leur sélectivité est dépendante de la concentration utilisée. Ainsi dans la deuxième étude nous avons réévalué, à l'aide d'un traitement antisens, le rôle joué par chacun des récepteurs dans la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-1.

Dans cette étude nous avons démontré que les récepteurs ET_A et ET_B sont tous deux nécessaires pour induire la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1. En effet, nous avons démontré que l'utilisation d'un antisens dirigé contre le récepteur ET_B entraîne une perte de sensibilité vasculaire à l'ET-1 mais que le récepteur ET_A est néanmoins toujours en mesure d'induire une vasoconstriction maximale à l'ET-1. Ces résultats suggèrent qu'il existe une coopération entre les deux récepteurs dans l'induction de la vasoconstriction pulmonaire à l'ET-1, un phénomène qui est couramment observé lorsqu'il y a hétérodimérisation des RCPG (Jordan et al., 2000). De plus, nos résultats suggèrent que le récepteur ET_A limite la vasoconstriction pulmonaire induite par la stimulation du récepteur ET_B puisque nous avons démontré que l'utilisation d'un antisens dirigé contre le récepteur ET_A augmente la sensibilité vasculaire et la réponse vasoconstrictrice maximale à l'ET-1. Des résultats

similaires ont été observés dans le passé par le groupe de McCulloch qui avait alors aussi suggéré l'existence d'un récepteur ET_A inhibiteur au niveau des artères de résistance pulmonaires qui inhiberait la stimulation du récepteur ET_B par l'ET-1 (McCulloch et al., 1995). De plus, une étude réalisée par le groupe de D'Orléans-Juste a démontré que l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A , le BQ-123, entraînait une réduction de la relâche de PGI_2 induite par l'ET-1 au niveau du poumon isolé de rat (D'Orléans-Juste et al., 1992). Ces résultats suggèrent que le récepteur ET_A serait en mesure d'induire la relâche de prostanoïdes et donc que sa répression élimine cette portion vasodilatatrice et favorise ainsi une potentialisation de la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1. Puisque le récepteur ET_A exerce un effet inhibiteur sur le récepteur ET_B et que ce dernier, en absence de l'influence inhibitrice du récepteur ET_A , induit une augmentation de la vasoconstriction maximale et de la sensibilité vasculaire à l'ET-1, nous croyons qu'il est essentiel de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin de réduire la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1. Cette étude démontre l'importance fonctionnelle du récepteur ET_B et le rôle prédominant de ce dernier dans la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-1.

Il est donc évident que les effets observés avec l'utilisation d'antisens spécifiques sont très différents de ceux obtenus avec l'utilisation d'antagonistes sélectifs ET_A et ET_B . Ces résultats divergents pourraient selon nous s'expliquer par la modulation du nombre de dimères présents sur la cellule musculaire lisse. Nous croyons que l'utilisation d'antagonistes sélectifs n'entraîne pas de modification du nombre d'hétérodimères ET_A/ET_B présents sur la cellule musculaire lisse pulmonaire. Ainsi, la dimérisation des récepteurs à l'ET ferait en sorte que le blocage d'un seul des deux récepteurs pourrait permettre à l'ET-1 d'induire ses effets par le biais de l'autre récepteur non-ciblé par l'antagoniste (figure 21). Cette hypothèse pourrait expliquer la nécessité de bloquer simultanément les deux récepteurs afin de réduire la contraction induite par l'ET-1. En revanche, l'utilisation d'antisens spécifiques entraîne une réduction de l'expression protéique de l'un ou l'autre des récepteurs et ainsi favorise une diminution du nombre d'hétérodimères ET_A/ET_B présents sur les cellules musculaires lisses pulmonaires. En

absence du récepteur ET_B , il existerait beaucoup plus de monomères du récepteur ET_A que de dimères ET_A/ET_B et vice versa (figure 23). Ainsi, la réduction du nombre d'hétérodimères ET_A/ET_B expliquerait la capacité de chacun des antisens à réguler la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1.

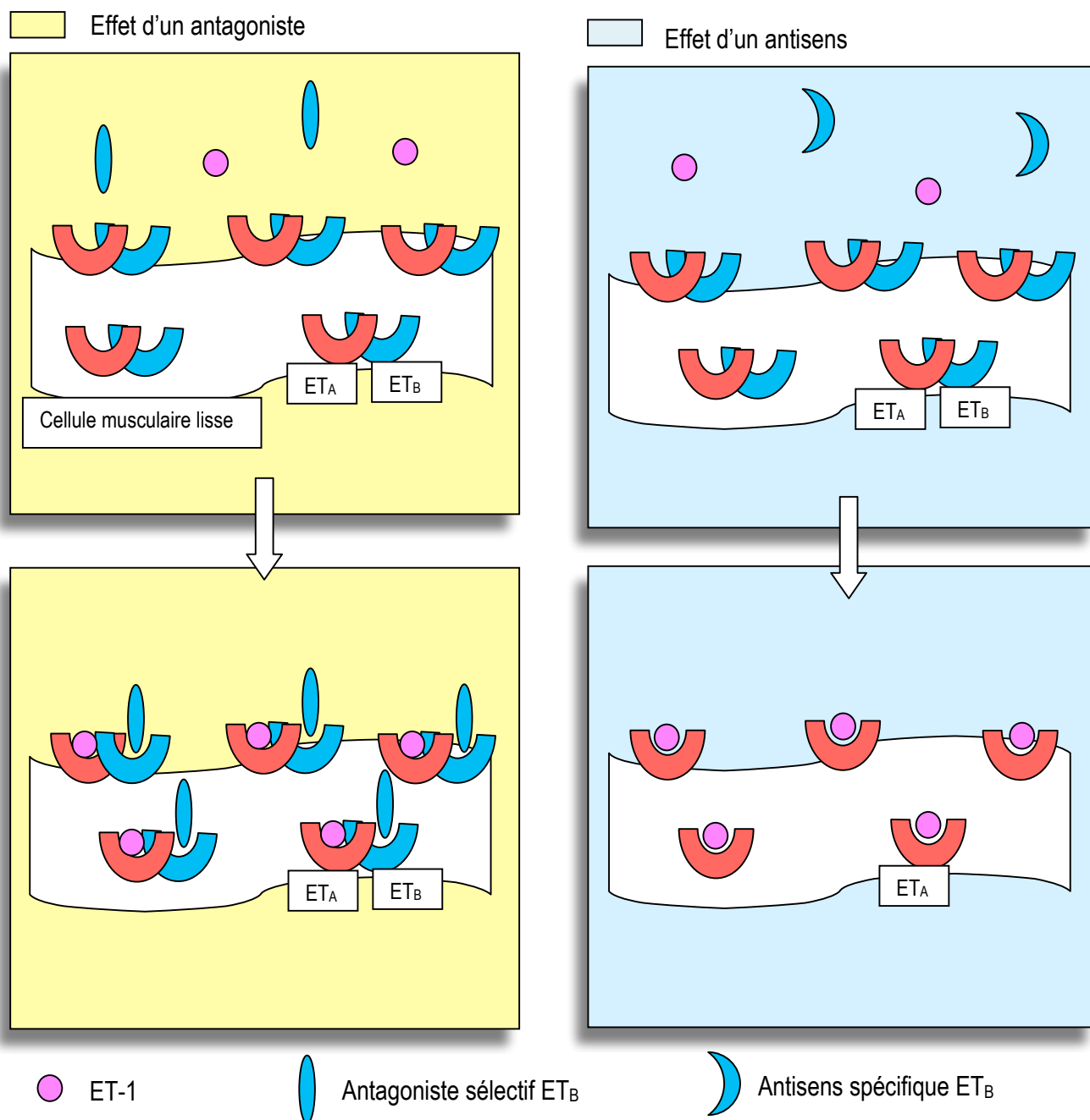


Figure 23 Schématisation de la modulation de l'état dimérique des récepteurs ET_A et ET_B en présence d'un antagoniste ou d'un antisens

5.1.3 Endothéline-3 et hypertension artérielle pulmonaire

La famille ET est composée de trois membres cependant, la majorité des études réalisées à ce jour ont porté leur attention sur l'évaluation des effets physiologiques et pathophysiologiques de l'ET-1. Pourtant, plusieurs études ont démontré que l'ET-3 était impliquée dans le développement de certaines pathologies telles que la cirrhose du foie (Tsai et al., 1995) et l'insuffisance rénale (Wolf et al., 1998). Ainsi dans la troisième étude, nous avons voulu évaluer les effets de l'ET-3 sur la circulation pulmonaire en condition contrôle et en condition d'HTAP induite par l'administration de MCT.

La majorité des études réalisées dans le passé ont suggéré que l'ET-3 était un agoniste spécifique du récepteur ET_B tout comme la sarafotoxine 6c. Les résultats de notre étude démontrent que l'ET-3 se lie effectivement de façon préférentielle au récepteur ET_B mais qu'à de fortes concentrations, l'ET-3 peut aussi entraîner l'activation du récepteur ET_A . Il est important de noter que les résultats obtenus avec l'ET-3 diffèrent de ceux obtenus avec l'ET-1. En effet, nous avons démontré qu'en condition contrôle, l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A ou d'un antagoniste sélectif ET_B n'avait aucun effet sur la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1. Ces résultats suggèrent que la réponse induite par l'ET-1 est entièrement dépendante d'interactions entre les deux sous-types de récepteur. Deux hypothèses nous semblent possibles, une plus grande affinité de l'ET-3 pour le récepteur ET_B et/ou une modification de l'état dimérique des récepteurs ET suite à la liaison de l'ET-3. Puisque l'ET-3 possède une plus grande affinité pour le récepteur ET_B , cette dernière se lie de façon préférentielle à ce récepteur expliquant ainsi pourquoi l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_B est en mesure de réduire la sensibilité vasculaire à l'ET-3. Toutefois, puisqu'à forte concentration l'ET-3 peut aussi se lier au récepteur ET_A , l'utilisation d'un antagoniste sélectif ET_A est en mesure de réduire la vasoconstriction pulmonaire maximale induite par l'ET-3. La deuxième hypothèse expliquant possiblement la capacité de chacun des deux antagonistes sélectifs à réduire la réponse vasoconstrictrice à l'ET-3 est la modification de l'état dimérique des récepteurs ET_A/ET_B suite à la liaison de l'ET-3. En effet, certains investigateurs ont proposé que l'incubation avec un agoniste

sélectif ET_B tel la sarafotoxine 6c entraînait la dissociation du dimère ET_A/ET_B exprimé par des cellules HEK293 (Gregan et al., 2004). Ainsi, il est possible que la liaison de l'ET-3 au récepteur ET_B entraînerait la dissociation ou la réorganisation spatiale du dimère ET_A/ET_B nous permettant ainsi d'évaluer les contributions individuelles des récepteurs ET_A et ET_B dans la vasoconstriction pulmonaire à l'ET-3. Néanmoins, cette étude révèle qu'il est nécessaire, en condition contrôle, de bloquer simultanément les récepteurs ET_A et ET_B afin d'inhiber complètement la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-3.

En condition d'HTAP, l'utilisation de l'antagoniste sélectif ET_A s'est avérée aussi efficace que la combinaison des deux antagonistes sélectifs dans la réduction de la réponse vasoconstrictrice à l'ET-3. La réduction de l'expression protéique du récepteur ET_B démontrée dans notre première étude pourrait potentiellement expliquer l'augmentation de l'efficacité de l'antagoniste ET_A en condition d'HTAP. Nous ne sommes pas les premiers à avoir tenté d'évaluer l'implication de l'ET-3 dans le développement et le maintien de l'HTAP. En effet, Shi et ses collaborateurs ont évalué la vasoconstriction induite par l'ET-3 dans un modèle de pathologie vasculaire post-obstructive (Shi et al., 1997). Dans ce modèle, ils ont observé une augmentation de la vasoconstriction ET-3 dépendante et ont proposé que cette augmentation était probablement la conséquence d'une réduction de la contribution du récepteur ET_B . De plus, Montani et ses collaborateurs ont dosé les niveaux plasmatiques d'ET-3 chez 33 patients souffrant d'HTAP de diverses étiologies (Montani et al., 2007). Dans cette étude, ils ont observé une augmentation du ratio ET-1/ET-3 et ont proposé que ce ratio serait un meilleur indicateur de pronostic que la mesure seule des niveaux d'ET-1 chez les patients souffrant d'HTAP. Dans notre étude, nous avons aussi observé une augmentation du ratio plasmatique ET-1/ET-3 en condition d'HTAP toutefois, nous n'avons pu démontrer une corrélation positive entre ce ratio et les paramètres hémodynamiques d'HTAP.

Les résultats de ces quelques études soulèvent la question à savoir si l'implication de l'ET-3 dans le développement et le maintien de l'HTAP a toujours été sous-évaluée.

Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a prouvé l'existence, chez les mammifères, d'un récepteur sélectif pour l'ET-3. Pourtant, si tel était le cas il est possible que le blocage double des récepteurs ET_A et ET_B s'avérerait insuffisant dans le traitement de l'HTAP. En effet, si l'ET-3 est impliquée dans la pathophysiologie de l'HTAP il serait alors nécessaire de développer un antagoniste triple des récepteurs à l'ET pour le traitement de cette pathologie.

6 Limites des études

Plusieurs limitations de nos études sont directement reliées au modèle expérimental utilisé. En effet, les résultats précliniques de ces études ne peuvent être extrapolés à l'homme puisque les modèles animaux d'HTAP ne peuvent reproduire les modifications pathologiques observées dans l'HTAP humaine de diverses étiologies. Dans la première et la troisième étude présentées ici, nous n'avons étudié qu'une seule et unique caractéristique de la pathophysiologie de l'HTAP, la vasoconstriction pulmonaire. Il est toutefois important de noter que la pathophysiologie de l'HTAP est complexe et multifactorielle. En effet, cette dernière est non seulement caractérisée par une vasoconstriction exagérée des cellules musculaires lisses mais aussi par une prolifération cellulaire excessive ainsi qu'un important remodelage vasculaire. De plus, nous avons seulement évalué l'implication du système ET dans l'HTAP alors que le développement de cette pathologie implique plusieurs autres effecteurs vasculaires en plus des ET tels que le TxA_2 et la sérotonine. Néanmoins, le système ET et la vasoconstriction pulmonaire sont tous deux des composantes clés dans le développement et le maintien de l'HTAP. Le modèle monocrotaline est un modèle expérimental fiable et reproductible. En effet, l'HTAP qui se développe chez ces animaux est secondaire à une vasoconstriction pulmonaire exagérée résultant de l'activation du système ET. La résultante physiologique ultime étant l'augmentation des pressions pulmonaires et donc le développement d'une HTAP. Ainsi,

une meilleure compréhension de l'implication du système ET dans la vasoconstriction pulmonaire nous permettra d'optimiser les approches thérapeutiques de l'HTAP.

