

2m11.2917.8

Université de Montréal

Influence de l'endothéline-1 sur la régulation de la relaxation du muscle
lisse vasculaire dépendante du GMPc et de l'AMPc.

Présenté par
Patricia Gilbert

Département de physiologie
Faculté de Médecine

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

Juin 2001

© Patricia Gilbert, 2001



W
4
W58
2001
N. 126

Identification du Jury

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Influence de l'endothéline-1 sur la régulation de la relaxation du muscle lisse vasculaire dépendante du GMPc et de l'AMPc.

Présentée par :
Patricia Gilbert

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent Présidente du jury

Éric Thorin Directeur de recherche

Jean St-Louis Membre du jury

SOMMAIRE

L'endothéline-1 (ET-1) est un puissant vasoconstricteur dérivé de l'endothélium. Cependant, le rôle exact de ce peptide dans le contrôle du tonus vasculaire reste peu connu. Bien comprendre les voies d'interaction de l'ET-1 avec le muscle lisse vasculaire pourrait nous aider à élucider certains mécanismes d'actions de ce peptide dans les pathologies associées à une hyper-endothélinémie. Le premier objectif de ce travail a été d'évaluer l'impact de l'ET-1 sur la sensibilité du muscle lisse vasculaire aux facteurs dérivés de l'endothélium et plus particulièrement au NO et ce en conditions physiologiques. Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse que le système de l'ET-1 pourrait moduler la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO dépendant ou non de l'endothélium. Pour ce faire, nous avons utilisé des artères cérébrales de lapin et avons mesuré des changements de tension isométrique à l'aide d'un myographe pour microvaisseaux. Les résultats obtenus indiquent que l'ET-1 dérivé de l'endothélium diminue la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO et aux dérivés nitrés. En effet, l'utilisation du BQ123, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET_A a augmenté la relaxation vasculaire au NO. Il est à noter que cet effet est spécifique pour les récepteurs ET_A puisqu'aucun effet n'est observé en présence de BQ788, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET_B. Nous avons aussi observé que cet effet était

particulier pour le NO puisque les relaxations à l'EDHF et à la forskoline n'ont pas été affectées par le BQ123. De plus, il apparaît que ni les radicaux libres ni la voie de la PKC n'expliquent la régulation de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO par l'ET-1. Nos résultats suggèrent donc que l'ET-1 par un mécanisme dépendant des récepteurs ET_A et indépendant de la PKC diminue la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO.

Le deuxième objectif de ce travail a été d'évaluer l'influence de l'ET-1 sur la relaxation produite par les récepteurs β -adrénergiques au niveau des artères de conduction soit l'aorte de lapin. En effet, l'existence d'interactions entre ces voies est inconnue et pourrait être importante dans la régulation du tonus vasculaire. Nos résultats ont démontré que la pré-contraction des vaisseaux à l'ET-1 augmentait la relaxation maximale du muscle lisse vasculaire à l'isoprotérénol (ISO, agoniste des récepteurs β -adrénergiques) lorsque comparée à la phényléphrine. Cet effet est indépendant de l'endothélium et pourrait être localisé au récepteurs β -adrénergiques/protéine G puisque l'ET-1 n'augmente pas l'effet relaxant de la forskoline. Ce mécanisme d'amplification de la réponse β -adrénergique est indépendant de l'activation de la PKC et d'une interaction entre l'ET-1 et le mécanisme de recyclage des récepteurs β -adrénergiques.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Identification du jury.....	I
Sommaire.....	II
Table des matières.....	IV
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des abréviations.....	X
1- INTRODUCTION.....	1
1.1- Endothélium et tonus vasomoteur.....	1
1.2- Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium	3
1.2.1- Monoxyde d'azote.....	3
1.2.1.1- Découverte.....	3
1.2.1.2- Biosynthèse.....	3
1.2.1.2.1- <i>Agents pharmacologiques</i>	4
1.2.1.2.2- <i>Forces de cisaillement</i>	5
1.2.1.3- Mécanisme d'action.....	6
1.2.1.4- Dérivés nitrés.....	9
1.2.2- Prostacycline.....	12
1.2.3- Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium...	12

	Page
1.3- Facteurs contractants dérivés de l'endothélium.....	15
1.3.1- Thromboxane.....	16
1.3.2- Anions superoxyde.....	17
1.3.3- Endothéline.....	17
1.3.3.1- Découverte.....	17
1.3.3.2- Structure.....	18
1.3.3.3- Biosynthèse.....	18
1.3.3.4- ET-1 en pathologie cardiovasculaire.....	19
1.3.4.5- Mécanisme d'action.....	20
1.4- Facteur relaxant indépendant de l'endothélium.....	25
1.4.1 Agonistes β -adrénergiques.....	25
2-JUSTIFICATION ET BUTS.....	30
3-MÉTHODES.....	32
3.1- Mesure de la réactivité vasculaire.....	32
3.2- Modèle animal.....	33
3.2.1- Protocoles artères cérébrales	33
3.2.2- Protocoles aortes	34
3.3- Analyse des résultats.....	35
4- RÉSULTATS.....	36

	Page
4.1- Endothelium-derived endothelin-1 reduces cerebral artery sensitivity to NO by a PKC independent pathway	37
4.2- Endothelin-1 enhances β -adrenoreceptor-induced vascular relaxation.....	66
5- DISCUSSION	95
5.1- Relation ET-1/GMPc et ET-1/AMPC.....	95
5.1.1- Relation ET-1/GMPC.....	95
5.1.2- Relation ET-1/AMPC.....	99
5.2-Significations physiologiques.....	103
5.3-Pertinences et limites du modèle expérimental.....	105
6- CONCLUSION	107
7- RÉFÉRENCES	108

LISTE DES TABLEAUX

Article 1: ENDOTHELIUM DERIVED-ENDOTHELLIN-1 REDUCES CEREBRAL ARTERY SENSITIVITY TO NO BY A PKC-INDEPENDENT PATHWAY :

Tableau I : pD₂ values and maximal relaxation (%) to acetylcholine of vessels with endothelium pre-contracted with 40 mM K⁺ or L-NNA (100 μM; + L-NNA). Experiments were performed in the presence of BQ123 or BQ788 at concentrations of 5 μM and of chelerythrine (1 μM). **P.58.**

Tableau II : pD₂ values and maximal relaxation (%) to SNP of vessels with or without endothelium pre-constricted by high external K⁺ (40 mM KCl). **P.59.**

Article 2: ENDOTHELIN-1 ENHANCES β-ADRENOCEPTOR-INDUCED VASCULAR RELAXATION:

Tableau I : pD₂ values and maximal relaxation (%) to ISO of aortic rings with or without endothelium pre-constricted with PHE (30 μM) or ET-1 (30 nM). Experiments were performed in the presence of chelerythrine (1μM) and cyclosporine A (10 μM). **P.90.**

Tableau II: pD₂ values and maximal relaxation (%) to FSK of vessels without endothelium pre-constricted with PHE (30 μM) or ET-1 (30 nM). Experiments were performed in the absence and in the presence of chelerythrine (1 μM). **P.91.**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes de la relaxation de la cellule musculaire lisse par le NO à partir de signaux perçus par l'endothélium. **P.11.**

Figure 2 : Synthèse et mécanisme d'action de l'endothéline. **P.24.**

Figure 3 : Mécanisme de la relaxation induite par les récepteur β_2 adrénergiques. **P.29.**

Article : ENDOTHELIUM DERIVED-ENDOTHELLIN-1 REDUCES CEREBRAL ARTERY SENSITIVITY TO NO BY A PKC-INDEPENDENT PATHWAY :

Figure 1 : Influence of ET-1 receptor inhibition on cerebral artery reactivity to ACH. **P.62.**

Figure 2 : Influence of ET-1 receptor inhibition on cerebral artery reactivity to SNP. **P.63.**

Figure 3 : Influence of ET_A receptor inhibition on cerebral artery reactivity to a K⁺sensitive endothelium-derived relaxing factor ("EDHF") released by ACH. **P.64.**

Figure 4 : . Influence of the endothelium on cerebral artery reactivity to sodium nitroprusside (SNP). **P.65.**

Article 2: ENDOTHELIN-1 ENHANCES β -ADRENOCEPTOR-INDUCED VASCULAR RELAXATION:

Figure 1: Influence of ET-1-induced precontraction on the reactivity to ISO of aortic rings. **P.93.**

Figure 2: Influence of ET-1-induced pre-contraction on the reactivity to forskolin of aortic rings. **P.94.**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α_2 : récepteur alpha 2 adrénergique
 α -AR: récepteur α -adrénergique
 β -AR: récepteur β -adrénergique
5-HT: sérotonine
a.a.: acide aminé
AC : adénylate cyclase
ACH: acétylcholine
ADP: adénosine diphosphate
ANF: facteur natriurétique auriculaire
ARN: acide ribonucléique
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
ATP: adénosine triphosphate
BK: bradykinine
BK₂: récepteur de la bradykinine
BQ123: antagoniste sélectif des récepteur ET_A de l'endothéline-1
BQ788: antagoniste sélectif des récepteur ET_B de l'endothéline-1
DAG: diacylglycérol
ECE: enzyme de conversion de l'endothéline-1
EDHF: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF: facteur relaxant dérivé de l'endothélium
EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique
EET: acide épixéicosatriénoïque
ET-1: endothéline-1
ET-2: endothéline-2
ET-3: endothéline-3
ET_A, ET_B: récepteur de l'endothéline-1
FSK: forskoline
GCs: guanylate cyclase soluble
G_i: protéine de couplage de type i
GMPc: guanidine monophosphate cyclique
G_q: protéine de couplage de type q
G_s: protéine de couplage de type s
H₂: dihydrogène
IMA: artère mammaire interne
IP₃: inositol tris-phosphate
ISO: isoprénaline ou isoprotérénol
L-NAME: N^o-nitro-L-arginine-méthyl ester
L-NMMA: N^o-monométhyl-L-arginine
L-NNA: N^o-nitro-L-arginine
M₁, M₂: récepteurs muscariniques
MLC : chaîne légère de la myosine
MLCK: kinase de la chaîne légère de la myosine
Mx: mécanorécepteur