Dans la discussion de la première étude, nous avons proposé que la dissociation ou la réorientation spatiale du dimère ET_A/ET_B pourrait expliquer l'efficacité du bosentan dans la réduction de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 en condition d'HTAP. Il nous a toutefois été impossible dans cette étude de confirmer cette hypothèse puisque la technique de co-immunoprécipitation n'est pas suffisamment sensible pour détecter et comparer les variations du nombre de dimères présents sur les artères de résistance pulmonaires en conditions contrôle et d'HTAP. Afin d'expliquer les résultats divergents obtenus avec l'utilisation d'antagonistes sélectifs et l'utilisation d'antisens spécifiques, nous avons suggéré que l'utilisation d'antagonistes sélectifs n'entraînait pas de modification du nombre de dimères présents sur les artères de résistance pulmonaires alors que l'utilisation d'antisens spécifiques favorisait une réduction du nombre de dimères. Toutefois, le manque de sensibilité des techniques de co-immunoprécipitation limite ici aussi la détection des variations du nombre de dimères.

7 Perspectives futures

La dimérisation des RCPG pourrait avoir d'importantes répercussions au niveau de la diversité pharmacologique. Ceci pourrait entraîner le développement de nouvelles drogues pouvant cibler spécifiquement les hétérodimères sans toutefois affecter les promoteurs individuels. Il serait fort intéressant de développer un antagoniste des récepteurs à l'ET qui ciblerait spécifiquement les hétérodimères ET_A/ET_B présents sur la cellule musculaire lisse pour le traitement de l'HTAP. De cette façon, le débat concernant l'utilisation des antagonistes des récepteurs à l'ET n'aurait plus sa raison d'être puisque cette nouvelle drogue pourrait bloquer spécifiquement les effets délétères induits par l'activation du récepteur ET_B musculaire lisse tout en laissant le récepteur ET_B endothélial libre d'exercer sa fonction vasodilatatrice et son rôle de clairance de l'ET-1.

8 Conclusion

En nous basant sur les résultats présentés dans cette thèse de doctorat, nous croyons qu'il serait préférable d'utiliser un antagoniste double des récepteurs à l'ET afin de réduire les effets délétères induits par le système ET dans le cadre de l'HTAP. En effet, 1) les récepteurs ET_A et ET_B peuvent former des dimères au niveau des artères de résistance pulmonaires, 2) l'utilisation d'un antagoniste double s'est avérée efficace dans la réduction de la vasoconstriction pulmonaire induite par l'ET-1 en condition d'HTAP, 3) le récepteur ET_B amplifie la vasoconstriction des artères de résistance pulmonaires induite par l'ET-1 et 4) l'ET-3 induit ses effets vasoconstricteurs via l'activation des récepteurs ET_A et ET_B , il semble donc essentiel de bloquer simultanément les deux sous-types de récepteurs afin d'inhiber les effets vasoconstricteurs induits par les ET. Enfin, puisque nous avons sous-estimé l'implication de l'ET-3 dans l'HTAP, il est possible que le débat concernant l'utilisation des antagonistes des récepteurs à l'ET devienne encore plus complexe. En effet, il est possible dans le futur que la controverse concernant l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'ET soit plutôt alimentée par l'utilisation d'un antagoniste double ou triple des récepteurs à l'ET.

9 Bibliographie

Abassi ZA, Tate J E, Golomb E and Keiser H R (1992) Role of Neutral Endopeptidase in the Metabolism of Endothelin. *Hypertension* 20:89-95.

Abenham L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G and Begaud B (1996) Appetite-Suppressant Drugs and the Risk of Primary Pulmonary Hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 335:609-616.

Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood M R, Rajkumar V S, Pantelides P, Xu S W, du Bois R M and Black C M (1997) Increased Levels of Endothelin-1 and Differential Endothelin Type A and B Receptor Expression in Scleroderma-Associated Fibrotic Lung Disease. *Am J Pathol* 151:831-841.

Adner M, Geary G G and Edvinsson L (1998) Appearance of Contractile Endothelin-B Receptors in Rat Mesenteric Arterial Segments Following Organ Culture. *Acta Physiol Scand* 163:121-129.

Agnati LF, Fuxe K, Zoli M, Rondanini C and Ogren S O (1982) New Vistas on Synaptic Plasticity: the Receptor Mosaic Hypothesis of the Engram. *Med Biol* 60:183-190.

Agrawal S, Goodchild J, Civeira M P, Thornton A H, Sarin P S and Zamecnik P C (1988) Oligodeoxynucleoside Phosphoramidates and Phosphorothioates As Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7079-7083.

Akhtar S and Juliano R L (1992) Cellular Uptake and Intracellular Fate of Antisense Oligonucleotides. *Trends Cell Biol* 2:139-144.

Anderson KM, Murahashi T, Dostal D E and Peach M J (1993) Morphological and Biochemical Analysis of Angiotensin II Internalization in Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol* 264:C179-C188.

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M and Bouvier M (2000) Detection of Beta 2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3684-3689.

Anggard E, Galton S, Rae G, Thomas R, McLoughlin L, de N G and Vane J R (1989) The Fate of Radioiodinated Endothelin-1 and Endothelin-3 in the Rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5:S46-S49.

Angus J and Wright C (2002) Endothelin and the Sympathetic Nervous System. *The endothelin system in cardiopulmonary diseases*97-125.

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H and Nakanishi S (1990) Cloning and Expression of a CDNA Encoding an Endothelin Receptor. *Nature* 348:730-732.

Archer SL, Weir E K, Reeve H L and Michelakis E (2000) Molecular Identification of O₂ Sensors and O₂-Sensitive Potassium Channels in the Pulmonary Circulation. *Adv Exp Med Biol* 475:219-240.

Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida M C and Hamaguchi H (1991) Chromosomal Assignments of the Human Endothelin Family Genes: the Endothelin-1 Gene (EDN1) to 6p23-P24, the Endothelin-2 Gene (EDN2) to 1p34, and the Endothelin-3 Gene (EDN3) to 20q13.2-Q13.3. *Am J Hum Genet* 48:990-996.

Babcock GJ, Farzan M and Sodroski J (2003) Ligand-Independent Dimerization of CXCR4, a Principal HIV-1 Coreceptor. *J Biol Chem* 278:3378-3385.

Badr KF, Murray J J, Breyer M D, Takahashi K, Inagami T and Harris R C (1989) Mesangial Cell, Glomerular and Renal Vascular Responses to Endothelin in the Rat Kidney. Elucidation of Signal Transduction Pathways. *J Clin Invest* 83:336-342.

Baillie CT, Kenny S E, Rintala R J, Booth J M and Lloyd D A (1999) Long-Term Outcome and Colonic Motility After the Duhamel Procedure for Hirschsprung's Disease. *J Pediatr Surg* 34:325-329.

Balasubramaniam V, Le Cras T D, Ivy D D, Grover T R, Kinsella J P and Abman S H (2003) Role of Platelet-Derived Growth Factor in Vascular Remodeling During Pulmonary Hypertension in the Ovine Fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L826-L833.

- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye D M, Belhassen L, O'Hara D S, Kelly R A, Smith T W and Michel T (1995) Nitric Oxide-Dependent Parasympathetic Signaling Is Due to Activation of Constitutive Endothelial (Type III) Nitric Oxide Synthase in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem* 270:14582-14586.
- Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons W W, Pimental D, Malinski T A, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein C J, Davidoff A J, Kelly R A and . (1994) Cytokine-Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in Cardiac Myocytes. Characterization and Regulation of iNOS Expression and Detection of iNOS Activity in Single Cardiac Myocytes in Vitro. *J Biol Chem* 269:27580-27588.
- Banting JD, Friberg P and Adams M A (1996) Acute Hypertension After Nitric Oxide Synthase Inhibition Is Mediated Primarily by Increased Endothelin Vasoconstriction. *J Hypertens* 14:975-981.
- Barnes K, Brown C and Turner A J (1998) Endothelin-Converting Enzyme: Ultrastructural Localization and Its Recycling From the Cell Surface. *Hypertension* 31:3-9.
- Barnes PJ (1994) Endothelins and Pulmonary Diseases. *J Appl Physiol* 77:1051-1059.
- Barnett CF and Machado R F (2006) Sildenafil in the Treatment of Pulmonary Hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 2:411-422.
- Barst RJ, Ivy D, Dingemans J, Widlitz A, Schmitt K, Doran A, Bingaman D, Nguyen N, Gaitonde M and van Giersbergen P L (2003) Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Bosentan in Pediatric Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 73:372-382.
- Barst RJ, Langleben D, Badesch D, Frost A, Lawrence E C, Shapiro S, Naeije R and Galie N (2006) Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension With the Selective Endothelin-A Receptor Antagonist Sitaxsentan. *J Am Coll Cardiol* 47:2049-2056.
- Barst RJ, Langleben D, Frost A, Horn E M, Oudiz R, Shapiro S, McLaughlin V, Hill N, Tapsos V F, Robbins I M, Zwicke D, Duncan B, Dixon R A and Frumkin L R (2004) Sitaxsentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 169:441-447.

Barst RJ, Rich S, Widlitz A, Horn E M, McLaughlin V and McFarlin J (2002) Clinical Efficacy of Sitaxsentan, an Endothelin-A Receptor Antagonist, in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: Open-Label Pilot Study. *Chest* 121:1860-1868.

Barst RJ, Rubin L J, Long W A, McGoon M D, Rich S, Badesch D B, Groves B M, Tapson V F, Bourge R C, Brundage B H and . (1996) A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) With Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 334:296-302.

Barton M, d'Uscio L V, Shaw S, Meyer P, Moreau P and Luscher T F (1998) ET(A) Receptor Blockade Prevents Increased Tissue Endothelin-1, Vascular Hypertrophy, and Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension* 31:499-504.

Battistini B, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Briere N and Sirois P (1993) Growth Regulatory Properties of Endothelins. *Peptides* 14:385-399.

Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider S O, Lausberg H and Schafers H J (2002) Selective Upregulation of Endothelin B Receptor Gene Expression in Severe Pulmonary Hypertension. *Circulation* 105:1034-1036.

Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson J A, Emoto N, Hammer R E and Yanagisawa M (1994) Interaction of Endothelin-3 With Endothelin-B Receptor Is Essential for Development of Epidermal Melanocytes and Enteric Neurons. *Cell* 79:1277-1285.

bdAlla S, Lothar H and Quitterer U (2000) AT1-Receptor Heterodimers Show Enhanced G-Protein Activation and Altered Receptor Sequestration. *Nature* 407:94-98.

Belikova AM, Zarytova V F and Grineva N I (1967) Synthesis of Ribonucleosides and Diribonucleoside Phosphates Containing 2-Chloroethylamine and Nitrogen Mustard Residues. *Tetrahedron Lett* 37:3557-3562.

Benza RL, Barst R J, Galie N, Frost A, Girgis R E, Highland K B, Strange C, Black C M, Badesch D B, Rubin L, Fleming T R and Naeije R (2008) Sitaxsentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: A One Year, Prospective, Open Label, Observation of Outcome and Survival. *Chest*.

Berti F, Rossoni G, Della B D, Villa L M, Buschi A, Trento F, Berti M and Tondo C (1993) Nitric Oxide and Prostacyclin Influence Coronary Vasomotor Tone in Perfused Rabbit Heart and Modulate Endothelin-1 Activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 22:321-326.

Bhatia S, Frantz R P, Severson C J, Durst L A and McGoon M D (2003) Immediate and Long-Term Hemodynamic and Clinical Effects of Sildenafil in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Receiving Vasodilator Therapy. *Mayo Clin Proc* 78:1207-1213.

Black HR, Bakris G L, Weber M A, Weiss R, Shahawy M E, Marple R, Tannoury G, Linas S, Wiens B L, Linseman J V, Roden R and Gerber M J (2007) Efficacy and Safety of Darusentan in Patients With Resistant Hypertension: Results From a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Dose-Ranging Study. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9:760-769.

Bloch KD, Eddy R L, Shows T B and Quertermous T (1989a) CDNA Cloning and Chromosomal Assignment of the Gene Encoding Endothelin 3. *J Biol Chem* 264:18156-18161.

Bloch KD, Friedrich S P, Lee M E, Eddy R L, Shows T B and Quertermous T (1989b) Structural Organization and Chromosomal Assignment of the Gene Encoding Endothelin. *J Biol Chem* 264:10851-10857.

Bohlender J, Gerbaulet S, Kramer J, Gross M, Kirchengast M and Dietz R (2000) Synergistic Effects of AT(1) and ET(A) Receptor Blockade in a Transgenic, Angiotensin II-Dependent, Rat Model. *Hypertension* 35:992-997.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino J J, Pagano P J and Cohen R A (1994) Nitric Oxide Directly Activates Calcium-Dependent Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Nature* 368:850-853.

Bonvallet ST, Zamora M R, Hasunuma K, Sato K, Hanasato N, Anderson D, Sato K and Stelzner T J (1994) BQ123, an ETA-Receptor Antagonist, Attenuates Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Physiol* 266:H1327-H1331.

Boulanger C and Luscher T F (1990) Release of Endothelin From the Porcine Aorta. Inhibition by Endothelium-Derived Nitric Oxide. *J Clin Invest* 85:587-590.

Boulanger CM and Luscher T F (1991) Hirudin and Nitrates Inhibit the Thrombin-Induced Release of Endothelin From the Intact Porcine Aorta. *Circ Res* 68:1768-1772.

Branski D, Dennis N R, Neale J M and Brooks L J (1979) Hirschsprung's Disease and Waardenburg's Syndrome. *Pediatrics* 63:803-805.

Brown DA, Kang S H, Gryaznov S M, DeDionisio L, Heidenreich O, Sullivan S, Xu X and Nerenberg M I (1994) Effect of Phosphorothioate Modification of Oligodeoxynucleotides on Specific Protein Binding. *J Biol Chem* 269:26801-26805.

Bulenger S, Marullo S and Bouvier M (2005) Emerging Role of Homo- and Heterodimerization in G-Protein-Coupled Receptor Biosynthesis and Maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26:131-137.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002) EDHF:Bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23 (8): 374-380

Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Maistre G, Piette J C, Godeau P, Cabrol C and Gandjbakhch I (1993) Plasma Endothelin and Pulmonary Pressures in Patients With Congestive Heart Failure. *Am Heart J* 126:1484-1488.

Campbell JM, Bacon T A and Wickstrom E (1990) Oligodeoxynucleoside Phosphorothioate Stability in Subcellular Extracts, Culture Media, Sera and Cerebrospinal Fluid. *J Biochem Biophys Methods* 20:259-267.

Cardillo C, Kilcoyne C M, Waclawiw M, Cannon R O, III and Panza J A (1999) Role of Endothelin in the Increased Vascular Tone of Patients With Essential Hypertension. *Hypertension* 33:753-758.

Carneiro FS, Giachini F R, Lima V V, Carneiro Z N, Nunes K P, Ergul A, Leite R, Tostes R C and Webb R C (2008) DOCA-Salt Treatment Enhances Responses to Endothelin-1 in Murine Corpus Cavernosum. *Can J Physiol Pharmacol* 86:320-328.

Chan SY and Loscalzo J (2008) Pathogenic Mechanisms of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Mol Cell Cardiol* 44:14-30.

Chang H, Wu G J, Wang S M and Hung C R (1993) Plasma Endothelin Levels and Surgically Correctable Pulmonary Hypertension. *Ann Thorac Surg* 55:450-458.

Chataigneau T, Feletou M, Duhault J and Vanhoutte P M (1998) Epoxyeicosatrienoic Acids, Potassium Channel Blockers and Endothelium-Dependent Hyperpolarization in the Guinea-Pig Carotid Artery. *Br J Pharmacol* 123:574-580.

Chaytor AT, Martin P E, Edwards D H and Griffith T M (2001) Gap Junctional Communication Underpins EDHF-Type Relaxations Evoked by ACh in the Rat Hepatic Artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2441-H2450.

Chen G, Suzuki H and Weston A H (1988) Acetylcholine Releases Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and EDRF From Rat Blood Vessels. *Br J Pharmacol* 95:1165-1174.

Chen G, Yamamoto Y, Miwa K and Suzuki H (1991) Hyperpolarization of Arterial Smooth Muscle Induced by Endothelial Humoral Substances. *Am J Physiol* 260:H1888-H1892.

Chen SJ, Chen Y F, Meng Q C, Durand J, Dicarolo V S and Oparil S (1995) Endothelin-Receptor Antagonist Bosentan Prevents and Reverses Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats. *J Appl Physiol* 79:2122-2131.

Cheng ZJ and Miller L J (2001) Agonist-Dependent Dissociation of Oligomeric Complexes of G Protein-Coupled Cholecystokinin Receptors Demonstrated in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* 276:48040-48047.

Chesney CF and Allen J R (1973) Animal Model: Pulmonary Hypertension, Cor Pulmonale and Endocardial Fibroelastosis in Monocrotaline-Intoxicated Nonhuman Primates. *Am J Pathol* 70:489-492.

Christman BW, McPherson C D, Newman J H, King G A, Bernard G R, Groves B M and Loyd J E (1992) An Imbalance Between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 327:70-75.

Cleland JG, Cowburn P J and Morgan K (1996) Neuroendocrine Activation After Myocardial Infarction: Causes and Consequences. *Heart* 76:53-59.

Clouthier DE, Hosoda K, Richardson J A, Williams S C, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer R E and Yanagisawa M (1998) Cranial and Cardiac Neural Crest Defects in Endothelin-A Receptor-Deficient Mice. *Development* 125:813-824.

Clozel M, Breu V, Gray G A and Loffler B M (1993a) In Vivo Pharmacology of Ro 46-2005, the First Synthetic Nonpeptide Endothelin Receptor Antagonist: Implications for Endothelin Physiology. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8:S377-S379.

Clozel M and Gray G A (1995) Are There Different ETB Receptors Mediating Constriction and Relaxation? *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3:S262-S264.

Clozel M, Hess P, Rey M, Iglarz M, Binkert C and Qiu C (2006) Bosentan, Sildenafil, and Their Combination in the Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension in Rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:967-973.

Clozel M, Loffler B M, Breu V, Hilfiger L, Maire J P and Butscha B (1993b) Downregulation of Endothelin Receptors by Autocrine Production of Endothelin-1. *Am J Physiol* 265:C188-C192.

Clozel M, Ramuz H, Clozel J P, Breu V, Hess P, Loffler B M, Coassolo P and Roux S (1999) Pharmacology of Tezosentan, New Endothelin Receptor Antagonist Designed for Parenteral Use. *J Pharmacol Exp Ther* 290:840-846.

Cody RJ, Haas G J, Binkley P F, Capers Q and Kelley R (1992) Plasma Endothelin Correlates With the Extent of Pulmonary Hypertension in Patients With Chronic Congestive Heart Failure. *Circulation* 85:504-509.

Coletta AP, Louis A A, Clark A L, Nikitin N and Cleland J G (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* 4:661-666.

Cosentino F and Luscher T F (1999) Tetrahydrobiopterin and Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *Cardiovasc Res* 43:274-278.

Cowburn PJ, Cleland J G, McArthur J D, MacLean M R, Dargie H J, McMurray J J and Morton J J (1998) Endothelin-1 Has Haemodynamic Effects at Pathophysiological Concentrations in Patients With Left Ventricular Dysfunction. *Cardiovasc Res* 39:563-570.

Cramer H, Schmenger K, Heinrich K, Horstmeyer A, Boning H, Breit A, Piiper A, Lundstrom K, Muller-Esterl W and Schroeder C (2001) Coupling of Endothelin Receptors to the ERK/MAP Kinase Pathway. Roles of Palmitoylation and G(Alpha)q. *Eur J Biochem* 268:5449-5459.

Crawley DE, Liu S F, Barnes P J and Evans T W (1992) Endothelin-3 Is a Potent Pulmonary Vasodilator in the Rat. *J Appl Physiol* 72:1425-1431.

Cummins L, Graff D, Beaton G, Marshall W S and Caruthers M H (1996) Biochemical and Physicochemical Properties of Phosphorodithioate DNA. *Biochemistry* 35:8734-8741.

d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Moreau P and Luscher T F (1997) Structure and Function of Small Arteries in Salt-Induced Hypertension: Effects of Chronic Endothelin-Subtype-A-Receptor Blockade. *Hypertension* 30:905-911.

Davenport AP, Ashby M J, Easton P, Ella S, Bedford J, Dickerson C, Nunez D J, Capper S J and Brown M J (1990) A Sensitive Radioimmunoassay Measuring Endothelin-Like Immunoreactivity in Human Plasma: Comparison of Levels in Patients With Essential Hypertension and Normotensive Control Subjects. *Clin Sci (Lond)* 78:261-264.

Davie N, Haleen S J, Upton P D, Polak J M, Yacoub M H, Morrell N W and Wharton J (2002) ET(A) and ET(B) Receptors Modulate the Proliferation of Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 165:398-405.

Day R, Lariviere R and Schiffrin E L (1995) In Situ Hybridization Shows Increased Endothelin-1 mRNA Levels in Endothelial Cells of Blood Vessels of Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats. *Am J Hypertens* 8:294-300.

De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner T D and Vane J R (1988) Pressor Effects of Circulating Endothelin Are Limited by Its Removal in the Pulmonary Circulation and by the Release of Prostacyclin and Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9797-9800.

Deng Z, Morse J H, Slager S L, Cuervo N, Moore K J, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer S G, Barst R J, Hodge S E and Knowles J A (2000) Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor-II Gene. *Am J Hum Genet* 67:737-744.

Di Nunzio AS, Legaz G, Rodano V, Bianciotti L G and Vatta M S (2004) Modulatory Effect of Endothelin-1 and -3 on Neuronal Norepinephrine Release in the Rat Posterior Hypothalamus. *Regul Pept* 118:51-59.

Dicarlo VS, Chen S J, Meng Q C, Durand J, Yano M, Chen Y F and Oparil S (1995) ETA-Receptor Antagonist Prevents and Reverses Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Rat. *Am J Physiol* 269:L690-L697.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher A M (1999) Activation of Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells by Akt-Dependent Phosphorylation. *Nature* 399:601-605.

Dora KA, Martin P E, Chaytor A T, Evans W H, Garland C J and Griffith T M (1999) Role of Heterocellular Gap Junctional Communication in Endothelium-Dependent Smooth Muscle Hyperpolarization: Inhibition by a Connexin-Mimetic Peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 254:27-31.

D'Orleans-Juste P, Telemaque S, Claing A, Ihara M and Yano M (1992) Human Big-Endothelin-1 and Endothelin-1 Release Prostacyclin Via the Activation of ET1 Receptors in the Rat Perfused Lung. *Br J Pharmacol* 105:773-775.

Doucet J, Gonzalez W and Michel J B (1996) Endothelin Antagonists in Salt-Dependent Hypertension Associated With Renal Insufficiency. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:643-651.

Dreshaj IA, Miller M J, Ernsberger P, Haxhiu-Poskurica B, Martin R J and Haxhiu M A (1995) Central Effects of Endothelin on Respiratory Output During Development. *J Appl Physiol* 79:420-427.

Dupuis J, Cernacek P, Tardif J C, Stewart D J, Gosselin G, Dyrda I, Bonan R and Crepeau J (1998a) Reduced Pulmonary Clearance of Endothelin-1 in Pulmonary Hypertension. *Am Heart J* 135:614-620.

Dupuis J, Goresky C A and Fournier A (1996a) Pulmonary Clearance of Circulating Endothelin-1 in Dogs in Vivo: Exclusive Role of ETB Receptors. *J Appl Physiol* 81:1510-1515.

Dupuis J, Goresky C A and Stewart D J (1994) Pulmonary Removal and Production of Endothelin in the Anesthetized Dog. *J Appl Physiol* 76:694-700.

Dupuis J and Hoepfer M M (2008) Endothelin Receptor Antagonists in Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J* 31:407-415.

Dupuis J, Jasmin J F, Prie S and Cernacek P (2000) Importance of Local Production of Endothelin-1 and of the ET(B) Receptor in the Regulation of Pulmonary Vascular Tone. *Pulm Pharmacol Ther* 13:135-140.

Dupuis J, Moe G W and Cernacek P (1998b) Reduced Pulmonary Metabolism of Endothelin-1 in Canine Tachycardia-Induced Heart Failure. *Cardiovasc Res* 39:609-616.

Dupuis J, Rouleau J L and Cernacek P (1998c) Reduced Pulmonary Clearance of Endothelin-1 Contributes to the Increase of Circulating Levels in Heart Failure Secondary to Myocardial Infarction. *Circulation* 98:1684-1687.

Dupuis J, Stewart D J, Cernacek P and Gosselin G (1996b) Human Pulmonary Circulation Is an Important Site for Both Clearance and Production of Endothelin-1. *Circulation* 94:1578-1584.

Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Darteville P, Hamon M and Adnot S (2001) Serotonin Transporter Overexpression Is Responsible for Pulmonary Artery Smooth Muscle Hyperplasia in Primary Pulmonary Hypertension. *J Clin Invest* 108:1141-1150.

Edwards G, Feletou M, Gardener M J, Thollon C, Vanhoutte P M and Weston A H (1999) Role of Gap Junctions in the Responses to EDHF in Rat and Guinea-Pig Small Arteries. *Br J Pharmacol* 128:1788-1794.

Edwards RM, Trizna W and Ohlstein E H (1990) Renal Microvascular Effects of Endothelin. *Am J Physiol* 259:F217-F221.

Eglezos A, Cucchi P, Patacchini R, Quartara L, Maggi CA, Mizrahi J (1993) Differential effects of BQ-123 against endothelin-1 and endothelin-3 on the rat vas deferens: evidence for an atypical endothelin receptor. *Br J Pharmacol* 109 (3): 736-738

Eguchi S, Hirata Y and Marumo F (1993) Endothelin Subtype B Receptors Are Coupled to Adenylate Cyclase Via Inhibitory G Protein in Cultured Bovine Endothelial Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8:S161-S163.

Elshourbagy NA, Korman D R, Wu H L, Sylvester D R, Lee J A, Nuthalaganti P, Bergsma D J, Kumar C S and Nambi P (1993) Molecular Characterization and Regulation of the Human Endothelin Receptors. *J Biol Chem* 268:3873-3879.

Elton TS, Oparil S, Taylor G R, Hicks P H, Yang R H, Jin H and Chen Y F (1992) Normobaric Hypoxia Stimulates Endothelin-1 Gene Expression in the Rat. *Am J Physiol* 263:R1260-R1264.

Emoto N and Yanagisawa M (1995) Endothelin-Converting Enzyme-2 Is a Membrane-Bound, Phosphoramidon-Sensitive Metalloprotease With Acidic PH Optimum. *J Biol Chem* 270:15262-15268.

Ergul A, Grubbs A L, Zhang Y and Spinale F G (2000) Selective Upregulation of Endothelin Converting Enzyme-1a in the Human Failing Heart. *J Card Fail* 6:314-320.

Ergul S, Parish D C, Puett D and Ergul A (1996) Racial Differences in Plasma Endothelin-1 Concentrations in Individuals With Essential Hypertension. *Hypertension* 28:652-655.

Evans NJ and Walker J W (2008a) Endothelin Receptor Dimers Evaluated by FRET, Ligand Binding, and Calcium Mobilization. *Biophys J* 95:483-492.

Evans NJ and Walker J W (2008b) Sustained Ca²⁺ Signaling and Delayed Internalization Associated With Endothelin Receptor Heterodimers Linked Through a PDZ Finger. *Can J Physiol Pharmacol* 86:526-535.

Evans RG, Bergstrom G, Cotterill E and Anderson W P (1998) Renal Haemodynamic Effects of Endothelin-1 and the ETA/ETB Antagonist TAK-044 in Anaesthetized Rabbits. *J Hypertens* 16:1897-1905.

Farber HW and Loscalzo J (2004) Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 351:1655-1665.

Feletou M and Vanhoutte P M (2000) Endothelium-Dependent Hyperpolarization of Vascular Smooth Muscle Cells. *Acta Pharmacol Sin* 21:1-18.

Fike CD, Zhang Y and Kaplowitz M R (2005) Thromboxane Inhibition Reduces an Early Stage of Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Piglets. *J Appl Physiol* 99:670-676.

Filep JG (1997) Endogenous Endothelin Modulates Blood Pressure, Plasma Volume, and Albumin Escape After Systemic Nitric Oxide Blockade. *Hypertension* 30:22-28.

Filep JG, Foldes-Filep E, Rousseau A, Sirois P and Fournier A (1993) Vascular Responses to Endothelin-1 Following Inhibition of Nitric Oxide Synthesis in the Conscious Rat. *Br J Pharmacol* 110:1213-1221.

Filep JG, Fournier A and Foldes-Filep E (1995) Acute Pro-Inflammatory Actions of Endothelin-1 in the Guinea-Pig Lung: Involvement of ETA and ETB Receptors. *Br J Pharmacol* 115:227-236.

Firth JD and Ratcliffe P J (1992) Organ Distribution of the Three Rat Endothelin Messenger RNAs and the Effects of Ischemia on Renal Gene Expression. *J Clin Invest* 90:1023-1031.

Fishman AP (2004) Primary Pulmonary Arterial Hypertension: a Look Back. *J Am Coll Cardiol* 43:2S-4S.

Floyd DH, Geva A, Bruinsma S P, Overton M C, Blumer K J and Baranski T J (2003) C5a Receptor Oligomerization. II. Fluorescence Resonance Energy Transfer Studies of a Human G Protein-Coupled Receptor Expressed in Yeast. *J Biol Chem* 278:35354-35361.