NA : noradrénaline
NO: monoxyde d'azote
NOS: NO synthase
NOS II : NO synthase II
NOS III : NO synthase III
P_{2y} : récepteur purinergique
PC : pompe calcique
PHE: phényléphrine
PGI₂: prostacycline
PIP₂: phosphatidyl inositol biphosphate
PKA: protéine kinase A
PKC: protéine kinase C
PKG: protéine kinase G
PLB : phospholambane
PLC : phospholipase C
PSS: solution physiologique saline
SERCA: Ca²⁺ ATPase du réticulum endo sarcoplasmique
SHR : rat spontanément hypertendu
SNA : système nerveux autonome
SNP: sodium nitroprussiate
SOD: superoxyde dismutase
R_{β2} : récepteur β₂-adrénergique
RIA: radioimmunoessai
RS : réticulum sarcoplasmique
TGF_β:tumor growth factor β
TFA: acide trifluoroacétique
TXA₂ :thromboxane A₂

1- INTRODUCTION

1.1 Endothélium et tonus vasculaire

L'endothélium vasculaire se présente sous la forme d'une monocouche cellulaire qui tapisse la face interne de tous les vaisseaux sanguins. Il occupe ainsi une position privilégiée entre la paroi vasculaire et le sang et joue un rôle fondamental dans le contrôle du tonus vasculaire. L'endothélium possède en effet une double fonction soit de "récepteur" de nombreux stimuli chimiques (catécholamines, vasopressine, pression partielle en oxygène, produits d'activation des plaquettes, ...) ou mécaniques (forces de cisaillement), mais aussi un rôle de synthèse de substances vasodilatatrices (prostacycline, monoxyde d'azote, adénosine, facteur hyperpolarisant,...) ou vasoconstrictrices (thromboxane A₂, endothéline, ...) qui vont finalement moduler l'état d'activation de la cellule musculaire lisse donc le tonus vasculaire. C'est ce tonus qui, diffus, va définir le niveau de résistance périphérique, et qui, localement va distribuer le débit cardiaque en fonction de l'activité métabolique des différents organes. En d'autres termes, la résistance périphérique et le volume de sang éjecté sont des déterminants de la pression artérielle. Cette pression est la force par unité de surface que le sang exerce sur la paroi d'un vaisseau. Les différences de pressions

dans le système vasculaire fournissent la force propulsive nécessaire à la circulation du sang dans l'organisme. Outre les facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium, d'autres éléments interviennent dans la régulation du tonus vasculaire, notamment les catécholamines. En effet, dépendant du récepteur activé sur le muscle lisse vasculaire, la noradrénaline induit une vasorelaxation (récepteur β -adrénergique et α_2 endothéliaux) ou une vasoconstriction (récepteur α_1 -adrénergique). Il existe donc à l'état basal, un équilibre entre les nombreux facteurs relaxants et contractants libérés par l'endothélium ainsi que le tonus sympathique qui détermine le degré de dilatation ou de contraction des différents vaisseaux.

Parmi les différentes substances sécrétées par l'endothélium, les facteurs relaxants jouent un rôle très important dans la régulation du tonus vasculaire.

1.2 Facteurs relaxants dépendant de l'endothélium

1.2.1 Monoxyde d'azote

1.2.1.1 Découverte

La découverte de l'EDRF (endothelium-derived relaxing factor ou facteur relaxant dérivé de l'endothélium) remonte à 1980, lorsque Furchgott et Zawadzki ¹ démontrèrent que l'acétylcholine provoquait une vasorelaxation dépendante de l'endothélium par l'intermédiaire d'un facteur diffusible différent de la prostacycline. Il fallu cependant attendre 1987 pour que la structure chimique de ce facteur soit enfin connue ². Ce groupe identifia l'EDRF comme étant le monoxyde d'azote (NO).

1.2.1.2. Biosynthèse

Le monoxyde d'azote (NO) est produit au cours de la transformation de la L-arginine en L-citruline par la NO synthase III, enzyme constitutive des cellules endothéliales, sensible au complexe calcium/calmoduline et phosphorylable ³. Il existe trois isoformes de la NO synthase. La forme neuronale ou NOS I, constitutive, activée par le calcium, produit du NO dans les axones non-adrénergiques, non cholinergiques du système nerveux autonome ^{4, 5}. La NOS II est dite inductible; son activité est dépendante de son niveau d'expression et non du niveau de calcium

intracellulaire. Cette expression est induite par les cytokines proinflammatoires dans les macrophages mais également dans les cellules vasculaires ^{6, 7}. Finalement, la NOS III est constitutivement exprimée dans l'endothélium. Une attention plus particulière sera portée sur la NOS endothéliale.

L'activité de la NO synthase est inhibée par des arginines substituées sur leur groupement amino guanidine tels que la N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), la N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) ou la N^ω-nitro-L-arginine (LNNA) ^{3, 9}. Deux grands types de signaux sont capables d'activer la NOS endothéliale: des agents pharmacologiques couplés à la voie des inositol phosphates dans la cellule endothéliale et les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur l'endothélium.

1.2.1.2.1 Agents pharmacologiques

Plusieurs médiateurs neurohormonaux provoquent la libération de NO, dépendant de l'activation de récepteurs endothéliaux spécifiques. Les substances endogènes stimulant cette libération sont: des hormones circulantes (catécholamines, vasopressine), des autacoïdes générés dans la paroi vasculaire (bradykinine, histamine), des médiateurs libérés par les plaquettes (sérotonine, adénosine-diphosphate (ADP), et des substances

formées pendant la coagulation (thrombine). Les récepteurs de ces substances sont couplés à différentes protéines G. La toxine de la coqueluche (« pertussis toxin ») a révélé deux voies différentes pour les relaxation dépendantes de l'endothélium engendrée par le NO: sensibles aux toxines (G_i) et non sensibles (G_q). Dans les cellules endothéliales de porc, les récepteurs α_2 adrénergiques, les récepteurs sérotoninergiques, et les récepteurs thrombinergiques sont couplés aux protéines G_i sensibles à la toxine de la coqueluche. Ces récepteurs permettent une inhibition de l'adénylate cyclase qui empêche la formation de l'AMPc au niveau de la cellule endothéliale et par conséquent favorise la vasoconstriction. Au contraire l'acétylcholine (ACH) et ses récepteurs muscariniques (M_2), la bradykinine et ses récepteurs B_2 , l'endothéline et ses récepteurs ET_B , et les récepteurs à l'ADP sont couplés à une protéine G de type G_q insensible à la toxine de la coqueluche qui couplée à la phospholipase C augmentera les niveau de Ca^{2+} intracellulaire.^{11,12}. Donc, suite à l'activation de tous ces récepteurs il en résulte une augmentation du calcium intracellulaire qui, couplé à la calmoduline va permettre l'activation de la NOS endothéliale et la synthèse de NO (Figure 1, p. 11).

1.2.1.2.2 Forces de cisaillement

L'accroissement des forces de cisaillement dans les vaisseaux sanguins aussi appelées «shear stress» résulte de l'écoulement du sang dans les vaisseaux ce qui entraîne immédiatement l'étirement ou la déformation des cellules endothéliales et la stimulation des mécanorécepteurs. L'activation de ces derniers stimule alors l'entrée de calcium dans la cellule endothéliale par des canaux calciques qui résulte en la synthèse et la libération de NO par la voie de la NO synthase¹³. L'augmentation du diamètre vasculaire qui accompagne l'action du NO est suffisante pour ramener les forces de cisaillement à leur valeur basale, montrant ainsi que le phénomène de «shear stress» est un véritable système d'autorégulation ayant pour but de maintenir constantes les forces de cisaillement s'exerçant à la surface des cellules endothéliales. Ce phénomène d'autorégulation s'observe plus particulièrement dans les artères de conduction.

1.2.1.3 Mécanismes d'action

L'action du NO est purement locale car sa demi-vie est très courte, de l'ordre de 5 à 6 secondes. Il est en effet inactivé rapidement par les anions superoxydes qu'il neutralise. Le NO est libéré aux 2 pôles de la cellule endothéliale et agit de manière paracrine. Au pôle basal, il diffuse vers les cellules musculaires lisses vasculaires, et entraîne une vasorelaxation. Au pôle apical le NO diffuse dans la lumière vasculaire.

Malgré la courte demi-vie plasmatique, il prévient l'aggrégation plaquettaire à proximité de la paroi endothéliale ¹⁴.

La vasorelaxation produite par le NO se fait par l'activation de la guanylate cyclase soluble, une hème protéine bicatenaire, qui est présente dans le cytosol des cellules musculaires lisses ¹⁵. Le NO, en se liant à son radical héminique, va activer la production de GMPc ¹⁶. La liaison NO-guanylate cyclase est bloquée par l'hémoglobine dont le radical héminique lie le NO, et par le bleu de méthylène qui se lie à l'hème de la guanylate cyclase ¹⁷. Une fois formé, le GMPc va se lier à la protéine kinase G (PKG) dans le muscle lisse vasculaire ¹⁸. La PKG est majoritairement responsable de la relaxation en phosphorylant le phospholambane couplé à la SERCA (Ca²⁺ ATPase du réticulum endo sarcoplasmique), une calcium ATPase ^{19, 20}. Non phosphorylés, les phospholambanes se lient à la calcium ATPase dont ils inhibent l'activité de repompage du calcium vers le réticulum sarcoplasmique; lorsqu'ils sont phosphorylés, ils induisent une augmentation de l'activité de la calcium ATPase, diminuant ainsi le taux de calcium libre intracytosolique ¹¹⁴. D'autres études ont démontré que le NO pouvait avoir un effet direct sur les canaux calciques de type L, notamment en inhibant le courant calcique par un mécanisme dépendant de la GMPc ²¹, ou de façon indirecte en hyperpolarisant la cellule par l'activation des canaux potassiques dépendants de la PKG. Cette hyperpolarisation entraîne la

fermeture des canaux calciques dépendants du voltage et réduit par le fait même la concentration intracellulaire de calcium^{22, 23}. D'autres part, des études sur des cellules musculaire lisses en culture ont démontré que le GMPc pouvait stimuler l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ abaissant ainsi le calcium intracellulaire²⁴. L'action vasodilatatrice du NO est donc le résultat d'une augmentation de la concentration de GMP cyclique intracellulaire¹⁶. Ainsi, les forces de cisaillement et les agonistes vasodilatateurs dépendants de l'endothélium sont responsables d'une relaxation de la cellule musculaire lisse engendrée par le NO et relayée dans la cellule musculaire lisse par une augmentation de GMPc qui conduit à un abaissement des niveaux de calcium intracellulaire (Figure 1, p.11)

Des études ont mis en évidence l'implication du NO dans le maintien du tonus vasculaire. En effet, l'administration d'un analogue de la L-arginine²⁵ dans la plupart des territoires vasculaires s'accompagne d'une vasoconstriction et une baisse du débit. En effet, lorsque l'inhibiteur est administré dans la circulation générale, la pression artérielle s'élève immédiatement²⁶. Des animaux traités de façon chronique par le L-NAME développent une hypertension artérielle systémique associée à une diminution de la concentration de GMPc dans la paroi vasculaire²⁷. Chez l'homme, l'administration intra-vasculaire de L-NMA à faible dose est suivie d'une réduction du débit de l'avant-bras sans modification de la pression artérielle²⁸. Ces résultats suggèrent donc une libération

continue du monoxyde d'azote participant à la définition du tonus vasculaire basal.