Flynn MA, Haleen S J, Welch K M, Cheng X M and Reynolds E E (1998) Endothelin B Receptors on Human Endothelial and Smooth-Muscle Cells Show Equivalent Binding Pharmacology. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:106-116.

Fukuda N, Izumi Y, Soma M, Watanabe Y, Watanabe M, Hatano M, Sakuma I and Yasuda H (1990) L-NG-Monomethyl Arginine Inhibits the Vasodilating Effects of Low Dose of Endothelin-3 on Rat Mesenteric Arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 167:739-745.

Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M and Nishikibe M (1994a) Clearance of Circulating Endothelin-1 by ETB Receptors in Rats. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1461-1465.

Fukuroda T, Kobayashi M, Ozaki S, Yano M, Miyauchi T, Onizuka M, Sugishita Y, Goto K and Nishikibe M (1994b) Endothelin Receptor Subtypes in Human Versus Rabbit Pulmonary Arteries. *J Appl Physiol* 76:1976-1982.

Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M, Miyauchi T, Ishikawa S, Onizuka M, Goto K and Nishikibe M (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* 117:995-999.

Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M and Nishikibe M (1994c) Synergistic Inhibition by BQ-123 and BQ-788 of Endothelin-1-Induced Contractions of the Rabbit Pulmonary Artery. *Br J Pharmacol* 113:336-338.

Furchgott RF and Zawadzki J V (1980) The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

Galatius-Jensen S, Wroblewski H, Emmeluth C, Bie P, Haunso S and Kastrup J (1996) Plasma Endothelin in Congestive Heart Failure: a Predictor of Cardiac Death? *J Card Fail* 2:71-76.

Galie N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon M D, Keogh A M, Frost A E, Zwicke D, Naeije R, Shapiro S, Olschewski H and Rubin L J (2005) Ambrisentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 46:529-535.

Galie N, Beghetti M, Gatzoulis M A, Granton J, Berger R M, Lauer A, Chiossi E and Landzberg M (2006) Bosentan Therapy in Patients With Eisenmenger Syndrome: a Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Circulation* 114:48-54.

Galie N, Humbert M, Vachiery J L, Vizza C D, Kneussl M, Manes A, Sitbon O, Torbicki A, Delcroix M, Naeije R, Hoeper M, Chaouat A, Morand S, Besse B and Simonneau G (2002) Effects of Beraprost Sodium, an Oral Prostacyclin Analogue, in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Am Coll Cardiol* 39:1496-1502.

Galie N, Olschewski H, Oudiz R J, Torres F, Frost A, Ghofrani H A, Badesch D B, McGoon M D, McLaughlin V V, Roecker E B, Gerber M J, Dufton C, Wiens B L and Rubin L J (2008) Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Results of the Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Efficacy (ARIES) Study 1 and 2. *Circulation* 117:3010-3019.

Galie N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin L J, Simonneau G, Piro S G, Garcia M A, Blanc J J, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Burgos E F, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, McGregor K, Morais J, Oto A, Smiseth O A, Barbera J A, Gibbs S, Hoeper M, Humbert M, Naeije R and Pepke-Zaba J (2004) Guidelines on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 25:2243-2278.

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L and Pin J P (2001) Allosteric Interactions Between GB1 and GB2 Subunits Are Required for Optimal GABA(B) Receptor Function. *EMBO J* 20:2152-2159.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A and Sessa W C (1998) Dynamic Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Hsp90. *Nature* 392:821-824.

Gardiner SM, Compton A M and Bennett T (1990) Effects of Indomethacin on the Regional Haemodynamic Responses to Low Doses of Endothelins and Sarafotoxin. *Br J Pharmacol* 100:158-162.

Gardiner SM, Kemp P A, March J E and Bennett T (1996) Effects of the Non-Peptide, Non-Selective Endothelin Antagonist, Bosentan, on Regional Haemodynamic Responses to NG-Monomethyl-L-Arginine in Conscious Rats. *Br J Pharmacol* 118:352-354.

George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G and O'Dowd B F (2000) Oligomerization of Mu- and Delta-Opioid Receptors. Generation of Novel Functional Properties. *J Biol Chem* 275:26128-26135.

George SR, Ng G Y, Lee S P, Fan T, Varghese G, Wang C, Deber C M, Seeman P and O'Dowd B F (2003) Blockade of G Protein-Coupled Receptors and the Dopamine

Transporter by a Transmembrane Domain Peptide: Novel Strategy for Functional Inhibition of Membrane Proteins in Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 307:481-489.

George SR, O'Dowd B F and Lee S P (2002) G-Protein-Coupled Receptor Oligomerization and Its Potential for Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1:808-820.

Giaid A (1998) Nitric Oxide and Endothelin-1 in Pulmonary Hypertension. *Chest* 114:208S-212S.

Giaid A and Saleh D (1995) Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients With Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 333:214-221.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel R P, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid W P and Stewart D J (1993) Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients With Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 328:1732-1739.

Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le C S, Casado V, Canela E I, Rondin S, Lew J Y, Watson S, Zoli M, Agnati L F, Verniera P, Lluís C, Ferre S, Fuxe K and Franco R (2000) Dopamine D1 and Adenosine A1 Receptors Form Functionally Interacting Heteromeric Complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8606-8611.

Gluais P, Edwards G, Weston A H, Falck J R, Vanhoutte P M and Feletou M (2005) Role of SK(Ca) and IK(Ca) in Endothelium-Dependent Hyperpolarizations of the Guinea-Pig Isolated Carotid Artery. *Br J Pharmacol* 144:477-485.

Goldie RG, D'Aprile A C, Cvetkovski R, Rigby P J and Henry P J (1996) Influence of Regional Differences in ETA and ETB Receptor Subtype Proportions on Endothelin-1-Induced Contractions in Porcine Isolated Trachea and Bronchus. *Br J Pharmacol* 117:736-742.

Goldie RG, D'Aprile A C, Self G J, Rigby P J and Henry P J (2000) Influence of Endothelin-1(1-31) on Smooth Muscle Tone and Cholinergic Nerve-Mediated Contraction in Rat Isolated Trachea. *J Cardiovasc Pharmacol* 36:S228-S231.

Goldie RG, Grayson P S, Knott P G, Self G J and Henry P J (1994) Predominance of EndothelinA (ETA) Receptors in Ovine Airway Smooth Muscle and Their Mediation of ET-1-Induced Contraction. *Br J Pharmacol* 112:749-756.

Goldie RG, Henry P J, Knott P G, Self G J, Luttmann M A and Hay D W (1995) Endothelin-1 Receptor Density, Distribution, and Function in Human Isolated Asthmatic Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1653-1658.

Gomes I, Jordan B A, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V and Devi L A (2000) Heterodimerization of Mu and Delta Opioid Receptors: A Role in Opiate Synergy. *J Neurosci* 20:RC110.

Gratton JP, Cournoyer G, Loffler B M, Sirois P and D'Orleans-Juste P (1997) ET(B) Receptor and Nitric Oxide Synthase Blockade Induce BQ-123-Sensitive Pressor Effects in the Rabbit. *Hypertension* 30:1204-1209.

Gratton JP, Fontana J, O'Connor D S, Garcia-Cardena G, McCabe T J and Sessa W C (2000) Reconstitution of an Endothelial Nitric-Oxide Synthase (ENOS), Hsp90, and Caveolin-1 Complex in Vitro. Evidence That Hsp90 Facilitates Calmodulin Stimulated Displacement of ENOS From Caveolin-1. *J Biol Chem* 275:22268-22272.

Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W and Oksche A (2004) Ligand-Dependent Differences in the Internalization of Endothelin A and Endothelin B Receptor Heterodimers. *J Biol Chem* 279:27679-27687.

Grinstein S and Rothstein A (1986) Mechanisms of Regulation of the Na⁺/H⁺ Exchanger. *J Membr Biol* 90:1-12.

Grover TR, Parker T A, Markham N E and Abman S H (2005) RhVEGF Treatment Preserves Pulmonary Vascular Reactivity and Structure in an Experimental Model of Pulmonary Hypertension in Fetal Sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L315-L321.

Gryglewski RJ, Botting R M and Vane J R (1988) Mediators Produced by the Endothelial Cell. *Hypertension* 12:530-548.

Halushka PV, Allan C J and vis-Bruno K L (1995) Thromboxane A₂ Receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:361-378.

Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B (1975) Thromboxanes: a New Group of Biologically Active Compounds Derived From Prostaglandin Endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2994-2998.

Hamm HE (2001) How Activated Receptors Couple to G Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4819-4821.

Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K and Niwa M (2002) Endothelin-1 Binding to Endothelin Receptors in the Rat Anterior Pituitary Gland: Possible Formation of an ETA-ETB Receptor Heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 22:207-226.

Harrison VJ, Corder R, Anggard E E and Vane J R (1993) Evidence for Vesicles That Transport Endothelin-1 in Bovine Aortic Endothelial Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8:S57-S60.

Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J and Masaki T (1998) Purification of a Novel Endothelin-Converting Enzyme Specific for Big Endothelin-3. *FEBS Lett* 428:304-308.

Haworth SG (1998) Primary Pulmonary Hypertension. *J R Coll Physicians Lond* 32:187-190.

Hay DW, Luttmann M A, Hubbard W C and Udem B J (1993) Endothelin Receptor Subtypes in Human and Guinea-Pig Pulmonary Tissues. *Br J Pharmacol* 110:1175-1183.

Hay DW, Luttmann M A, Pullen M A and Nambi P (1998) Functional and Binding Characterization of Endothelin Receptors in Human Bronchus: Evidence for a Novel Endothelin B Receptor Subtype? *J Pharmacol Exp Ther* 284:669-677.

Haynes WG, Ferro C J, O'Kane K P, Somerville D, Lomax C C and Webb D J (1996) Systemic Endothelin Receptor Blockade Decreases Peripheral Vascular Resistance and Blood Pressure in Humans. *Circulation* 93:1860-1870.

Haynes WG and Webb D J (1994) Contribution of Endogenous Generation of Endothelin-1 to Basal Vascular Tone. *Lancet* 344:852-854.

Hebert TE, Moffett S, Morello J P, Loisel T P, Bichet D G, Barret C and Bouvier M (1996) A Peptide Derived From a Beta2-Adrenergic Receptor Transmembrane Domain Inhibits Both Receptor Dimerization and Activation. *J Biol Chem* 271:16384-16392.

Hendrickx H and Casteels R (1974) Electrogenic Sodium Pump in Arterial Smooth Muscle Cells. *Pflugers Arch* 346:299-306.

Henry PJ and King S H (1999) Typical Endothelin ETA Receptors Mediate Atypical Endothelin-1-Induced Contractions in Sheep Isolated Tracheal Smooth Muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1385-1390.

Herve P, Drouet L, Dosquet C, Launay J M, Rain B, Simonneau G, Caen J and Duroux P (1990) Primary Pulmonary Hypertension in a Patient With a Familial Platelet Storage Pool Disease: Role of Serotonin. *Am J Med* 89:117-120.

Herve P, Launay J M, Scrobahaci M L, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P and Drouet L (1995) Increased Plasma Serotonin in Primary Pulmonary Hypertension. *Am J Med* 99:249-254.

Hickey KA, Rubanyi G, Paul R J and Highsmith R F (1985) Characterization of a Coronary Vasoconstrictor Produced by Cultured Endothelial Cells. *Am J Physiol* 248:C550-C556.

Hill NS, Warburton R R, Pietras L and Klinger J R (1997) Nonspecific Endothelin-Receptor Antagonist Blunts Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *J Appl Physiol* 83:1209-1215.

Hocher B, George I, Diekmann F, Zart R, Rebstock J, Schwarz A, Thone-Reineke C, Neumayer H H and Bauer C (2000a) ETA Receptor Blockade Induces Fibrosis of the Clipped Kidney in Two-Kidney-One-Clip Renovascular Hypertensive Rats. *J Hypertens* 18:1807-1814.

Hocher B, George I, Rebstock J, Bauch A, Schwarz A, Neumayer H H and Bauer C (1999) Endothelin System-Dependent Cardiac Remodeling in Renovascular Hypertension. *Hypertension* 33:816-822.

Hocher B, Schwarz A, Fagan K A, Thone-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer H H, Rodman D M and Theuring F (2000b) Pulmonary Fibrosis and Chronic Lung Inflammation in ET-1 Transgenic Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:19-26.

Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer H H, Schleuning W D and Theuring F (1997) Endothelin-1 Transgenic Mice Develop Glomerulosclerosis, Interstitial Fibrosis, and Renal Cysts but Not Hypertension. *J Clin Invest* 99:1380-1389.

Hoeper MM, Faulenbach C, Golpon H, Winkler J, Welte T and Niedermeyer J (2004) Combination Therapy With Bosentan and Sildenafil in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J* 24:1007-1010.

Hoeper MM, Leuchte H, Halank M, Wilkens H, Meyer F J, Seyfarth H J, Wensel R, Ripken F, Bremer H, Kluge S, Hoeffken G and Behr J (2006) Combining Inhaled Iloprost With Bosentan in Patients With Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J* 28:691-694.

Hoorn CM and Roth R A (1992) Monocrotaline Pyrrole Alters DNA, RNA and Protein Synthesis in Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Am J Physiol* 262:L740-L747.

Hoorn CM, Wagner J G and Roth R A (1993) Effects of Monocrotaline Pyrrole on Cultured Rat Pulmonary Endothelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 120:281-287.

Horio T, Kohno M, Yokokawa K, Murakawa K, Yasunari K, Fujiwara H, Kurihara N and Takeda T (1991) Effect of Hypoxia on Plasma Immunoreactive Endothelin-1 Concentration in Anesthetized Rats. *Metabolism* 40:999-1001.

Horvat RD, Roess D A, Nelson S E, Barisas B G and Clay C M (2001) Binding of Agonist but Not Antagonist Leads to Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Intrinsically Fluorescent Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors. *Mol Endocrinol* 15:695-703.

Hoshikawa Y, Voelkel N F, Gesell T L, Moore M D, Morris K G, Alger L A, Narumiya S and Geraci M W (2001) Prostacyclin Receptor-Dependent Modulation of Pulmonary Vascular Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 164:314-318.

Hosoda K, Hammer R E, Richardson J A, Baynash A G, Cheung J C, Giaid A and Yanagisawa M (1994) Targeted and Natural (Piebald-Lethal) Mutations of Endothelin-B Receptor Gene Produce Megacolon Associated With Spotted Coat Color in Mice. *Cell* 79:1267-1276.

Housset C, Rockey D C and Bissell D M (1993) Endothelin Receptors in Rat Liver: Lipocytes As a Contractile Target for Endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9266-9270.

Humbert M, Barst R J, Robbins I M, Channick R N, Galie N, Boonstra A, Rubin L J, Horn E M, Manes A and Simonneau G (2004a) Combination of Bosentan With Epoprostenol in Pulmonary Arterial Hypertension: BREATHE-2. *Eur Respir J* 24:353-359.

Humbert M, Morrell N W, Archer S L, Stenmark K R, MacLean M R, Lang I M, Christman B W, Weir E K, Eickelberg O, Voelkel N F and Rabinovitch M (2004b) Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:13S-24S.

Humbert M, Sitbon O and Simonneau G (2004c) Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 351:1425-1436.

Ignarro L J, Buga G M, Wood K S, Byrns R E and Chaudhuri G (1987) Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released From Artery and Vein Is Nitric Oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9265-9269.

Ignasiak D P, McClanahan T B, Saganek L J, Potoczak R E, Hallak H and Gallagher K P (1997) Effects of Endothelin ETA Receptor Antagonism With PD 156707 on Hemodynamics and Renal Vascular Resistance in Rabbits. *Eur J Pharmacol* 321:295-300.

Ikeda S, Emoto N, Alimsardjono H, Yokoyama M and Matsuo M (2002) Molecular Isolation and Characterization of Novel Four Subisoforms of ECE-2. *Biochem Biophys Res Commun* 293:421-426.

Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T and Marumo F (1992) Induction of Endothelin-1 Gene by Angiotensin and Vasopressin in Endothelial Cells. *Hypertension* 19:753-757.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K and Masaki T (1989) The Human Endothelin Family: Three Structurally and Pharmacologically Distinct Isopeptides Predicted by Three Separate Genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2863-2867.

Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, Bouvier M and Marullo S (2002) Constitutive Agonist-Independent CCR5 Oligomerization and Antibody-Mediated Clustering Occurring at Physiological Levels of Receptors. *J Biol Chem* 277:34666-34673.

Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, Kimura C, Kosaka T, Inoue A, Ishida N, Mitsui Y, Onda H, Fujino M and . (1988) Cloning and Sequence Analysis of cDNA Encoding the Precursor of a Human Endothelium-Derived Vasoconstrictor Peptide, Endothelin: Identity of Human and Porcine Endothelin. *FEBS Lett* 231:440-444.

Ivy D, McMurtry I F, Yanagisawa M, Gariepy C E, Le Cras T D, Gebb S A, Morris K G, Wiseman R C and Abman S H (2001) Endothelin B Receptor Deficiency Potentiates ET-1 and Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L1040-L1048.

Ivy DD, Parker T A and Abman S H (2000) Prolonged Endothelin B Receptor Blockade Causes Pulmonary Hypertension in the Ovine Fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L758-L765.

Jasmin JF, Cernacek P and Dupuis J (2003) Activation of the Right Ventricular Endothelin (ET) System in the Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension: Response to Chronic ETA Receptor Blockade. *Clin Sci (Lond)* 105:647-653.

Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P and Dupuis J (2001) Effectiveness of a Nonselective ET(A/B) and a Selective ET(A) Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* 103:314-318.

Jaureguiberry MS, Di Nunzio A S, Dattilo M A, Bianciotti L G and Vatta M S (2004) Endothelin 1 and 3 Enhance Neuronal Nitric Oxide Synthase Activity Through ETB Receptors Involving Multiple Signaling Pathways in the Rat Anterior Hypothalamus. *Peptides* 25:1133-1138.

Johnstrom P, Fryer T D, Richards H K, Harris N G, Barret O, Clark J C, Pickard J D and Davenport A P (2005) Positron Emission Tomography Using ¹⁸F-Labelled Endothelin-1

Reveals Prevention of Binding to Cardiac Receptors Owing to Tissue-Specific Clearance by ET B Receptors in Vivo. *Br J Pharmacol* 144:115-122.

Jordan BA, Cvejic S and Devi L A (2000) Opioids and Their Complicated Receptor Complexes. *Neuropsychopharmacology* 23:S5-S18.

Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T and Omata M (1999) Effects of Hypertension, Diabetes Mellitus, and Hypercholesterolemia on Endothelin Type B Receptor-Mediated Nitric Oxide Release From Rat Kidney. *Circulation* 99:1242-1248.

Karne S, Jayawickreme C K and Lerner M R (1993) Cloning and Characterization of an Endothelin-3 Specific Receptor (ETC Receptor) From *Xenopus Laevis* Dermal Melanophores. *J Biol Chem* 268:19126-19133.

Kasai H, Takanashi M, Takasaki C, Endoh M (1994) Pharmacological properties of endothelin receptor subtypes mediating positive inotropic effects in rabbit heart. *Am J Physiol* 266: H2220-H2228

Kawabata M, Imamura T and Miyazono K (1998) Signal Transduction by Bone Morphogenetic Proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:49-61.

Kelland NF and Webb D J (2006) Clinical Trials of Endothelin Antagonists in Heart Failure: a Question of Dose? *Exp Biol Med (Maywood)* 231:696-699.

Kiely DG, Cargill R I, Struthers A D and Lipworth B J (1997) Cardiopulmonary Effects of Endothelin-1 in Man. *Cardiovasc Res* 33:378-386.

Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K and Masaki T (1989) Conversion of Big Endothelin-1 to 21-Residue Endothelin-1 Is Essential for Expression of Full Vasoconstrictor Activity: Structure-Activity Relationships of Big Endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5:S5-S7.

Kishi F, Minami K, Okishima N, Murakami M, Mori S, Yano M, Niwa Y, Nakaya Y and Kido H (1998) Novel 31-Amino-Acid-Length Endothelins Cause Constriction of Vascular Smooth Muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 248:387-390.

Klipper E, Levy N, Gilboa T, Muller L and Meidan R (2006) Identification of a Novel Alternatively Spliced Variant Endothelin Converting Enzyme-1 Lacking a Transmembrane Domain. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:723-728.

Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z and Bdolah A (1988) Sarafotoxin, a Novel Vasoconstrictor Peptide: Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Heart and Brain. *Science* 242:268-270.

Kloog Y and Sokolovsky M (1989) Similarities in Mode and Sites of Action of Sarafotoxins and Endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 10:212-214.

Knorre DG, Vlassov V V and Zarytova V F (1985) Reactive Oligonucleotide Derivatives and Sequence-Specific Modification of Nucleic Acids. *Biochimie* 67:785-789.

Knowles J, Loizidou M and Taylor I (2005) Endothelin-1 and Angiogenesis in Cancer. *Curr Vasc Pharmacol* 3:309-314.

Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K and Sugishita Y (1999) Expression of Endothelin-1, ETA and ETB Receptors, and ECE and Distribution of Endothelin-1 in Failing Rat Heart. *Am J Physiol* 276:H1197-H1206.

Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K and Sugishita Y (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* 62:185-193.

Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen J E, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, Videbaek J, Cole D S, Auclert L and Pauly N C (1995) A Clinical Trial of the Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor Trandolapril in Patients With Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. *N Engl J Med* 333:1670-1676.

Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T, Fukui T and Takeda T (1990) Plasma Immunoreactive Endothelin in Essential Hypertension. *Am J Med* 88:614-618.

Kramer BK, Ackermann M, Kohler S M and Riegger G A (1994) Role of Endothelin in Hypertension. *Clin Investig* 72:88-93.

Kroeger KM, Pflieger K D and Eidne K A (2003) G-Protein Coupled Receptor Oligomerization in Neuroendocrine Pathways. *Front Neuroendocrinol* 24:254-278.

Krum H, Viskoper R J, Lacourciere Y, Budde M and Charlon V (1998) The Effect of an Endothelin-Receptor Antagonist, Bosentan, on Blood Pressure in Patients With Essential Hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 338:784-790.

Kumar P, Kazzi N J and Shankaran S (1996) Plasma Immunoreactive Endothelin-1 Concentrations in Infants With Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *Am J Perinatol* 13:335-341.

Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao W H, Kamada N and . (1994) Elevated Blood Pressure and Craniofacial Abnormalities in Mice Deficient in Endothelin-1. *Nature* 368:703-710.

Kurreck J (2003) Antisense Technologies. Improvement Through Novel Chemical Modifications. *Eur J Biochem* 270:1628-1644.

Kuwaki T, Cao W H, Kurihara Y, Kurihara H, Ling G Y, Onodera M, Ju K H, Yazaki Y and Kumada M (1996) Impaired Ventilatory Responses to Hypoxia and Hypercapnia in Mutant Mice Deficient in Endothelin-1. *Am J Physiol* 270:R1279-R1286.

LaDouceur DM, Flynn M A, Keiser J A, Reynolds E and Haleen S J (1993) ETA and ETB Receptors Coexist on Rabbit Pulmonary Artery Vascular Smooth Muscle Mediating Contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 196:209-215.

Lane KB, Machado R D, Pauciulo M W, Thomson J R, Phillips J A, III, Loyd J E, Nichols W C and Trembath R C (2000) Heterozygous Germline Mutations in BMPR2, Encoding a TGF-Beta Receptor, Cause Familial Primary Pulmonary Hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet* 26:81-84.

Lang IM, Bonderman D, Kneussl M and Marx M (2004) Paediatric Pulmonary Vascular Disease. *Paediatr Respir Rev* 5:238-248.

Langleben D, DeMarchie M, Laporta D, Spanier A H, Schlesinger R D and Stewart D J (1993) Endothelin-1 in Acute Lung Injury and the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am Rev Respir Dis* 148:1646-1650.

Lariviere R, Day R and Schiffrin E L (1993a) Increased Expression of Endothelin-1 Gene in Blood Vessels of Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats. *Hypertension* 21:916-920.

Lariviere R, Sventek P and Schiffrin E L (1995) Expression of Endothelin-1 Gene in Blood Vessels of Adult Spontaneously Hypertensive Rats. *Life Sci* 56:1889-1896.

Lariviere R, Thibault G and Schiffrin E L (1993b) Increased Endothelin-1 Content in Blood Vessels of Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive but Not in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 21:294-300.

Le Cras TD, Markham N E, Tuder R M, Voelkel N F and Abman S H (2002) Treatment of Newborn Rats With a VEGF Receptor Inhibitor Causes Pulmonary Hypertension and Abnormal Lung Structure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L555-L562.

Le Douarin NM and Teillet M A (1973) The Migration of Neural Crest Cells to the Wall of the Digestive Tract in Avian Embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30:31-48.

Lee S, Lin M, Mele A, Cao Y, Farmer J, Russo D and Redman C (1999) Proteolytic Processing of Big Endothelin-3 by the Kell Blood Group Protein. *Blood* 94:1440-1450.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P and Costa T (1993) Constitutive Activity of Receptors Coupled to Guanine Nucleotide Regulatory Proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14:303-307.

Lerman A, Edwards B S, Hallett J W, Heublein D M, Sandberg S M and Burnett J C, Jr. (1991) Circulating and Tissue Endothelin Immunoreactivity in Advanced Atherosclerosis. *N Engl J Med* 325:997-1001.

Li H, Chen S J, Chen Y F, Meng Q C, Durand J, Oparil S and Elton T S (1994a) Enhanced Endothelin-1 and Endothelin Receptor Gene Expression in Chronic Hypoxia. *J Appl Physiol* 77:1451-1459.

Li H, Elton T S, Chen Y F and Oparil S (1994b) Increased Endothelin Receptor Gene Expression in Hypoxic Rat Lung. *Am J Physiol* 266:L553-L560.

Li JS, Knafo L, Turgeon A, Garcia R and Schiffrin E L (1996a) Effect of Endothelin Antagonism on Blood Pressure and Vascular Structure in Renovascular Hypertensive Rats. *Am J Physiol* 271:H88-H93.

Li JS, Schurch W and Schiffrin E L (1996b) Renal and Vascular Effects of Chronic Endothelin Receptor Antagonism in Malignant Hypertensive Rats. *Am J Hypertens* 9:803-811.

Lin HY, Kaji E H, Winkel G K, Ives H E and Lodish H F (1991) Cloning and Functional Expression of a Vascular Smooth Muscle Endothelin 1 Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3185-3189.

Lipton HL, Cohen G A, McMurtry I F and Hyman A L (1991) Pulmonary Vasodilation to Endothelin Isopeptides in Vivo Is Mediated by Potassium Channel Activation. *J Appl Physiol* 70:947-952.

Liu JJ, Chen J R and Buxton B F (1996) Unique Response of Human Arteries to Endothelin B Receptor Agonist and Antagonist. *Clin Sci (Lond)* 90:91-96.

Love MP, Haynes W G, Gray G A, Webb D J and McMurray J J (1996) Vasodilator Effects of Endothelin-Converting Enzyme Inhibition and Endothelin ETA Receptor Blockade in Chronic Heart Failure Patients Treated With ACE Inhibitors. *Circulation* 94:2131-2137.

Luscher TF, Yang Z, Tschudi M, von S L, Stulz P, Boulanger C, Siebenmann R, Turina M and Buhler F R (1990) Interaction Between Endothelin-1 and Endothelium-Derived Relaxing Factor in Human Arteries and Veins. *Circ Res* 66:1088-1094.

MacLean MR, Docherty C C, McCulloch K M and Morecroft I (1998) Effect of Novel Mixed ETA/ETB Antagonists on Responses to ET-1 in Human Small Muscular Pulmonary Arteries. *Pulm Pharmacol Ther* 11:147-149.

MacLean MR, McCulloch K M and Baird M (1994) Endothelin ETA- and ETB-Receptor-Mediated Vasoconstriction in Rat Pulmonary Arteries and Arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol* 23:838-845.

Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A and Meli A (1989) The Activity of Peptides of the Endothelin Family in Various Mammalian Smooth Muscle Preparations. *Eur J Pharmacol* 174:23-31.

Maguire J and Davenport A P (2004) Alternative Pathway to Endothelin-Converting Enzyme for the Synthesis of Endothelin in Human Blood Vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1:S27-S29.

Maguire JJ, Kuc R E and Davenport A P (2001) Vasoconstrictor Activity of Novel Endothelin Peptide, ET-1(1 - 31), in Human Mammary and Coronary Arteries in Vitro. *Br J Pharmacol* 134:1360-1366.

Majowicz MP, Costa MA, Balaszczuk AM, Vidal NA, Bombicino KA, Arranz CT (1998) Effects of endothelin-3 on water and sodium excretion during extracellular volume expansion. *Peptides* 19 (8):1373-1376.

Margeta-Mitrovic M, Jan Y N and Jan L Y (2000) A Trafficking Checkpoint Controls GABA(B) Receptor Heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.

Marletta MA, Yoon P S, Iyengar R, Leaf C D and Wishnok J S (1988) Macrophage Oxidation of L-Arginine to Nitrite and Nitrate: Nitric Oxide Is an Intermediate. *Biochemistry* 27:8706-8711.

Marsboom GR and Janssens SP (2004) Models for Pulmonary Hypertension. *Drug discovery today* 1:289-296.

Marshall FH, Jones K A, Kaupmann K and Bettler B (1999a) GABAB Receptors - the First 7TM Heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* 20:396-399.

Marshall FH, White J, Main M, Green A and Wise A (1999b) GABA(B) Receptors Function As Heterodimers. *Biochem Soc Trans* 27:530-535.