1.2.1.4 Dérivés nitrés

Les nitrates sont des substances de premier choix dans le traitement des différentes formes cliniques de cardiopathie ischémique, notamment dans le traitement de l'angine et l'infarctus du myocarde au cours de la phase aiguë. Il est à noter que les dérivés nitrés (nitrates organiques de type nitroglycérine, dinitrate et mononitrate d'isorbide) et les donneurs de NO de type nitroprussiate de sodium (SNP) sont des équivalents exogène de NO. Pour exercer leur action relaxante sur le muscle lisse de la paroi vasculaire, les nitrates doivent au préalable être transformés en radicaux NO actifs ou en S-nitrosothiols, qui activeront l'enzyme guanylate cyclase soluble de la cellule musculaire lisse augmentant ainsi la production de GMPc. Cependant, l'utilisation chronique des nitrates est limitée par l'apparition d'un phénomène de tolérance qui se manifeste après 48 heures de traitement continue par une atténuation, à même dose, de l'efficacité hémodynamique des nitrates; pour que l'effet persiste, il faut avoir recours à des doses toujours plus élevées^{29, 30} ou interrompre la thérapie une semaine sur deux.

La tolérance est un processus multifactoriel dont les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés³¹. Les hypothèses proposées

sont la réduction de la biotransformation des nitrates en radicaux NO actifs ³², la désensibilisation de la guanylate soluble ³³, la mise en marche de mécanismes neurohormonaux de contre-régulation notamment une augmentation des catécholamines, du système rénine-angiotensine ^{34, 35} et l'augmentation des niveaux tissulaires d'endothéline ³⁶.

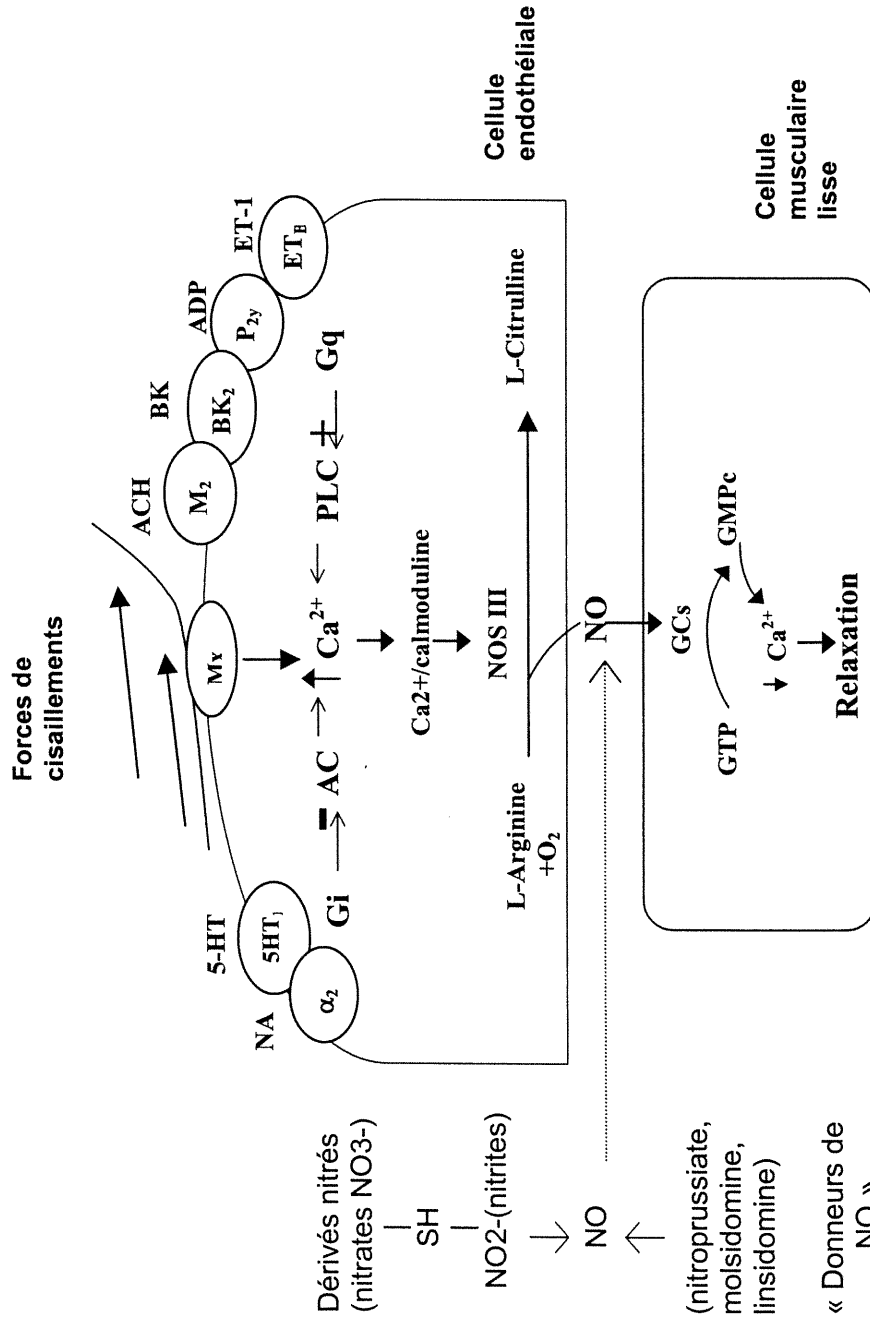


Figure 1. Mécanismes de la relaxation de la cellule musculaire lisse par le NO à partir de signaux perçus par l'endothélium.

Alpha 2= récepteur alpha-2 adrénérgique; NA=noradrénaline; ADP=adénosine disphosphate; BK=bradykinine; BK₂=récepteur bradykinine; G_i, G_q=protéine de couplage; M₂; récepteur muscarinique; ACH=acétylcholine; M_x=mécanorécepteur; P_{2y}=récepteur purinergique; ET_A=récepteur de l'endothéline; ET-1=endothéline; AC=adénylate cyclase; PLC=Phospholipase C; NO= monoxyde d'azote; NOS II= NO synthase de type II; GCs=guanylate cyclase soluble; GMPC =GMP cyclique.

1.2.2 Prostacycline

La prostacycline (PGI_2), découverte en 1976³⁷ est une substance vasodilatatrice et antiagrégante dérivée de l'acide arachidonique qui est synthétisée par les cellules endothéliales suite à l'action de la phospholipase A_2 , de la cyclo-oxygénase et de la prostacycline synthase. Tout comme le NO, sa libération dépend principalement de la mobilisation des ions Ca^{2+} intracellulaires afin d'activer la cyclo-oxygénase³⁸. La prostacycline provoque la relaxation du muscle lisse vasculaire en activant son récepteur, qui couplé à une protéine G de type Gs va stimuler l'adénylate cyclase et augmenter la production d'AMPc. Dans la plupart des vaisseaux sanguins la contribution de la prostacycline dans la relaxation dépendante de l'endothélium est négligeable, et son effet s'ajoute essentiellement à celui du NO. Les deux substances agissent en synergie pour inhiber l'aggrégation plaquettaire³⁹.

1.2.3 Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Outre le NO et la prostacycline, un troisième facteur vasodilatateur dépendant de l'endothélium est le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) qui engendre une hyperpolarisation du muscle lisse

vasculaire permettant la relaxation. L'hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire induit une relaxation par la réduction de la probabilité d'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants qui entraîne une diminution de l'influx calcique et l'abaissement des niveaux de calcium intracellulaire⁴⁰. Nishiye et al.⁴¹ ont démontré que l'acétylcholine pouvait induire non seulement une relaxation dépendante du NO mais pouvait aussi engendrer une hyperpolarisation suivie d'un relâchement du muscle lisse vasculaire lequel n'était pas affecté par des inhibiteurs de la NO synthase et de la cyclooxygénase sur l'artère basilaire de cobaye. Komori⁴² et Keef⁴³ ont démontré que le récepteur muscarinique impliqué était différent pour la relaxation dépendante de l'EDHF et du NO. En effet, l'acétylcholine produit une hyperpolarisation en activant son récepteur muscarinique M₁ situé sur l'endothélium alors que pour produire une relaxation dépendant du NO l'acétylcholine active le récepteur M₂ endothélial. En fait, plusieurs études ont défini l'activité de l'EDHF comme étant une réponse relaxante à plusieurs agonistes (Ach, bradykinine, substance P) qui active leurs récepteurs respectifs situés sur la cellule endothéliale en présence d'inhibiteur de la NO synthase et de la cyclooxygénase. La réponse relaxante induite par l'EDHF a aussi été démontrée sur des artères cérébrales humaines⁴⁴.