Maruyama T, Ohsaki K, Shimoda S, Kaji Y and Harada M (2005) Thromboxane-Dependent Portopulmonary Hypertension. *Am J Med* 118:93-94.

Masaki T (1995) Possible Role of Endothelin in Endothelial Regulation of Vascular Tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:235-255.

Mathai SC, Girgis R E, Fisher M R, Champion H C, Houston-Harris T, Zaiman A and Hassoun P M (2007) Addition of Sildenafil to Bosentan Monotherapy in Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J* 29:469-475.

Mathieu P, Dupuis J, Carrier M, Cernacek P, Pellerin M, Perrault L P, Cartier R, Taillefer J and Pelletier L C (2001) Pulmonary Metabolism of Endothelin 1 During on-Pump and Beating Heart Coronary Artery Bypass Operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:1137-1142.

Matsumoto H, Suzuki N, Onda H and Fujino M (1989) Abundance of Endothelin-3 in Rat Intestine, Pituitary Gland and Brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164:74-80.

Matsuura T, Miura K, Ebara T, Yukimura T, Yamanaka S, Kim S and Iwao H (1997) Renal Vascular Effects of the Selective Endothelin Receptor Antagonists in Anaesthetized Rats. *Br J Pharmacol* 122:81-86.

Mattocks AR (1968) Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. *Nature* 217:723-728.

Mattocks AR and Jukes R (1990) Trapping and Measurement of Short-Lived Alkylating Agents in a Recirculating Flow System. *Chem Biol Interact* 76:19-30.

Matzura H and Eckstein F (1968) A Polyribonucleotide Containing Alternation P=O and P=S Linkages. *Eur J Biochem* 3:448-452.

McCulloch KM, Docherty C and MacLean M R (1998) Endothelin Receptors Mediating Contraction of Rat and Human Pulmonary Resistance Arteries: Effect of Chronic Hypoxia in the Rat. *Br J Pharmacol* 123:1621-1630.

McCulloch KM and MacLean M R (1995) EndothelinB Receptor-Mediated Contraction of Human and Rat Pulmonary Resistance Arteries and the Effect of Pulmonary Hypertension on Endothelin Responses in the Rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3:S169-S176.

McDaniel NL, Rembold C M and Murphy R A (1994) Cyclic Nucleotide Dependent Relaxation in Vascular Smooth Muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 72:1380-1385.

McHugh J and Cheek D J (1998) Nitric Oxide and Regulation of Vascular Tone: Pharmacological and Physiological Considerations. *Am J Crit Care* 7:131-140.

McLaughlin VV, Oudiz R J, Frost A, Tapson V F, Murali S, Channick R N, Badesch D B, Barst R J, Hsu H H and Rubin L J (2006) Randomized Study of Adding Inhaled Iloprost to Existing Bosentan in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1257-1263.

McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch D B, Barst R J, Black C, Galie N, Rainisio M, Simonneau G and Rubin L J (2005) Survival With First-Line Bosentan in Patients With Primary Pulmonary Hypertension. *Eur Respir J* 25:244-249.

McMurray JJ, Ray S G, Abdullah I, Dargie H J and Morton J J (1992) Plasma Endothelin in Chronic Heart Failure. *Circulation* 85:1374-1379.

McMurtry IF, Davidson A B, Reeves J T and Grover R F (1976) Inhibition of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction by Calcium Antagonists in Isolated Rat Lungs. *Circ Res* 38:99-104.

Mellado M, Rodriguez-Frade J M, Vila-Coro A J, Fernandez S, Martin de A A, Jones D R, Toran J L and Martinez A (2001) Chemokine Receptor Homo- or Heterodimerization Activates Distinct Signaling Pathways. *EMBO J* 20:2497-2507.

Meyrick BO and Reid L M (1982) Crotalaria-Induced Pulmonary Hypertension. Uptake of 3H-Thymidine by the Cells of the Pulmonary Circulation and Alveolar Walls. *Am J Pathol* 106:84-94.

Mickley EJ, Gray G A and Webb D J (1997) Activation of Endothelin ETA Receptors Masks the Constrictor Role of Endothelin ETB Receptors in Rat Isolated Small Mesenteric Arteries. *Br J Pharmacol* 120:1376-1382.

Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N and Dupuis J (2005) Chronically Elevated Endothelin Levels Reduce Pulmonary Vascular Reactivity to Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 171:506-513.

Miller AA, Hislop A A, Vallance P J and Haworth S G (2005) Deletion of the ENOS Gene Has a Greater Impact on the Pulmonary Circulation of Male Than Female Mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L299-L306.

Minkes RK and Kadowitz P J (1989) Differential Effects of Rat Endothelin on Regional Blood Flow in the Cat. *Eur J Pharmacol* 165:161-164.

Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L and Harrington L S (2008) Role of Nitric Oxide and Prostacyclin As Vasoactive Hormones Released by the Endothelium. *Exp Physiol* 93:141-147.

Mitchell JA, Lucas R, Vojnovic I, Hasan K, Pepper J R and Warner T D (2006) Stronger Inhibition by Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs of Cyclooxygenase-1 in Endothelial Cells Than Platelets Offers an Explanation for Increased Risk of Thrombotic Events. *FASEB J* 20:2468-2475.

Mitchell JA and Warner T D (2006) COX Isoforms in the Cardiovascular System: Understanding the Activities of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Nat Rev Drug Discov* 5:75-86.

Miyauchi T, Fujimori A, Maeda S, Iemitsu M, Sakai S, Shikama H, Tanabe T, Matsuda M, Goto K and Yamaguchi I (2004) Chronic Administration of an Endothelin-A Receptor Antagonist Improves Exercise Capacity in Rats With Myocardial Infarction-Induced Congestive Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1:S64-S67.

Miyauchi T, Sugishita Y, Yamaguchi I, Ajisaka R, Tomizawa T, Onizuka M, Matsuda M, Kono I, Yanagisawa M, Goto K and . (1991) Plasma Concentrations of Endothelin-1 and Endothelin-3 Are Altered Differently in Various Pathophysiological Conditions in Humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7:S394-S397.

Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y and Goto K (1993) Contribution of Endogenous Endothelin-1 to the Progression of Cardiopulmonary Alterations in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Circ Res* 73:887-897.

Modesti PA, Vanni S, Paniccia R, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Sani G and Neri Seneri G G (1999) Characterization of Endothelin-1 Receptor Subtypes in Isolated Human Cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:333-339.

Moller S, Adner M and Edvinsson L (1998) Increased Levels of Endothelin ETB Receptor mRNA in Human Omental Arteries After Organ Culture: Quantification by Competitive Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:788-794.

Mombouli JV, Bissiriou I, Agboton V D and Vanhoutte P M (1996) Bioassay of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Biochem Biophys Res Commun* 221:484-488.

Moncada S, Palmer R M and Higgs E A (1991) Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.

Montani D, Souza R, Binkert C, Fischli W, Simonneau G, Clozel M and Humbert M (2007) Endothelin-1/Endothelin-3 Ratio: a Potential Prognostic Factor of Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 131:101-108.

Moreland S, McMullen D, bboa-Offei B and Seymour A (1994) Evidence for a Differential Location of Vasoconstrictor Endothelin Receptors in the Vasculature. *Br J Pharmacol* 112:704-708.

Morrell NW and Wilkins M R (2001) Genetic and Molecular Mechanisms of Pulmonary Hypertension. *Clin Med* 1:138-145.

Mortensen LH and Fink G D (1992) Captopril Prevents Chronic Hypertension Produced by Infusion of Endothelin-1 in Rats. *Hypertension* 19:676-680.

Mostafa T (2008) Oral Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors: Nonerectogenic Beneficial Uses. *J Sex Med*.

Motte S, McEntee K and Naeije R (2006) Endothelin Receptor Antagonists. *Pharmacol Ther* 110:386-414.

Mulder P, Richard V, Bouchart F, Derumeaux G, Munter K and Thuillez C (1998) Selective ETA Receptor Blockade Prevents Left Ventricular Remodeling and Deterioration of Cardiac Function in Experimental Heart Failure. *Cardiovasc Res* 39:600-608.

Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry J P, Lallemand F, Compagnon P, Mace B, Comoy E, Letac B and Thuillez C (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* 96:1976-1982.

Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P and Tougard C (2003) Heterodimerization of Endothelin-Converting Enzyme-1 Isoforms Regulates the Subcellular Distribution of This Metalloprotease. *J Biol Chem* 278:545-555.

Munter K, Ehmke H and Kirchengast M (1999) Maintenance of Blood Pressure in Normotensive Dogs by Endothelin. *Am J Physiol* 276:H1022-H1027.

Murthy KS, Zhou H, Grider J R and Makhlouf G M (2003) Inhibition of Sustained Smooth Muscle Contraction by PKA and PKG Preferentially Mediated by Phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G1006-G1016.

Mylona P and Cleland J G (1999) Update of REACH-1 and MERIT-HF Clinical Trials in Heart Failure. Cardio.Net Editorial Team. *Eur J Heart Fail* 1:197-200.

Nagao T, Illiano S and Vanhoutte P M (1992) Heterogeneous Distribution of Endothelium-Dependent Relaxations Resistant to NG-Nitro-L-Arginine in Rats. *Am J Physiol* 263:H1090-H1094.

Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y and Kido H (1997) Selective Conversion of Big Endothelins to Tracheal Smooth Muscle-Constricting 31-Amino Acid-Length Endothelins by Chymase From Human Mast Cells. *J Immunol* 159:1987-1992.

Nakayama T (2006) Prostacyclin Analogues: Prevention of Cardiovascular Diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4:351-359.

Nakov R, Pfarr E and Eberle S (2002) Darusentan: an Effective EndothelinA Receptor Antagonist for Treatment of Hypertension. *Am J Hypertens* 15:583-589.

Nandi M, Miller A, Stidwill R, Jacques T S, Lam A A, Haworth S, Heales S and Vallance P (2005) Pulmonary Hypertension in a GTP-Cyclohydrolase 1-Deficient Mouse. *Circulation* 111:2086-2090.

Naomi S, Iwaoka T, Disashi T, Inoue J, Kanosaka Y, Tokunaga H and Tomita K (1998) Endothelin-1 Inhibits Endothelin-Converting Enzyme-1 Expression in Cultured Rat Pulmonary Endothelial Cells. *Circulation* 97:234-236.

Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F (1999) Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226.

Newman JH, Wheeler L, Lane K B, Loyd E, Gaddipati R, Phillips J A, III and Loyd J E (2001) Mutation in the Gene for Bone Morphogenetic Protein Receptor II As a Cause of Primary Pulmonary Hypertension in a Large Kindred. *N Engl J Med* 345:319-324.

Neylon CB (1999) Vascular Biology of Endothelin Signal Transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:149-153.

Nguyen PV, Yang X P, Li G, Deng L Y, Fluckiger J P and Schiffrin E L (1993) Contractile Responses and Signal Transduction of Endothelin-1 in Aorta and Mesenteric Vasculature of Adult Spontaneously Hypertensive Rats. *Can J Physiol Pharmacol* 71:473-483.

Nguyen QT, Cernacek P, Calderoni A, Stewart D J, Picard P, Sirois P, White M and Rouleau J L (1998) Endothelin A Receptor Blockade Causes Adverse Left Ventricular Remodeling but Improves Pulmonary Artery Pressure After Infarction in the Rat. *Circulation* 98:2323-2330.

Nishida M, Eshiro K, Okada Y, Takaoka M and Matsumura Y (2004a) Roles of Endothelin ETA and ETB Receptors in the Pathogenesis of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 44:187-191.

Nishida M, Okada Y, Akiyoshi K, Eshiro K, Takaoka M, Gariepy C E, Yanagisawa M and Matsumura Y (2004b) Role of Endothelin ETB Receptor in the Pathogenesis of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Eur J Pharmacol* 496:159-165.

Nishiyama M, Shan L H, Moroi K, Masaki T and Kimura S (1995) Heterogeneity of Endothelin ETA Receptor-Mediated Contractions in the Rabbit Saphenous Vein. *Eur J Pharmacol* 286:209-212.

ntunes-Rodrigues J, Ramalho M J, Reis L C, Picanco-Diniz D W, Favaretto A L, Gutkowska J and McCann S M (1993) Possible Role of Endothelin Acting Within the Hypothalamus to Induce the Release of Atrial Natriuretic Peptide and Natriuresis. *Neuroendocrinology* 58:701-708.

Nussenzveig DR, Lewicki J A and Maack T (1990) Cellular Mechanisms of the Clearance Function of Type C Receptors of Atrial Natriuretic Factor. *J Biol Chem* 265:20952-20958.

Ogletree ML (1987) Overview of Physiological and Pathophysiological Effects of Thromboxane A₂. *Fed Proc* 46:133-138.

Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott J D and Sung C P (1992) The Selective Endothelin ETA Receptor Antagonist BQ123 Antagonizes Endothelin-1-Mediated Mitogenesis. *Eur J Pharmacol* 225:347-350.

Okada M, Nishino M, Saito M, Ikeda T, Uehara S, Okada H, Niiyama K, Ohtake N, Hayama T and Nishikibe M (2000) Marked Reduction of Mortality in Salt-Loaded Dahl Salt-Sensitive Rats by the New, Selective Endothelin ETA Receptor Antagonist, J-105859. *J Hypertens* 18:1815-1823.

Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin L J, Nikkho S, Speich R, Hoepfer M M, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani H A, Manes A, Kiely D G, Ewert R, Meyer A, Corris P A, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H and Seeger W (2002) Inhaled Iloprost for Severe Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 347:322-329.

Omenn GS and McKusick V A (1979) The Association of Waardenburg Syndrome and Hirschsprung Megacolon. *Am J Med Genet* 3:217-223.

Oparil S, Chen S J, Meng Q C, Elton T S, Yano M and Chen Y F (1995) Endothelin-A Receptor Antagonist Prevents Acute Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in the Rat. *Am J Physiol* 268:L95-100.

Overton MC and Blumer K J (2000) G-Protein-Coupled Receptors Function As Oligomers in Vivo. *Curr Biol* 10:341-344.

Overton MC and Blumer K J (2002) The Extracellular N-Terminal Domain and Transmembrane Domains 1 and 2 Mediate Oligomerization of a Yeast G Protein-Coupled Receptor. *J Biol Chem* 277:41463-41472.

Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Fukuroda T, Ishikawa K and Yano M (1995) ETB-Mediated Regulation of Extracellular Levels of Endothelin-1 in Cultured Human Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209:483-489.

Pacher R, Bergler-Klein J, Globits S, Teufelsbauer H, Schuller M, Krauter A, Ogris E, Rodler S, Wutte M and Hartter E (1993) Plasma Big Endothelin-1 Concentrations in Congestive Heart Failure Patients With or Without Systemic Hypertension. *Am J Cardiol* 71:1293-1299.

Palmer RM, Ashton D S and Moncada S (1988) Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide From L-Arginine. *Nature* 333:664-666.

Parisi MA and Kapur R P (2000) Genetics of Hirschsprung Disease. *Curr Opin Pediatr* 12:610-617.

Pechanova O and Simko F (2007) The Role of Nitric Oxide in the Maintenance of Vasoactive Balance. *Physiol Res* 56 Suppl 2:S7-S16.

Peng Y, Amemiya M, Yang X, Fan L, Moe O W, Yin H, Preisig P A, Yanagisawa M and Alpern R J (2001) ET(B) Receptor Activation Causes Exocytic Insertion of NHE3 in OKP Cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F34-F42.

Pepke-Zaba J, Gilbert C, Collings L and Brown M C (2008) Sildenafil Improves Health-Related Quality of Life in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 133:183-189.

Pernow J, Boutier J F, Franco-Cereceda A, Lacroix J S, Matran R and Lundberg J M (1988) Potent Selective Vasoconstrictor Effects of Endothelin in the Pig Kidney in Vivo. *Acta Physiol Scand* 134:573-574.

Petersen B, Deja M, Bartholdy R, Donaubauer B, Laudi S, Francis R C, Boemke W, Kaisers U and Busch T (2008) Inhalation of the ETA Receptor Antagonist LU-135252 Selectively Attenuates Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R601-R605.

Pfeffer MA, Braunwald E, Moye L A, Basta L, Brown E J, Jr., Cuddy T E, Davis B R, Geltman E M, Goldman S, Flaker G C and . (1992) Effect of Captopril on Mortality and Morbidity in Patients With Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement Trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327:669-677.

Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp H J, Hollt V and Schulz S (2001) Homo- and Heterodimerization of Somatostatin Receptor Subtypes. Inactivation of Sst(3) Receptor Function by Heterodimerization With Sst(2A). *J Biol Chem* 276:14027-14036.

Phillips MI and Zhang Y C (2000) Basic Principles of Using Antisense Oligonucleotides in Vivo. *Methods Enzymol* 313:46-56.

Picard P, Smith P J, Monge J C, Rouleau J L, Nguyen Q T, Calderone A and Stewart D J (1998) Coordinated Upregulation of the Cardiac Endothelin System in a Rat Model of Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S294-S297.

Piper PJ and Vane J R (1969) Release of Additional Factors in Anaphylaxis and Its Antagonism by Anti-Inflammatory Drugs. *Nature* 223:29-35.

Polak J, Oakley C M, Yacoub M, Mikhail G and Taylor-Robinson S D (1998) Primary Pulmonary Hypertension: Pathologist As Patient. *J R Coll Physicians Lond* 32:225-230.

Pollock JS, Forstermann U, Mitchell J A, Warner T D, Schmidt H H, Nakane M and Murad F (1991) Purification and Characterization of Particulate Endothelium-Derived Relaxing Factor Synthase From Cultured and Native Bovine Aortic Endothelial Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10480-10484.

Potter GS, Johnson R J and Fink G D (1997) Role of Endothelin in Hypertension of Experimental Chronic Renal Failure. *Hypertension* 30:1578-1584.

Pousset F, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Escolano S, Thomas D and Komajda M (1997) Prognostic Value of Plasma Endothelin-1 in Patients With Chronic Heart Failure. *Eur Heart J* 18:254-258.

Prasad S, Wilkinson J and Gatzoulis M A (2000) Sildenafil in Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 343:1342.

Prefontaine A, Calderone A and Dupuis J (2008) Role of Endothelin Receptors on Basal and Endothelin-1-Stimulated Lung Myofibroblast Proliferation. *Can J Physiol Pharmacol* 86:337-342.

Prie S, Leung T K, Cernacek P, Ryan J W and Dupuis J (1997) The Orally Active ET(A) Receptor Antagonist (+)-(S)-2-(4,6-Dimethoxy-Pyrimidin-2-Yloxy)-3-Methoxy-3,3-Diphenyl-Propionic Acid (LU 135252) Prevents the Development of Pulmonary Hypertension and Endothelial Metabolic Dysfunction in Monocrotaline-Treated Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1312-1318.

Prins BA, Hu R M, Nazario B, Pedram A, Frank H J, Weber M A and Levin E R (1994) Prostaglandin E2 and Prostacyclin Inhibit the Production and Secretion of Endothelin From Cultured Endothelial Cells. *J Biol Chem* 269:11938-11944.

Prinster SC, Hague C and Hall R A (2005) Heterodimerization of G Protein-Coupled Receptors: Specificity and Functional Significance. *Pharmacol Rev* 57:289-298.

Prior HM, Webster N, Quinn K, Beech D J and Yates M S (1998) K(+)-Induced Dilation of a Small Renal Artery: No Role for Inward Rectifier K⁺ Channels. *Cardiovasc Res* 37:780-790.

Puri A, McGoon M D and Kushwaha S S (2007) Pulmonary Arterial Hypertension: Current Therapeutic Strategies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4:319-329.

Rabelink TJ, Kaasjager K A, Boer P, Stroes E G, Braam B and Koomans H A (1994) Effects of Endothelin-1 on Renal Function in Humans: Implications for Physiology and Pathophysiology. *Kidney Int* 46:376-381.

Radomski MW, Palmer R M and Moncada S (1987c) Endogenous Nitric Oxide Inhibits Human Platelet Adhesion to Vascular Endothelium. *Lancet* 2:1057-1058.

- Radomski MW, Palmer R M and Moncada S (1987a) The Anti-Aggregating Properties of Vascular Endothelium: Interactions Between Prostacyclin and Nitric Oxide. *Br J Pharmacol* 92:639-646.
- Radomski MW, Palmer R M and Moncada S (1987b) The Role of Nitric Oxide and CGMP in Platelet Adhesion to Vascular Endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-1489.
- Radomski MW and Salas E (1995) Nitric Oxide--Biological Mediator, Modulator and Factor of Injury: Its Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 118 Suppl:S69-S80.
- Rait VK and Shaw B R (1999) Boranophosphates Support the RNase H Cleavage of Polyribonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9:53-60.
- Ramsay D, Kellett E, McVey M, Rees S and Milligan G (2002) Homo- and Hetero-Oligomeric Interactions Between G-Protein-Coupled Receptors in Living Cells Monitored by Two Variants of Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET): Hetero-Oligomers Between Receptor Subtypes Form More Efficiently Than Between Less Closely Related Sequences. *Biochem J* 365:429-440.
- Reddy PS and Corley R B (1998) Assembly, Sorting, and Exit of Oligomeric Proteins From the Endoplasmic Reticulum. *Bioessays* 20:546-554.
- Remuzzi G, Perico N and Benigni A (2002) New Therapeutics That Antagonize Endothelin: Promises and Frustrations. *Nat Rev Drug Discov* 1:986-1001.
- Resink TJ, Scott-Burden T and Buhler F R (1988) Endothelin Stimulates Phospholipase C in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 157:1360-1368.
- Rich S, Kaufmann E and Levy P S (1992) The Effect of High Doses of Calcium-Channel Blockers on Survival in Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 327:76-81.
- Richard V, Hogie M, Clozel M, Loffler B M and Thuillez C (1995) In Vivo Evidence of an Endothelin-Induced Vasopressor Tone After Inhibition of Nitric Oxide Synthesis in Rats. *Circulation* 91:771-775.

Rimar S and Gillis C N (1992) Differential Uptake of Endothelin-1 by the Coronary and Pulmonary Circulations. *J Appl Physiol* 73:557-562.

Rocheville M, Lange D C, Kumar U, Patel S C, Patel R C and Patel Y C (2000) Receptors for Dopamine and Somatostatin: Formation of Hetero-Oligomers With Enhanced Functional Activity. *Science* 288:154-157.

Rodeheffer RJ, Lerman A, Heublein D M and Burnett J C, Jr. (1992) Increased Plasma Concentrations of Endothelin in Congestive Heart Failure in Humans. *Mayo Clin Proc* 67:719-724.

Rodman DM, McMurtry I F, Peach J L and O'Brien R F (1989) Comparative Pharmacology of Rat and Porcine Endothelin in Rat Aorta and Pulmonary Artery. *Eur J Pharmacol* 165:297-300.

Rosenzweig EB, Widlitz A C and Barst R J (2004) Pulmonary Arterial Hypertension in Children. *Pediatr Pulmonol* 38:2-22.

Rossi GP, Sacchetto A, Rizzoni D, Bova S, Porteri E, Mazzocchi G, Belloni A S, Bahcelioglu M, Nussdorfer G G and Pessina A C (2000) Blockade of Angiotensin II Type 1 Receptor and Not of Endothelin Receptor Prevents Hypertension and Cardiovascular Disease in Transgenic (MREN2)²⁷ Rats Via Adrenocortical Steroid-Independent Mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:949-956.

Rubanyi GM and Polokoff M A (1994) Endothelins: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, Physiology, and Pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46:325-415.

Rubin LJ (1997) Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 336:111-117.

Rubin LJ, Badesch D B, Barst R J, Galie N, Black C M, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M and Simonneau G (2002) Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 346:896-903.

Rubinstein I (2006) Prolonged Anti-Hypertensive Effects of Oral Sitaxsentan, a Selective ET(A) Endothelin Receptor Antagonist, in Spontaneously Hypertensive Hamsters. *Cardiovasc Drugs Ther* 20:387-390.

Russell FD, Skepper J N and Davenport A P (1998b) Evidence Using Immunoelectron Microscopy for Regulated and Constitutive Pathways in the Transport and Release of Endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:424-430.

Russell FD, Skepper J N and Davenport A P (1998a) Human Endothelial Cell Storage Granules: a Novel Intracellular Site for Isoforms of the Endothelin-Converting Enzyme. *Circ Res* 83:314-321.

Saida K, Mitsui Y and Ishida N (1989) A Novel Peptide, Vasoactive Intestinal Contractor, of a New (Endothelin) Peptide Family. Molecular Cloning, Expression, and Biological Activity. *J Biol Chem* 264:14613-14616.

Saito Y, Nakao K, Mukoyama M and Imura H (1990) Increased Plasma Endothelin Level in Patients With Essential Hypertension. *N Engl J Med* 322:205.

Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K and Sugishita Y (1996a) Inhibition of Myocardial Endothelin Pathway Improves Long-Term Survival in Heart Failure. *Nature* 384:353-355.

Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K and Sugishita Y (1996b) Endogenous Endothelin-1 Participates in the Maintenance of Cardiac Function in Rats With Congestive Heart Failure. Marked Increase in Endothelin-1 Production in the Failing Heart. *Circulation* 93:1214-1222.

Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K and Masaki T (1990) Cloning of a cDNA Encoding a Non-Isopeptide-Selective Subtype of the Endothelin Receptor. *Nature* 348:732-735.

Sanders PW (1995) L-Arginine and Arginine Analogs in Progressive Renal Failure. *Blood Purif* 13:219-227.

Sastry BK, Narasimhan C, Reddy N K and Raju B S (2004) Clinical Efficacy of Sildenafil in Primary Pulmonary Hypertension: a Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Crossover Study. *J Am Coll Cardiol* 43:1149-1153.

Sato K, Oka M, Hasunuma K, Ohnishi M, Sato K and Kira S (1995) Effects of Separate and Combined ETA and ETB Blockade on ET-1-Induced Constriction in Perfused Rat Lungs. *Am J Physiol* 269:L668-L672.

Sauvageau S, Thorin E, Caron A and Dupuis J (2007) Endothelin-1-Induced Pulmonary Vasoreactivity Is Regulated by ET(A) and ET(B) Receptor Interactions. *J Vasc Res* 44:375-381.

Sauvageau S, Thorin E, Caron A and Dupuis J (2006) Evaluation of Endothelin-1-Induced Pulmonary Vasoconstriction Following Myocardial Infarction. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:840-846.

Sauvageau S, Thorin E, Villeneuve L and Dupuis J (2008) Endothelin-3-Dependent Pulmonary Vasoconstriction in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Peptides*.

Schermuly RT, Dony E, Ghofrani H A, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai Y J, Weissmann N, Seeger W and Grimminger F (2005) Reversal of Experimental Pulmonary Hypertension by PDGF Inhibition. *J Clin Invest* 115:2811-2821.

Schifffrin EL, Lariviere R, Li J S, Sventek P and Touyz R M (1995) Deoxycorticosterone Acetate Plus Salt Induces Overexpression of Vascular Endothelin-1 and Severe Vascular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 25:769-773.

Schifffrin EL and Thibault G (1991) Plasma Endothelin in Human Essential Hypertension. *Am J Hypertens* 4:303-308.

Schifffrin EL, Turgeon A and Deng L Y (1997) Effect of Chronic ETA-Selective Endothelin Receptor Antagonism on Blood Pressure in Experimental and Genetic Hypertension in Rats. *Br J Pharmacol* 121:935-940.

Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler N G, Struck J, Bergmann A and Muller B (2007) Circulating Precursor Levels of Endothelin-1 and Adrenomedullin, Two Endothelium-Derived, Counteracting Substances, in Sepsis. *Endothelium* 14:345-351.

Schulz R, Nava E and Moncada S (1992) Induction and Potential Biological Relevance of a Ca(2+)-Independent Nitric Oxide Synthase in the Myocardium. *Br J Pharmacol* 105:575-580.

Schulz R, Smith J A, Lewis M J and Moncada S (1991) Nitric Oxide Synthase in Cultured Endocardial Cells of the Pig. *Br J Pharmacol* 104:21-24.

Schweizer A, Valdenaire O, Koster A, Lang Y, Schmitt G, Lenz B, Bluethmann H and Rohrer J (1999) Neonatal Lethality in Mice Deficient in XCE, a Novel Member of the Endothelin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase Family. *J Biol Chem* 274:20450-20456.

Shi SJ, Rakugi H, Higashimori K, Jiang B B, Higaki J, Mikami H and Ogihara T (1994) Augmentation by Converting Enzyme Inhibition of Accelerated Endothelin Release From Rat Mesenteric Arteries Following Nephrectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 202:246-251.

Shi W, Cernacek P, Hu F and Michel R P (1997) Endothelin Reactivity and Receptor Profile of Pulmonary Vessels in Postobstructive Pulmonary Vasculopathy. *Am J Physiol* 273:H2558-H2564.

Shi-Wen X, Denton C P, Dashwood M R, Holmes A M, Bou-Gharios G, Pearson J D, Black C M and Abraham D J (2001) Fibroblast Matrix Gene Expression and Connective Tissue Remodeling: Role of Endothelin-1. *J Invest Dermatol* 116:417-425.

Shiba R, Sakurai T, Yamada G, Morimoto H, Saito A, Masaki T and Goto K (1992) Cloning and Expression of Rat Preproendothelin-3 CDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 186:588-594.

Shimada K, Takahashi M, Ikeda M and Tanzawa K (1995) Identification and Characterization of Two Isoforms of an Endothelin-Converting Enzyme-1. *FEBS Lett* 371:140-144.