La nature du facteur hyperpolarisant est encore controversée et il semble que plusieurs EDHF peuvent exister⁴⁵. Cependant des études

récentes ont suggère que l'acide épixyéicosatriénoïque (EET), formés à partir de l'acide arachidonique par l'action du cytochrome P450 pouvait correspondre à l'EDHF. En effet, la présence d'inhibiteurs du cytochrome P450 contrecarre les réponses relaxantes engendrées par l'EDHF ⁴⁶⁻⁴⁸. Par contre, d'autres études ne semblent pas impliquer le cytochrome P450 dans la synthèse de l'EDHF notamment dans les artères carotides de cobaye, les artères mésentériques et rénales de rat et les artères hépatiques de rat ⁴⁹⁻⁵². Ceci suggère que le métabolite du cytochrome P450 n'est pas le seul facteur à mimer l'action de l'EDHF.

L'EDHF semble agir sur le muscle lisse vasculaire en stimulant l'ouverture de canaux potassiques ⁴⁵. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de canaux potassiques tels que la charybdotoxine et le tétraéthylammonium inhibent la relaxation dépendante de l'EDHF ^{45, 55}. De plus l'hyperpolarisation induit par l'ACH est inversement proportionnelle à la concentration extracellulaire en ion potassiques et est absente lorsque la concentration potassique extracellulaire est plus élevée que 25 mM KCl ^{49, 53, 54}. Cependant, l'identité de ces canaux reste encore à élucider ^{55, 56} et varie selon le tissu et l'animal choisis. Des études ont suggéré que l'EDHF pouvait activer la pompe Na^+/K^+ ATPase au niveau des artères rénales de cobaye et des artères coronaires de chien ^{57, 58}. En effet, l'utilisation de la oubaine, un inhibiteur de la pompe Na^+/K^+ ATPase réduit la relaxation du muscle lisse vasculaire à l'EDHF ⁵⁸. D'autres études ont

impliqué le canal potassique sensible à l'ATP au niveau des artères cérébrales de lapin^{59, 60} et d'aorte de rat. Chez d'autres espèces, la réponse attribuée à l'EDHF est inhibée par l'apamine suggérant l'implication du canal potassique dépendant du Ca^{2+} ^{61, 62}. Donc, il semble que la nature et l'activité de l'EDHF varie d'un tissu vasculaire et d'une espèce à l'autre.

Outre les facteurs vasodilatateurs dérivés de l'endothélium, les facteurs vasoconstricteurs semble aussi jouer un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire .

1.3 Facteurs contractants dépendant de l'endothélium

Les facteurs endothéliaux contractants comprennent les prostanoïdes tels que le thromboxane A2, les anions superoxide et l'endothéline. Cependant, une attention plus particulière est ici accordée à l'endothéline.

1.3.1 Thromboxane A₂

Le thromboxane A₂ (TXA₂) est formé à partir de l'acide arachidonique par la voie de la cyclo-oxygénase. Il interagit avec son récepteur membranaire situé sur la cellule musculaire lisse qui couplé à une protéine G de type Gq permet la formation de la phospholipase C et déclenche ainsi l'ensemble de la cascade d'évènements intra-cellulaires qui contribuent à l'augmentation de calcium dans la cellule permettant la vasoconstriction⁶³. Dans de nombreux vaisseaux, l'acide arachidonique ou même l'acétylcholine, peuvent causer des contractions dépendantes de la présence de l'endothélium et qui sont antagonisées par les inhibiteurs de la cyclooxygénase. Cependant, peu de stimulations physiologiques causent des contractions dépendantes de l'endothélium et sensibles aux inhibiteurs de la cyclooxygénase. L'action de la TXA₂ semble plus importante dans l'aggrégation plaquettaire. En effet, lorsque les plaquettes deviennent actives, celles-ci produisent du TXA₂ qui renforce l'activation des plaquettes qui l'ont formé et qui agit sur les plaquettes non encore stimulées, situées à proximité⁶⁴.

1.3.2 Anions Superoxydes

L'activation de la voie des cyclo-oxygénases facilite non seulement la formation de prostaglandines et de thromboxanes, mais aussi celles de radicaux libres. L'enzyme synthétisant la prostaglandine H2 possède de plus une activité hydroperoxydase qui entraîne la formation d'anions superoxydes. Ces radicaux entraînent la contraction des vaisseaux sanguins en éliminant le NO. En effet, le monoxyde d'azote, qui interagit avec l'anion superoxyde, forme une molécule très réactive appelé le peroxynitrite (ONOO⁻) qui piège le NO et le rend peu actif ⁶⁵.

1.3.3 Endothéline

1.3.3.1 Découverte

En 1988, Yanagisawa et son groupe ont identifié à partir de cellules endothéliales aortiques porcines, une hormone vasoconstrictrice, sécrétée par l'endothélium, qu'ils nomment l'endothéline ⁶⁶. Il s'agit de la substance vasoconstrictrice la plus puissante connue à l'heure actuelle (10 fois plus puissante que l'angiotensine ou l'arginine vasopressine).

1.3.3.2 Structure

L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés (a.a) avec un poids moléculaire de 2,49 kDa et qui possède quatre résidus cystéine formant 2 ponts disulfure à l'intérieur de la chaîne d'a.a⁶⁷. Elle présente une analogie de structure avec les sarafotoxines^{68, 69}, puissants venins de serpent, mortels du fait de la vasoconstriction intense qu'ils induisent. L'endothéline appartient à une famille comprenant trois isoformes⁶⁹. L'endothéline-1 (ET-1) est la mieux connue des 3 formes et représente l'endothéline de source endothéliale. L'ET-2 est la moins connue et joue peut-être un rôle dans la fonction intestinale⁷⁰. L'ET-3 enfin, est présente dans le cerveau⁷¹. L'expression de ces 3 isoformes est sous le contrôle de 3 gènes différents⁶⁹ codant pour un précurseur spécifique. Les gènes de l'ET-1, ET-2 et ET-3 sont situés respectivement sur les chromosomes 6, 1 et 20 .

1.3.3.3 Biosynthèse

La synthèse des endothélines sera détaillée pour l'ET-1 seulement. L'ET-1 est synthétisée *in situ* dans la cellule endothéliale⁶⁶. Le produit initial du gène de l'ET-1 est une préproendothéline, un peptide constitué de 212 a.a. La préproendothéline est clivée par une endopeptidase en proendothéline, peptide de 38 a.a également appelé « big » endothéline⁶⁶. La transformation de la « big » endothéline en ET-1 se fait par clivage à l'aide d'une métalloprotéase, soit l'enzyme de conversion de

l'endothéline (ECE) ⁷². L'ECE est inhibée par le phosphoramidon, un antagoniste non sélectif de l'ECE car il inhibe d'autres métalloprotéases ⁷³. Une fois synthétisée, l'ET-1 va être sécrétée de façon prédominante au pôle basal de la cellule endothéliale ⁷⁴. L'action de l'hormone est locale sur les cellules musculaires lisses adjacentes puisque la concentration circulante n'est pas suffisante pour induire une vasoconstriction directe ⁷⁵. L'ET-1 ressemble donc plutôt à un médiateur paracrin plutôt qu'à une hormone endocrine. La demi-vie de l'ET-1 dans le sang est courte, inférieure à 5 minutes, avec un métabolisme lié à la fois à l'internalisation du complexe récepteur-ET-1 et à une clairance pulmonaire ⁷⁶.

L'expression de l'ARN messenger et la sécrétion de l'ET-1 sont augmentées par de nombreux facteurs comprenant le calcium, la thrombine, le TGF β , l'hypoxie et certaines hormones (adrénaline, angiotensine II, vasopressine), etc. ⁷⁷. A l'inverse, une inhibition de la sécrétion d'ET-1 est obtenue avec des substances vasodilatatrices, comme le facteur natriurétique auriculaire (ANF), la prostacycline ou le NO ^{78, 79}.

1.3.3.4 ET-1 en pathologie cardiovasculaire

En temps normal, les concentrations plasmatiques d'ET-1 sont faibles. Chez l'homme la concentration plasmatique artérielle est environ

de 0.9 pmol/L. Cependant, la concentration d'ET-1 au niveau plasmatique et au niveau tissulaire augmente de façon majeure dans certaines conditions pathologiques comme l'hypertension artérielle ⁸⁰, l'athérosclérose ⁸¹, l'infarctus du myocarde ⁸², l'insuffisance cardiaque ⁸³, la tolérance aux nitrates ³⁶ et le vasospasme cérébrale ⁸⁴. Différents mécanismes peuvent expliquer son rôle dans les pathologies cardiovasculaires. Elle possède un effet vasoconstricteur direct, et un effet indirect suite à l'augmentation du tonus sympathique qui est consécutive à une diminution de la fréquence et du débit cardiaque ^{85, 86}. Elle potentialise la contraction musculaire lisse à différents vasoconstricteurs (angiotensine II, noradrénaline, arginine vasopressine, sérotonine) ⁸⁷. De plus, elle possède un effet mitogénique, augmentant la prolifération cellulaire et responsable d'une hypertrophie vasculaire et myocardique ⁸⁸.

1.3.3.5 Mécanisme d'action

L'ET-1 possède 2 types de récepteurs, les récepteurs ET_A et ET_B ⁷¹ qui présentent entre eux une homologie de structure de l'ordre de 60%. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G de type Gq. Au niveau vasculaire, le récepteur ET_A est exprimé de façon prédominante sur les cellules musculaires lisses ⁸⁹ tandis que le récepteur ET_B est exprimé à la fois sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ⁹⁰. L'effet principal de la stimulation des récepteurs ET_A est une

vasoconstriction quelque soit le territoire vasculaire ⁶⁶. La stimulation des récepteurs ET_B endothéliaux induit une vasodilatation qui est liée à la libération du NO et de prostacycline par les cellules endothéliales ⁹⁰, tandis que la stimulation des récepteurs ET_B des cellules musculaires lisses induisent une vasoconstriction ⁹¹. La fixation de l'ET-1 sur son récepteur stimule de nombreux mécanismes de transduction transmembranaire, dont le principal est une stimulation de la phospholipase C ⁹². L'activation de la phospholipase C permet la formation de deux seconds messagers: l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) et le diacyl glycérol (DAG). Ce dernier active la protéine kinase C (PKC) alors que le premier se lie sur ses récepteurs situés sur le réticulum endoplasmique, permettant alors une libération de calcium ⁹³. Cette libération de calcium est biphasique c'est-à-dire qu'on observe une élévation rapide et transitoire de calcium provoquée par l'IP₃ suivie d'une phase plateau prolongée. L'ensemble de ces phénomènes conduit donc à une augmentation importante et prolongée du calcium libre intracellulaire, et une contraction intense et soutenue de la cellule musculaire lisse (Figure 2 p.24).