Shimoda LA, Sylvester J T and Sham J S (1998) Inhibition of Voltage-Gated K⁺ Current in Rat Intrapulmonary Arterial Myocytes by Endothelin-1. *Am J Physiol* 274:L842-L853.

Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, Sugita Y, Yoshizawa T, Uchiyama Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T and Kanazawa I (1989) Endothelin-3 Is a Novel Neuropeptide: Isolation and Sequence Determination of Endothelin-1 and Endothelin-3 in Porcine Brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164:587-593.

Shirakami G, Nakao K, Saito Y, Magaribuchi T, Jougasaki M, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Suga S, Ogawa Y and . (1991) Acute Pulmonary Alveolar Hypoxia Increases Lung and Plasma Endothelin-1 Levels in Conscious Rats. *Life Sci* 48:969-976.

Simonneau G, Barst R J, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge R C, Keogh A, Oudiz R, Frost A, Blackburn S D, Crow J W and Rubin L J (2002) Continuous Subcutaneous Infusion of Treprostinil, a Prostacyclin Analogue, in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 165:800-804.

Simonson MS and Dunn M J (1992) The Molecular Mechanisms of Cardiovascular and Renal Regulation by Endothelin Peptides. *J Lab Clin Med* 119:622-639.

Sitbon O, Gressin V, Speich R, Macdonald P S, Opravil M, Cooper D A, Fourme T, Humbert M, Delfraissy J F and Simonneau G (2004) Bosentan for the Treatment of Human Immunodeficiency Virus-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1212-1217.

Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid A M, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P and Simonneau G (2005) Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 111:3105-3111.

Smyth EM and FitzGerald G A (2002) Human Prostacyclin Receptor. *Vitam Horm* 65:149-165.

Sokolovsky M (1995) Endothelin Receptor Subtypes and Their Role in Transmembrane Signaling Mechanisms. *Pharmacol Ther* 68:435-471.

Sokolovsky M, Shraga-Levine Z and Galron R (1994) Ligand-Specific Stimulation/Inhibition of CAMP Formation by a Novel Endothelin Receptor Subtype. *Biochemistry* 33:11417-11419.

Spokes RA, Ghatel M A and Bloom S R (1989) Studies With Endothelin-3 and Endothelin-1 on Rat Blood Pressure and Isolated Tissues: Evidence for Multiple Endothelin Receptor Subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5:S191-S192.

Staniloae C, Dupuis J, White M, Gosselin G, Dyrda I, Bois M, Crepeau J, Bonan R, Caron A and Lavoie J (2004) Reduced Pulmonary Clearance of Endothelin in Congestive Heart Failure: a Marker of Secondary Pulmonary Hypertension. *J Card Fail* 10:427-432.

Stenmark KR, Gerasimovskaya E, Nemenoff R A and Das M (2002) Hypoxic Activation of Adventitial Fibroblasts: Role in Vascular Remodeling. *Chest* 122:326S-334S.

Steudel W, Ichinose F, Huang P L, Hurford W E, Jones R C, Bevan J A, Fishman M C and Zapol W M (1997) Pulmonary Vasoconstriction and Hypertension in Mice With Targeted Disruption of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS 3) Gene. *Circ Res* 81:34-41.

Stewart DJ, Levy R D, Cernacek P and Langleben D (1991) Increased Plasma Endothelin-1 in Pulmonary Hypertension: Marker or Mediator of Disease? *Ann Intern Med* 114:464-469.

Suzuki S, Kajikuri J, Suzuki A and Itoh T (1991) Effects of Endothelin-1 on Endothelial Cells in the Porcine Coronary Artery. *Circ Res* 69:1361-1368.

Sweeney M and Yuan J X (2000) Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: Role of Voltage-Gated Potassium Channels. *Respir Res* 1:40-48.

Szabo C and Thiemermann C (1995) Regulation of the Expression of the Inducible Isoform of Nitric Oxide Synthase. *Adv Pharmacol* 34:113-153.

Tack I, Marin C E, Pecher C, Praddaude F, Bascands J L, Bompart G, Ader J L and Girolami J P (1997) Endothelin Increases NO-Dependent CGMP Production in Isolated Glomeruli but Not in Mesangial Cells. *Am J Physiol* 272:F31-F39.

Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y and Tanzawa K (1993) Purification and Characterization of Endothelin-Converting Enzyme From Rat Lung. *J Biol Chem* 268:21394-21398.

Takayanagi R, Kitazumi K, Takasaki C, Ohnaka K, Aimoto S, Tasaka K, Ohashi M and Nawata H (1991) Presence of Non-Selective Type of Endothelin Receptor on Vascular Endothelium and Its Linkage to Vasodilation. *FEBS Lett* 282:103-106.

Taylor DW, Wilson D W, Lame M W, Dunston S D, Jones A D and Segall H J (1997) Comparative Cytotoxicity of Monocrotaline and Its Metabolites in Cultured Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:196-204.

Taylor SG and Weston A H (1988) Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: a New Endogenous Inhibitor From the Vascular Endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 9:272-274.

Teerlink JR (2002) Recent Heart Failure Trials of Neurohormonal Modulation (OVERTURE and ENABLE): Approaching the Asymptote of Efficacy? *J Card Fail* 8:124-127.

Teerlink JR, Carteaux J P, Sprecher U, Loffler B M, Clozel M and Clozel J P (1995) Role of Endogenous Endothelin in Normal Hemodynamic Status of Anesthetized Dogs. *Am J Physiol* 268:H432-H440.

Thomas HC, Lame M W, Dunston S K, Segall H J and Wilson D W (1998a) Monocrotaline Pyrrole Induces Apoptosis in Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 151:236-244.

Thomas HC, Lame M W, Morin D, Wilson D W and Segall H J (1998b) Prolonged Cell-Cycle Arrest Associated With Altered Cdc2 Kinase in Monocrotaline Pyrrole-Treated Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:129-142.

Thomas HC, Lame M W, Wilson D W and Segall H J (1996) Cell Cycle Alterations Associated With Covalent Binding of Monocrotaline Pyrrole to Pulmonary Artery Endothelial Cell DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:319-329.

Thompson A, Valeri C R and Lieberthal W (1995) Endothelin Receptor A Blockade Alters Hemodynamic Response to Nitric Oxide Inhibition in Rats. *Am J Physiol* 269:H743-H748.

Tsai YT, Lin H C, Yang M C, Lee F Y, Hou M C, Chen L S and Lee S D (1995) Plasma Endothelin Levels in Patients With Cirrhosis and Their Relationships to the Severity of Cirrhosis and Renal Function. *J Hepatol* 23:681-688.

Turner AJ and Tanzawa K (1997) Mammalian Membrane Metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 11:355-364.

Uberti MA, Hall R A and Minneman K P (2003) Subtype-Specific Dimerization of Alpha 1-Adrenoceptors: Effects on Receptor Expression and Pharmacological Properties. *Mol Pharmacol* 64:1379-1390.

Uddman E, Adner M and Edvinsson L (2002) Protein Kinase C Inhibitors Decrease Endothelin ET(B) Receptor mRNA Expression and Contraction During Organ Culture of Rat Mesenteric Artery. *Eur J Pharmacol* 452:215-222.

Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C and Michel J B (1999) A Fourth Isoform of Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1) Is Generated From an Additional Promoter Molecular Cloning and Characterization. *Eur J Biochem* 264:341-349.

Vane JR (1971) Inhibition of Prostaglandin Synthesis As a Mechanism of Action for Aspirin-Like Drugs. *Nat New Biol* 231:232-235.

Vane JR, Anggard E E and Botting R M (1990) Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. *N Engl J Med* 323:27-36.

Vanhoutte PM (2001) Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest*. 106 (12): 1521-1530

Vanhoutte PM (2003) Endothelial Control of Vasomotor Function: From Health to Coronary Disease. *Circ J* 67:572-575.

Voelkel NF, Vandivier R W and Tuder R M (2006) Vascular Endothelial Growth Factor in the Lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L209-L221.

Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny P J, Schneider B, Waldhausl W and Binder B R (1992) Polar Secretion of Endothelin-1 by Cultured Endothelial Cells. *J Biol Chem* 267:16066-16068.

Warner TD, de N G and Vane J R (1989a) Rat Endothelin Is a Vasodilator in the Isolated Perfused Mesentery of the Rat. *Eur J Pharmacol* 159:325-326.

Warner TD, Mitchell J A, de N G and Vane J R (1989b) Endothelin-1 and Endothelin-3 Release EDRF From Isolated Perfused Arterial Vessels of the Rat and Rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5:S85-S88.

Weber KT, Anversa P, Armstrong P W, Brilla C G, Burnett J C, Jr., Cruickshank J M, Devereux R B, Giles T D, Korsgaard N, Leier C V and . (1992) Remodeling and Reparation of the Cardiovascular System. *J Am Coll Cardiol* 20:3-16.

Wei CM, Lerman A, Rodeheffer R J, McGregor C G, Brandt R R, Wright S, Heublein D M, Kao P C, Edwards W D and Burnett J C, Jr. (1994) Endothelin in Human Congestive Heart Failure. *Circulation* 89:1580-1586.

WEIBEL ER and PALADE G E (1964) NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. *J Cell Biol* 23:101-112.

Weir EK and Archer S L (1995) The Mechanism of Acute Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: the Tale of Two Channels. *FASEB J* 9:183-189.

White SR, Hathaway D P, Umans J G, Tallet J, Abrahams C and Leff A R (1991) Epithelial Modulation of Airway Smooth Muscle Response to Endothelin-1. *Am Rev Respir Dis* 144:373-378.

Wilkes BM, Ruston A S, Mento P, Girardi E, Hart D, Vander M M, Barnett R and Nord E P (1991) Characterization of Endothelin 1 Receptor and Signal Transduction Mechanisms in Rat Medullary Interstitial Cells. *Am J Physiol* 260:F579-F589.

Wilkins FC, Jr., Alberola A, Mizelle H L, Opgenorth T J and Granger J P (1993) Chronic Pathophysiologic Circulating Endothelin Levels Produce Hypertension in Conscious Dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8:S325-S327.

Wilson DW, Segall H J, Pan L C, Lame M W, Estep J E and Morin D (1992) Mechanisms and Pathology of Monocrotaline Pulmonary Toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22:307-325.

Wing LM, Reid C M, Ryan P, Beilin L J, Brown M A, Jennings G L, Johnston C I, McNeil J J, Macdonald G J, Marley J E, Morgan T O and West M J (2003) A Comparison of Outcomes With Angiotensin-Converting--Enzyme Inhibitors and Diuretics for Hypertension in the Elderly. *N Engl J Med* 348:583-592.

Wolf SC, Smolczyk H, Brehm B R, Erley C M and Risler T (1998) Endothelin-1 and Endothelin-3 Levels in Different Types of Glomerulonephritis. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S482-S485.

Wright CE and Fozard J R (1988) Regional Vasodilation Is a Prominent Feature of the Haemodynamic Response to Endothelin in Anaesthetized, Spontaneously Hypertensive Rats. *Eur J Pharmacol* 155:201-203.

Wypij DM, Nichols J S, Novak P J, Stacy D L, Berman J and Wiseman J S (1992) Role of Mast Cell Chymase in the Extracellular Processing of Big-Endothelin-1 to Endothelin-1 in the Perfused Rat Lung. *Biochem Pharmacol* 43:845-853.

Yanagisawa H, Hammer R E, Richardson J A, Williams S C, Clouthier D E and Yanagisawa M (1998a) Role of Endothelin-1/Endothelin-A Receptor-Mediated Signaling Pathway in the Aortic Arch Patterning in Mice. *J Clin Invest* 102:22-33.

Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur R P, Richardson J A, Williams S C, Clouthier D E, de W D, Emoto N and Hammer R E (1998b) Dual Genetic Pathways of Endothelin-Mediated Intercellular Signaling Revealed by Targeted Disruption of Endothelin Converting Enzyme-1 Gene. *Development* 125:825-836.

Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe T X, Sakakibara S, Goto K and . (1988a) Primary Structure, Synthesis, and Biological Activity of Rat Endothelin, an Endothelium-Derived Vasoconstrictor Peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6964-6967.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T (1988b) A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* 332:411-415.

YNTEMA CL and HAMMOND W S (1954) The Origin of Intrinsic Ganglia of Trunk Viscera From Vagal Neural Crest in the Chick Embryo. *J Comp Neurol* 101:515-541.

Yoneyama T, Hori M, Tanaka T, Matsuda Y and Karaki H (1995) Endothelin ETA and ETB Receptors Facilitating Parasympathetic Neurotransmission in the Rabbit Trachea. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1084-1089.

Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y and Goto K (1993) Altered Expression of ETB-Receptor mRNA in the Lung of Rats With Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8:S336-S338.

Yoshioka S, Fujiwara H, Yamada S, Tatsumi K, Nakayama T, Higuchi T, Inoue T, Maeda M and Fujii S (1998) Endothelin-Converting Enzyme-1 Is Expressed on Human Ovarian Follicles and Corpora Lutea of Menstrual Cycle and Early Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3943-3950.

Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T and Yazaki Y (1989) Hemodynamic Shear Stress Stimulates Endothelin Production by Cultured Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:859-864.

Young HM, Hearn C J, Ciampoli D, Southwell B R, Brunet J F and Newgreen D F (1998) A Single Rostrocaudal Colonization of the Rodent Intestine by Enteric Neuron Precursors Is Revealed by the Expression of Phox2b, Ret, and P75 and by Explants Grown Under the Kidney Capsule or in Organ Culture. *Dev Biol* 202:67-84.

Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A and Yuan J X (2003) PDGF Stimulates Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Upregulating TRPC6 Expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C316-C330.

Yuyama H, Fujimori A, Sanagi M, Koakutsu A, Noguchi Y, Sudoh K, Sasamata M and Miyata K (2005) A Novel and Selective Endothelin ET(A) Receptor Antagonist YM598 Prevents the Development of Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Vascul Pharmacol* 43:40-46.

Yuyama H, Fujimori A, Sanagi M, Koakutsu A, Sudoh K, Sasamata M and Miyata K (2004) The Orally Active Nonpeptide Selective Endothelin ETA Receptor Antagonist YM598 Prevents and Reverses the Development of Pulmonary Hypertension in Monocrotaline-Treated Rats. *Eur J Pharmacol* 496:129-139.

Zamecnik PC and Stephenson M L (1978) Inhibition of Rous Sarcoma Virus Replication and Cell Transformation by a Specific Oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:280-284.

Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M and Bosken C H (1994) Nitric Oxide and the Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 149:1375-1380.

Zhao GQ, Zhang Y, Hoon M A, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba N J and Zuker C S (2003) The Receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste. *Cell* 115:255-266.

Zhou MS, Schulman I H and Raj L (2004) Nitric Oxide, Angiotensin II, and Hypertension. *Semin Nephrol* 24:366-378.