Lorsqu'injecté en bolus entre 5 à 30 ng/Kg par minute, l'ET-1 produit une vasodilatation transitoire suivie d'une hypertension lente et prolongée ^{86, 94}. En perfusion continue, seule la réponse hypertensive est obtenue ^{86, 94}. Une étude de Haynes et Webb ⁹⁵ (1994) a démontré

pour la première fois que l'ET-1 endogène jouait un rôle important dans le maintien du tonus vasculaire chez des sujets sains. L'administration intra-artérielle de BQ123, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET_A entraîne une importante vasodilatation des vaisseaux de l'avant-bras chez l'homme. Par ailleurs, des expériences réalisées sur des cellules endothéliales en culture ou des vaisseaux isolés suggèrent que l'apport exogène de NO par les cellules endothéliales réduit la production et les effets presseurs de l'ET-1, alors que les inhibiteurs de la NO synthase augmentent la synthèse de ce peptide ⁷⁹. En effet, sur des artères isolées, la libération basale de NO par l'endothélium inhibe de façon significative les effets constricteurs de l'ET-1. Par exemple sur les artères mammaires humaines, la dénudation endothéliale potentialise la réponse contractile induite par l'ET-1 ⁹⁶. La présence d'ET-1 en conditions basales a également été démontrée sur le rat, où l'inhibition de la NO synthase a provoqué une augmentation de la pression artérielle qui est réduite en présence de BQ123 ⁹⁷. Le NO du fait de son action inhibitrice sur la synthèse mais également sur l'effet physiologique de l'ET-1 est donc un puissant modulateur du système de l'ET-1 ^{78, 79}. Ces données suggèrent une relation étroite entre le NO et l'ET-1 dans le contrôle du tonus vasculaire. En effet, le NO produit par l'endothélium peut agir à la fois comme un antagoniste naturel de la libération et de l'action de l'ET-1. Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant l'influence qu'exerce l'ET-1 sur les effets vasculaires du NO

en conditions physiologiques. Des études incluant la nôtre ^{99,101}, ont rapporté que l'endothélium pouvait réguler la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO et aux dérivés nitrés. Moncada et son groupe ont suggéré que l'augmentation des effets relaxants aux dérivés nitrés dans les vaisseaux sans endothélium ou après l'inhibition de la NO synthase était reliée à une hypersensibilisation de la guanylate cyclase soluble au niveau du muscle lisse vasculaire. En conditions pathologiques toutefois, des études ont démontré que l'ET-1 pouvait participer à la régulation de la sensibilité du muscle lisse vasculaire. Münzel et collaborateurs ¹⁰⁰ ont démontré que, dans le phénomène de la tolérance aux nitrates, associé à un traitement chronique avec la nitroglycérine chez des patients angineux, les niveaux tissulaires d'ET-1 étaient doublés et par conséquent, la réactivité vasculaire aux dérivés nitrés pouvait être partiellement corrigée en utilisant des inhibiteurs des récepteurs à l'ET-1. Dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat, nous avons aussi observé que l'ET-1 pouvait contribuer à la diminution de la réactivité du muscle lisse vasculaire aux dérivés nitrés ⁹⁸. En effet, nous avons observé une amélioration de la réponse relaxante au SNP (un donneur de NO) suite à l'administration d'un antagoniste des récepteurs ET_A.

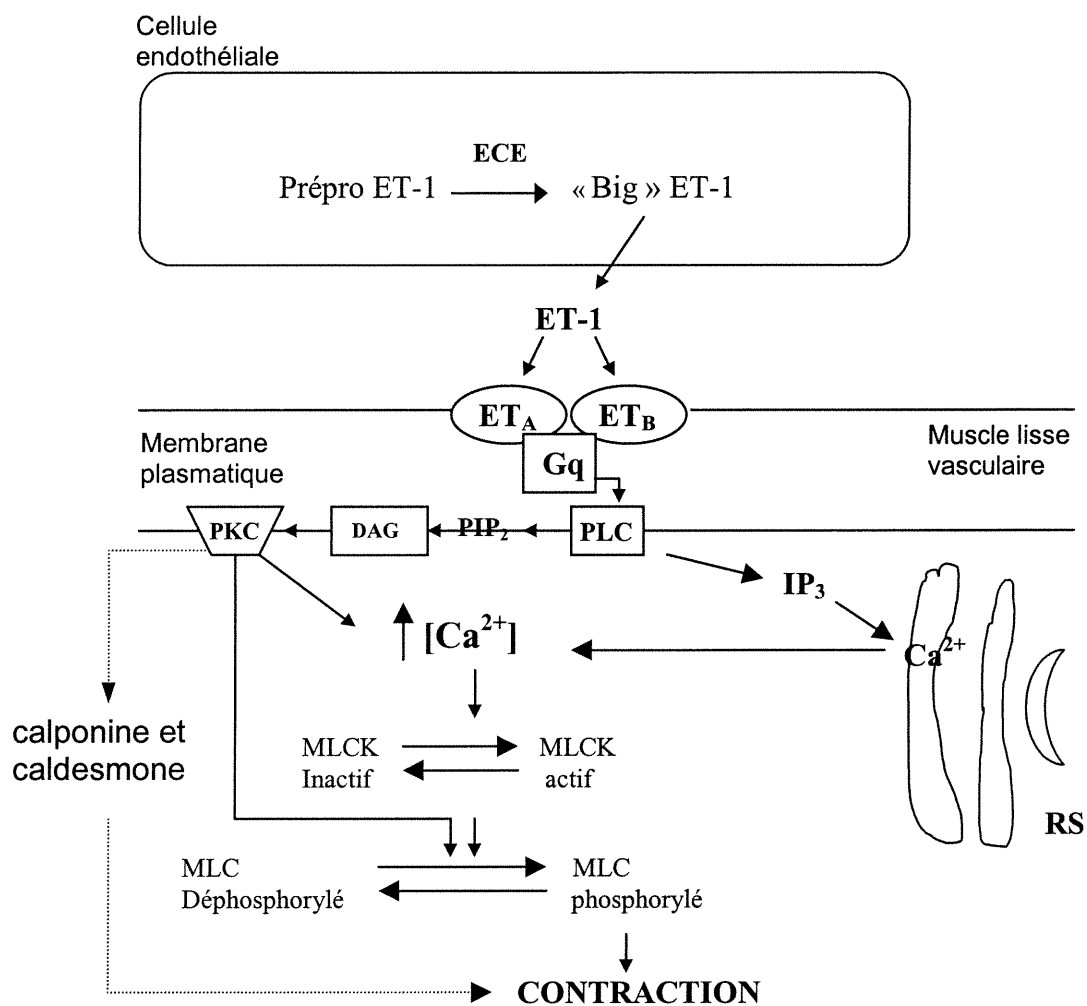


Figure 2. Synthèse et mécanisme d'action de l'endothéline.

ET-1 : endothéline, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline, ET_A, ET_B : récepteur de l'endothéline, Gq : protéine G de type Gq, PKC : protéine kinase C, DAG : diacyl glycérol, PLC : phospholipase C, PIP₂ : phosphatidyl inositol biphosphate, IP₃ : inositol triphosphate, RS réticulum sarcoplasmique, MLCK : Kinase de la chaîne légère de myosine, MLC : chaîne légère de myosine

1.4- Facteur relaxant indépendant de l'endothélium

1.4.1 agoniste bêta-adrénergique

Le système nerveux autonome (SNA) joue un rôle important dans la régulation de la vasomotricité. Le système nerveux sympathique, élément principal de cette régulation, peut moduler le tonus vasculaire par voie humorale ou nerveuse. L'innervation des vaisseaux sanguins se fait par les fibres nerveuses du SNA qui aboutissent au niveau de l'adventice vasculaire en formant des varicosités au contact des fibres contractiles de la couche externe de la média. La stimulation adrénergique active la paroi par 2 processus; l'un électrique, transmis de proche en proche par les jonctions communicantes (« *gap junctions* »); l'autre biochimique, par diffusion de la noradrénaline (NA) libérée par les terminaisons nerveuses dans la paroi vasculaire. Il existe 2 classes principales de récepteurs vasculaires adrénergiques¹⁰² soit les récepteurs alpha (α) et bêta (β) qui sont divisés en sous-classes: les récepteurs α_1 et β_1 sont excitateurs alors que les récepteurs α_2 et β_2 sont inhibiteurs. Cependant, une attention particulière sera portée sur les récepteurs β -adrénergiques notamment les récepteurs β_2 à cause de leur action dilatatrice sur les vaisseaux sanguins.

Les récepteurs β -adrénergiques permettent la transduction des signaux transmis par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) aux nombreux effecteurs cellulaires et sont ainsi l'interface entre le système nerveux sympathique et le système cardiovasculaire. Les récepteurs β -adrénergiques appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il existe trois types de récepteurs β -adrénergiques. Les récepteurs β_1 prédominent dans les tissus cardiaques, l'appareil juxtaglomérulaire (sécrétion de rénine) et leur action est de type excitateur. Au niveau cardiaque les récepteurs β_1 favorise la contractilité myocardique et augmente la fréquence cardiaque (inotrope et chronotrope positif). Les récepteurs β_2 prédominent dans les fibres musculaires lisses et leur action est de type inhibiteur permettant une relaxation du muscle lisse vasculaire ¹³⁶. Les récepteurs β_3 sont situés au niveau du tissu adipeux et stimule la lipolyse. L'agoniste type capable de se fixer aux récepteurs β_1/ β_2 et de les activer est l'isoprénaline.

La vasorelaxation du muscle lisse vasculaire par les récepteurs β_2 se fait par l'intermédiaire d'une sous unité $G\alpha_s$ ¹⁰³, qui aboutit à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et permet l'accumulation de l'AMP cyclique (AMPC) ¹⁰⁴. Une fois formé, l'AMPC va se lier et activer la protéine kinase A (PKA) dans le muscle lisse vasculaire ¹⁰⁵. Les effets vasorelaxants induits par la PKA résultent entre autre de la phosphorylation d'un canal

potassique engendrant son ouverture et qui permet la repolarisation de la cellule occasionnant ainsi la fermeture des canaux calciques de type L et de la phosphorylation de la phospholambane, protéine qui régule la sensibilité de la calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique au calcium libre intracellulaire et donc permet une diminution du calcium dans la cellule ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. La PKA permet aussi la phosphorylation de la MLCK (kinase de la chaîne légère de la myosine) ¹⁰⁹, une enzyme qui phosphoryle les chaînes légères de myosine ¹¹⁰ et stimule la formation des ponts d'actine-myosine élément essentiel à la contraction ¹¹¹. La MLCK n'est active que lorsqu'elle est associée au complexe Ca^{2+} -calmoduline. A l'état phosphorylé, la MLCK ne se fixe que faiblement au complexe Ca^{2+} -calmoduline, ce qui explique la relaxation du muscle lisse vasculaire ^{112, 113}. On retrouve donc ici, une homologie d'action avec celle du NO, le GMPc et la PKG (Figure 3, p.29).

Certaines études ont suggéré que l'endothélium pouvait avoir un rôle facilitateur dans la relaxation engendrée par les agonistes β -adrénergiques. En effet, l'élimination de l'endothélium chez l'aorte de rat ¹¹⁵⁻¹¹⁸, les artères coronaires de chien ¹¹⁹ et les veines ombilicales humaines ¹²⁰ atténue la relaxation induite par l'isoprénaline. L'inhibition de la NO synthase altère la relaxation à l'isoprénaline des aortes de rat intactes ¹¹⁸, artères mésentériques de rat ¹²², artères coronaires de chien ¹²³, artères pulmonaires de rat ¹²⁴, artères carotides de rat ¹²⁵ et les veines

umbilicales humaines ¹²⁰. Par contre, d'autres études ont rapporté que retirer l'endothélium n'avait aucun effet inhibiteur sur la relaxation induite par l'isoprénaline dans les aortes de rat ⁹⁹, artères coronaires de chien ¹²⁶ et les artères mammaires humaines ¹²⁷. Nous avons précédemment démontré en conditions physiologiques que dans les artères cérébrales de lapin, le système de l'endothéline pouvait affecter la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO dépendant ou indépendant de l'endothélium. Que l'endothéline puisse participer à la régulation des agonistes β -adrénergiques a été rapportée au niveau cardiaque. En effet, Reid et collaborateurs ¹²⁸ ont démontré que l'ET-1 réduisait la capacité de l'isoprénaline à induire une augmentation de la vitesse et de la force de contraction auriculaire. D'autres études ont suggéré que l'ET-1 pouvait avoir un rôle modulateur dans la génération d'AMPc. En effet, l'ET-1 peut inhiber la formation d'AMPc dans les capillaires du cerveau ¹²⁹ et dans les cellules du granulososa de rat ¹³⁰, atténuer la formation d'AMP cyclique dans la réponse à l'isoprénaline et à la forskoline dans les myocytes cardiaques de rat ¹³¹ et finalement atténuer la formation d'AMPc induite par l'isoprénaline dans les cellules de muscle lisse humain en culture ¹³². Dans d'autres systèmes toutefois, la formation d'AMPc semble être stimulée par l'ET-1 notamment dans la glande pituitaire antérieure de rat ¹³³, les cellules épiphyse en culture ¹³⁴, et les cellules mésangiales glomérulaires de rat ¹³⁵.

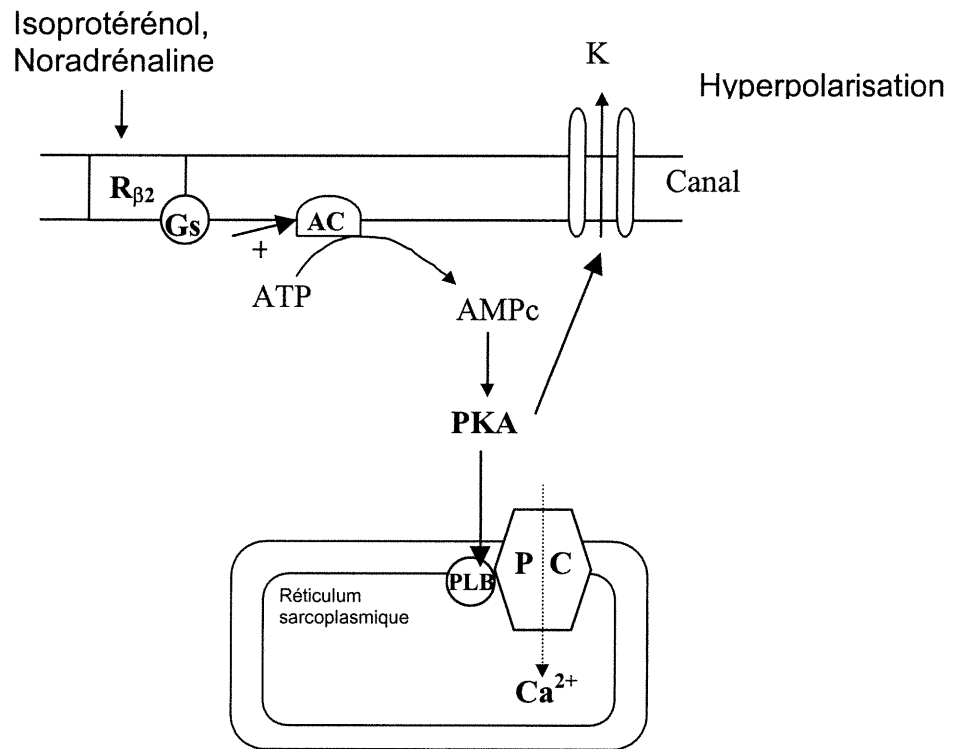


Figure 3. Mécanisme de la relaxation induit par les récepteur β_2 adrénergiques.

$R_{\beta 2}$; récepteur β_2 -adrénergique, G_s ; protéine G de type s, AC; adénylate cyclase, ATP; adénosine triphosphate, AMPc; adénosine monophosphate cyclique, PKA; protéine kinase A, PLB; phospholambane, PC; pompe calcique.

2- JUSTIFICATION ET BUTS

À la lumière de ces résultats, le premier objectif de notre travail a été d'évaluer l'impact de l'ET-1 sur la sensibilité du muscle lisse vasculaire aux facteurs dérivés de l'endothélium et plus particulièrement au NO et ce, en conditions physiologiques. Le rôle exact de l'ET-1 dans le contrôle du tonus vasculaire reste peu connu et bien comprendre les voies d'interaction de l'ET-1 avec le muscle lisse vasculaire pourrait nous aider à comprendre certains mécanismes d'action de l'ET-1 dans les pathologies associées à une hyper-endothélinémie. Cette dernière est associée à l'augmentation de l'activité du système neurosympathique dans le cas de la défaillance cardiaque. Dans ce contexte, la vasorelaxation du muscle lisse vasculaire produite par les récepteurs β -adrénergiques pourrait également être la cible régulatrice du système de l'endothéline. En effet, les récepteurs ET_A constricteurs liés à la phospholipase C et les récepteurs β -adrénergiques (β_2) dilatateurs liés à l'adénylate cyclase sont situés sur le muscle lisse vasculaire et ont des effets opposés sur les vaisseaux sanguins. L'existence d'une interaction entre ces voies reste inconnue et pourrait être importante dans la régulation du tonus vasculaire. Basé sur ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que le système de l'ET-1 pouvait influencer la réactivité du muscle lisse vasculaire à l'isoprénaline. En effet, aucune étude n'a

exploré la possibilité que la voie de l'endothéline puisse moduler les réponses relaxantes des récepteurs β -adrénergiques vasculaires à l'isoprénaline en conditions physiologiques. Ainsi nous avons étudié le rôle modulateur de l'ET-1 sur la réactivité du muscle lisse au NO/GMPc d'une part et β -adrénergique/AMPC d'autre part. Nous pourrions ainsi déterminer si ces mécanismes de régulation physiologique sont modifiés dans la tolérance aux nitrates, une condition associée à une augmentation de l'expression de l'ET-1 vasculaire et une baisse de la sensibilité de la guanylate cyclase. Les conséquences de cette condition sur la réactivité vasculaire à l'AMPC sont peu connues et pourront être testées ultérieurement.

3- MÉTHODES

3.1 Mesure de la réactivité vasculaire

Les vaisseaux sanguins ont été coupés en segments de 2 mm puis montés à l'aide d'un fil de tungstène (20 μ m) sur un myographe pour microvaisseaux (IMF, Université du Vermont, VT, U.S.A) afin de mesurer des changements de tension isométrique. Les vaisseaux ont été étirés et équilibrés pendant 30 min à leur tension optimale dans un bain d'organe contenant 5 ou 10 ml de solution physiologique saline (PSS) froide en présence d'indométhacine (10 μ M) ainsi que les sels suivants en (mM): NaCl 130, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, EDTA 0.026, glucose 10, CaCl₂ 1.6 et oxygéné avec 12% O₂, 5% CO₂, 83% N₂ (pH : 7.4, 37 °C, pO₂=150mmHg). La tension optimale des artères a été déterminée grâce à des étirements successifs afin de leur donner une tension permettant une constriction optimale avec 40 mM de KCl. Nous avons utilisé 12% O₂, 5% CO₂, 83% N₂ afin de minimiser les effets de la pression partielle en O₂ sur les microvaisseaux. En effet, les artères cérébrales étant très fragiles pourraient être endommagées avec l'utilisation de l'O₂ à 95% où la pression partielle est de 150 mmHg¹⁴⁴.

3.2 Modèle animal

Une série d'expériences a été réalisée chez des lapins blancs de Nouvelle-Zélande (Charles River) mâles et femelles pesant entre 2.8 et 3.0 kg. Les lapins ont été anesthésiés par une injection i.v. de pentobarbital (50 mg/Kg) et euthanasiés par exanguination. L'aorte et le cerveau ont été enlevés et les artères cérébrales moyennes retirées du cortex. Les vaisseaux ont été par la suite placés dans une solution physiologique saline (PSS) froide comme précédemment décrit.

3.2.1 Protocole d'isolation des artères cérébrales

Des anneaux d'artères de 2 mm et ayant un diamètre de 200 μ M ont été montés sur des myographes, puis étirés afin de leur donner une tension permettant une constriction optimale avec 40 mM de KCl. La tension optimale moyenne était de 150 mg \pm 11. Les anneaux d'artères ont été précontractés avec une solution dépolarisante contenant 40 mM de KCl et des réponses relaxantes à des doses cumulatives de sodium nitroprussiate (SNP) ou d'acétylcholine (Ach) ont été obtenues en présence ou non d'antagoniste. Afin de déterminer l'intégrité de l'endothélium, l'Ach (1 μ M) a été administrée pour chaque expérience. Cependant, dans une série de vaisseaux (n=15), l'endothélium a été

enlevé mécaniquement par des mouvements circulaires avec un cheveu humain. L'absence de relaxation à l'Ach dans les anneaux préconstrictés avec 40 mM de KCl a confirmé l'efficacité de la dénudation endothéliale.

3.2.2 Protocole d'isolation des aortes

Dans une deuxième série d'expériences, toujours avec des lapins de Nouvelle-Zélande (2.8-3.0 kg), l'aorte thoracique descendante a été prélevée et placée dans une solution physiologique froide comme précédemment décrit. Par la suite l'aorte a été nettoyée puis des segments de 2 mm et de 1.5 mm de diamètre ont été coupés. Les anneaux d'artères ont été montés sur un myographe (cf. mesure de la réactivité vasculaire p.32), puis ont été étirés progressivement afin de leur donner une tension permettant une constriction optimale avec la phényléphrine (PHE). La tension basale moyenne était de 1.4-1.6 g. Les anneaux d'artères ont été préconstrictés avec la PHE (30 μ M) ou l'endothéline (ET-1) (30 nM) et des réponses relaxantes à des doses cumulatives d'isoprénaline, un agoniste β -adrénergique ont été obtenues, en présence ou non d'antagonistes. Afin de déterminer l'intégrité de l'endothélium, l'Ach (1 μ M) a été administrée pour chaque expérience. Cependant, dans une série de vaisseaux, l'endothélium a été enlevé mécaniquement par des mouvements circulaires avec un bâtonnet de bois. L'absence de relaxation à l'ACH (1 μ M) dans les anneaux

précontractés avec la PHE (30 μ m) a confirmé l'efficacité de la dénudation endothéliale.

3.3 Analyse des résultats et statistiques

Les résultats ont été exprimés sous la forme moyenne \pm erreur standard (SEM). La vasorelaxation a été exprimée comme étant le % d'inhibition de la vasoconstriction induite par l'agoniste. La concentration de l'agoniste à laquelle 50 % de l'effet maximal est obtenu (EC_{50}) a été déterminée pour chaque dose individuelle de chaque courbe dose réponse à l'aide du programme Allfit (Allfit®, Dr. A. Deléan, Département de Pharmacologie, Université de Montréal). Les valeurs des pD_2 représentent le $-\log(EC_{50})$ de l'agoniste. Les différences statistiques entre les moyennes ont été déterminées par le test de t de Student lorsque deux groupes étaient comparés. Un anova suivi d'un test de Scheffé à été utilisé lors de comparaisons multiples. Une valeur de probabilité < 0.05 a été acceptée comme significative pour les différences entre les groupes de données.

**RÉSULTAT 4.1: ENDOTHELIUM-DERIVED
ENDOTHELIN-1 REDUCES CEREBRAL ARTERY
SENSITIVITY TO NO BY A PKC-INDEPENDENT
PATHWAY.**

Endothelium-derived endothelin-1 reduces cerebral artery sensitivity to NO by a PKC-independent pathway.

Cover title *Endothelin-1 and NO-dependent relaxation*

Number of tables: 2

Number of graphs/figures: 4

Acknowledgement: 1

Word count in:

Abstract: 264

Manuscript text: 2 435

References: 765

Tables: 268

Figure legends: 200

Accepté dans Stroke

Keywords: cerebral artery; NO; nitrates; endothelin-1; acetylcholine.

ABSTRACT

Background and purpose. Nitric oxide (NO) reduces endothelin-1 (ET-1) production and blunts ET-1 dependent vasoconstriction. The direct effects of smooth muscle ET_A receptor stimulation on NO-mediated relaxation are unknown. We hypothesized that endothelium-derived ET-1 regulates vascular tone by reducing smooth muscle sensitivity to NO possibly through activation of PKC. **Methods.** Rings of rabbit middle cerebral arteries were mounted on microvessel myographs to measure isometric tension. Dose-response curves to ACH and SNP (a NO donor) were obtained with or without ET-1 receptor blockade. Experiments were performed in the presence of indomethacin (10 μM). Results are expressed as mean±SEM. **Results.** In depolarized conditions (40 mM KCl physiological solution), ACH-induced relaxation was entirely NO-dependent as indicated by its suppression by L-NNA (P<0.05). Arterial sensitivity (pD₂) to ACH (6.32±0.11, n=6) was increased (P<0.05) to 6.77±0.10 (n=6) by BQ123 (ET_A receptor antagonist, 5μM) but not by BQ788 (ET_B receptor antagonist, 5μM; 6.08±0.22, n=5). Consistent with this finding, blockade of ET_A receptors increased (P<0.05) vascular sensitivity to SNP (6.95±0.10, n=8) whereas BQ788 had no influence on arterial sensitivity to SNP (6.17±0.07, n=7) compared to control (6.43±0.13, n=11). In denuded arteries, the sensitivity to SNP (7.10±0.08,

n=8) was reduced by exogenous ET-1 (6.51 ± 0.35 , n=7, $P < 0.05$). Chelerythrine, a PKC inhibitor did not alter smooth muscle sensitivity to NO, whereas PMA, a PKC activator strongly increased it. **Conclusions.** Blockade of ET_A but not ET_B receptors sensitizes vascular smooth muscle to exogenous and endothelium-derived NO. This suggests that ET-1 regulates smooth muscle sensitivity to NO by a PKC-independent pathway. This represents an alternative pathway by which NO and ET-1 interacts to regulate vascular tone.

INTRODUCTION

Endogenous endothelin (ET-1) regulates vascular tone through the activation of specific ET_A and ET_B receptors (1). ET_A receptors are expressed in smooth muscle cells which contract upon activation. In contrast, ET_B receptors are expressed both on smooth muscle cells to evoke contractions and endothelial cells to induce nitric oxide (NO)- and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-dependent relaxation (2, 3). EDHF dilates arteries by increasing membrane potential, which reduces Ca²⁺-dependent contraction of smooth muscle cells (4). A direct interaction between this factor and ET-1 has not been reported. NO however, antagonizes ET-1 release from the endothelium (5). In resistance arteries isolated from human and rat brains as well as rabbit mesentery, the tonic release of ET-1 by the endothelium augments myogenic tone (6) as well as contractile responses to phenylephrine and serotonin (7, 8). These responses are highly increased by NO synthase inhibition.

In addition to modulating vascular reactivity, the endothelium regulates smooth muscle sensitivity to NO (3, 9, 10). After NO synthase inhibition or endothelial denudation, the potency of NO and its donors to induce relaxation increases, suggesting that NO exerts a feedback down-regulation on smooth muscle sensitivity to NO (11). Moncada and coworkers (9) suggested that removal of NO hyper-sensitizes the soluble

guanylate cyclase (GC) to NO, increasing cGMP production and relaxation.

The influence of endothelium-derived ET-1 on smooth muscle sensitivity to NO has not been considered. In this connection, it was reported that blockade of ET-1 receptors improved endothelium-dependent, NO-mediated relaxation in experimental heart failure (12, 13) an effect attributed in part to a reduction in free radical generation. Relaxation of isolated cerebral arteries to a NO donor of rats with heart failure was also improved by chronic ET_A receptor blockade (3). Endothelium-derived ET-1 therefore, may contribute to the regulation of smooth muscle sensitivity to NO. To explore this possibility, we studied the influence of acute ET-1 receptor blockade on smooth muscle sensitivity to NO of isolated cerebral arteries of the rabbit.

MATERIALS AND METHODS

Our institutional ethical committee approved this study. Experiments were performed in New Zealand white rabbits (Charles River) of either sex (weight 2.8 to 3.0 kg). Rabbits were anesthetized by i.v. injection of pentobarbital (50 mg/kg) and euthanized by exanguination. The brain was harvested and middle cerebral arteries removed from the cortex. They were placed in ice cold PSS containing indomethacin (10 μ M) and of the following composition (mM): NaCl 130, KCL 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, EDTA 0.026, glucose 10, CaCl₂ 1.6 and aerated with

12% O₂, 5% CO₂, 83% N₂ (pH 7.4, 37 °C). Segments of 2 mm long were mounted on 20 µm tungsten wire in microvessel myographs (IMF, University of Vermont, VT, U.S.A.). Vessels were equilibrated for 30 min at their optimal tension (150 mg) as previously described (14).

Endothelial integrity was determined in each experiment by addition of 1 µM of ACH to rings pre-constricted with 40 mM K⁺. In a series of experiments (n = 15), the endothelium was removed mechanically by gentle rubbing with a human hair. The effectiveness of endothelial removal was confirmed by the absence of relaxation to ACH (1 µM) in rings pre-constricted with 40 mM KCl PSS.

STUDY PROTOCOLS

In the absence or presence of endothelium, parallel series of experiments using two arterial segments treated or not for 30 min with antagonists or inhibitors were performed. Only one dose-response curve to one agonist was obtained per arterial segment. Vessels were pre-constricted with 40 mM KCl PSS and dose-response curves to SNP or ACH were obtained. When PMA was used, it was added at the plateau of the contraction induced by 40 mM KCl PSS prior to the addition of ACH or SNP. In some experiments, vessels were pre-constricted with L-NNA (100 µM) and dose-response curves to ACH were obtained; in these conditions, we evaluated the influence of endogenous ET-1 on ACH-mediated relaxation by a K⁺-sensitive endothelium-derived relaxing factor.

The term "EDHF" used in this study refers therefore to the KCl-sensitive, L-NNA- and indomethacin-resistant component of endothelium-dependent vasorelaxation (15). Finally, vessels were denuded and pre-constricted with 40 mM KCl PSS or ET-1: a dose-response curve to SNP was subsequently constructed.

The concentration of BQ123 (5 μ M) reduced ET-1 sensitivity (pD_2) of cerebral arteries from 9.31 ± 0.68 to 7.45 ± 0.14 ($n = 5$, $P < 0.05$). BQ788 (5 μ M) however, had no influence (data not shown). The inhibitor of PKC (chelerythrine, 1 μ M) has been shown to be selective and effective at the concentration used (16, 17). PMA was used at a concentration of 0.1 μ M (18). Catalase (CAT, 500 U/ml) and superoxide dismutase (SOD, 250 U/ml) were added 30 min before the 40 mM KCl PSS and cumulative addition of SNP (19, 20). DMSO (0.014 M), a weak free radical scavenger (21, 22) used to dissolve ET-1 receptor antagonists did not affect vascular sensitivity to ACH (6.44 ± 0.24 , $n = 6$) and SNP (6.31 ± 0.27 , $n = 7$) compared to the control sensitivity (6.32 ± 0.11 , $n = 6$, and 6.43 ± 0.13 , $n = 11$, respectively).

STATISTICAL ANALYSIS

Results are expressed as mean \pm SEM. In all experiments, n equals the number of rabbits, and only one segment from one rabbit was used by protocol. Vaso-relaxation is expressed as the % inhibition of the pre-constiction. Pre-constiction refers to the level of tone induced by any constricting agent (K^+ , L-NNA or ET-1) before addition of the relaxant agent (Ach, forskolin or SNP). The half-maximum effective concentration (EC_{50}) of agonist was determined from each individual dose-response curve using a curve-fitting program (Allfit[®], Dr. A. Deléan, Department of Pharmacology, University of Montreal). The pD_2 value is the negative log of the EC_{50} of agonist. Statistical differences between means were determined by ANOVA followed by a Scheffé's F -test. A probability value <0.05 was accepted as significant for differences between groups of data.

CHEMICALS

The following drugs were purchased from Sigma Chemical Co (St-Louis, MO): catalase (CAT), dimethyl sulfoxide (DMSO), indomethacin, N^{ω} -nitro-arginine (L-NNA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), sodium nitroprusside (SNP) and superoxide dismutase (SOD). Endothelin-1 (ET-1), BQ123 and BQ788 were purchased from American Peptide Company (Sunnyvale, CA) and chelerythrine chloride was purchased from Cedarlane Laboratories Limited (Ontario, can). All drugs were dissolved

in PSS except for indomethacin, which was dissolved in ethanol and ET-1, BQ123 and BQ788 which were dissolved in PSS and DMSO (2:1, vol:vol). The final concentration of DMSO in the bath was 0.1% (vol:vol) and did not influence the parameters measured.

RESULTS

Effect of BQ123 on endothelium-dependent and independent relaxation.

Incubation of intact vessels with BQ123 (5 μ M, ET_A receptor antagonist) increased cerebral artery sensitivity to ACH (Fig. 1 and Table 1) and SNP (Fig. 2 and Table 2). Inhibition of ET_B receptors with BQ788 (5 μ M) however, had no effect on vascular sensitivity to NO when compared to control. Furthermore, in arteries pre-contracted with L-NNA (100 μ M, in the presence of indomethacin), ACH-induced relaxation was not affected by BQ123 (Table 1 and Fig. 3) but was blocked by further addition of high external K⁺ (40 mM KCl). cAMP-dependent, endothelium-independent relaxation induced by forskolin (1 nM to 30 μ M) of arteries pre-contracted with 40 mM KCl ($pD_2 = 7.69 \pm 0.76$, $n = 5$) was not affected by BQ123 ($pD_2 = 7.44 \pm 0.96$, $n = 5$).

Effect of endothelial denudation on the relaxation induced by SNP.

Endothelial denudation facilitated the relaxation induced by SNP (Fig. 4) as demonstrated by the increase in vascular sensitivity to SNP (Table 2).

In these conditions, BQ123 (5 μ M) did not affect vascular sensitivity to SNP (Table 2). In denuded arteries pre-constricted with ET-1 (428 \pm 45 mg, n=7) however, the sensitivity to SNP was reduced to 6.51 \pm 0.35 (P<0.05) compared to the sensitivity to SNP (7.10 \pm 0.08, n=7) of denuded arteries pre-contracted with 40 mM KCl (445 \pm 97 mg).

Influences of free radical scavengers, chelerythrine and PMA on cerebral artery reactivity to NO. Combined addition of catalase and superoxide dismutase did not influence vascular sensitivity to SNP (Table 2). Chelerythrine (1 μ M), a PKC inhibitor, did not influence vascular reactivity to endogenous and exogenous NO released by ACH and SNP, respectively (Tables 1 and 2). Accordingly, sensitivity to SNP (6.47 \pm 0.51, n = 6) of intact arteries pre-contracted with ET-1 (358 \pm 44 mg) was not increased by pre-treatment with chelerythrine (6.56 \pm 0.26, n = 5) which did not influence the level of pre-contraction induced by ET-1 (435 \pm 30 mg). The level of pre-contraction induced by 40 mM KCl-PSS (290 \pm 51, n = 11) was further increased by addition of PMA, the PKC activator (422 \pm 47 mg, n = 10, P<0.05). In these conditions, vascular sensitivity to ACH was increased (8.21 \pm 0.56, n = 5; P<0.05) compared to the sensitivity to ACH in the absence of PMA (6.32 \pm 0.11, n = 6). Combined addition of PMA and BQ123 did not further increase ACH sensitivity (8.06 \pm 0.44). Similarly, the sensitivity to SNP was increased by PMA (7.67 \pm 0.42, n = 5; P<0.05) compared to the vascular sensitivity to SNP in the absence of PMA

(6.43 ± 0.13 , $n = 11$). As for ACH-induced relaxation, BQ123 did not further increase the sensitivity to SNP in the presence of PMA (7.35 ± 0.92 , $n = 5$).

Effect of L-NNA on the relaxation induced by SNP. In the presence of an intact endothelium, blockade of NO formation with L-NNA ($100 \mu\text{M}$) increased vascular sensitivity to SNP (Table 2). Addition of BQ123 had no significant effect (Table 2).

Pre-contraction levels. BQ123 and BQ788 did not affect L-NNA- (Table 1) or 40 mM KCl-PSS-induced contraction (Table 1 and 2). Similarly, chelerythrine and catalase combined with superoxide dismutase did not influence the pre-contraction induced by 40 mM K^+ (Table 2). Endothelial denudation, PMA and L-NNA however, increased the level of pre-contraction induced by 40 mM KCl PSS. The sensitivity to NO was sensitive to BQ123, PMA and L-NNA. In the absence of endothelium, pre-contraction levels induced by ET-1 ($428 \pm 45 \text{ mg}$, $n=7$) and 40 mM KCl ($445 \pm 97 \text{ mg}$, $n = 7$) were increased compared to that of intact arteries (Tables 1 and 2): nonetheless, vascular sensitivity of SNP-induced relaxation was reduced by ET-1. The level of the pre-constriction induced by 40 mM KCl PSS, ET-1, PMA or L-NNA was therefore not predictive of the vascular sensitivity to NO.

DISCUSSION

NO and ET-1 produce opposite responses to establish an important balance in the control of vascular tone. It has been demonstrated that NO could counteract the production and the vasoconstrictor effect of ET-1 (5). In this study, we tested the hypothesis that endothelium-derived ET-1 could regulate smooth muscle sensitivity to NO. Our data demonstrate that ET-1, by a PKC-independent pathway, directly decreases smooth muscle sensitivity to SNP, a NO donor. Indeed, vascular sensitivity to SNP was similar in denuded vessels pre-contracted with ET-1 and intact arteries pre-contracted by high K^+ . In these latter conditions, vascular sensitivity to SNP was lower when compared to that of intact arteries pre-contracted by high K^+ in the presence of BQ123 and that of denuded arteries pre-contracted by high K^+ . This mechanism also regulates vascular sensitivity of endothelium-derived NO.

Control experiments confirmed that inhibition of NO synthase with L-NNA and endothelial denudation augmented vascular sensitivity to SNP-induced relaxation (10, 11). It has been demonstrated *in vivo* that the absence of NO in the vasculature led to a specific super-sensitivity to nitro-vasodilators related to an up-regulation of the enzymatic activity of the soluble guanylate cyclase (9). Our observation that vascular sensitivity to SNP and ACH-induced relaxation are increased in the presence of ET_A-receptor blockade (Tables 1, 2 and Fig 2, 3) suggested to us that

endothelium-derived NO was not the only factor involved in the regulation of smooth muscle sensitivity to NO.

The regulatory effects of ET_A-receptor blockade on the relaxation mediated by SNP and ACH are specific to NO. BQ123 did not influence the K⁺-sensitive, EDHF-like relaxation induced by ACH in the presence of L-NNA and indomethacin (Fig. 4) nor the forskolin-mediated cAMP-dependent relaxation.

The mechanism by which ET-1 reduces smooth muscle sensitivity to NO remains unknown. The effects of ET-1 are mediated by activation of smooth muscle ET_A receptors but not vascular, either endothelial or muscular ET_B receptors. Acutely, ET-1-dependent activation of two known pathways may contribute to this phenomenon. First, ET-1 has been shown to activate NAD(P)H-dependent superoxide production in phagocytes (23). This oxidase represents the most important source of superoxide in endothelial and smooth muscle cells (24-26). It has been demonstrated that free radicals interfered with NO-mediated dilatation (26). As shown in Table 2 however, the free radical scavengers SOD combined with catalase had no effect on vascular sensitivity to endogenous and exogenous NO. Other investigators have obtained similar results with SOD from aorta of rats and in control conditions (12, 24). Münzel and coworkers (27) however, have observed that, in rabbit aortic segments, pretreatment with liposomal SOD slightly enhanced vascular sensitivity to nitroglycerine and ACH. Other studies have demonstrated the implication of free radicals in

the reduction of NO-mediated activation of the soluble guanylate cyclase and subsequent cyclic GMP formation in vascular smooth muscle cells (22, 28). Thus, it seems that ET-1-dependent free radical generation has limited effects in physiological conditions.

Secondly, ET-1 could decrease vascular sensitivity to NO by activating the PKC pathway. Chelerythrine, a PKC inhibitor, did not influence smooth muscle sensitivity to endogenous and exogenous NO (Tables 1 and 2). Furthermore, chelerythrine did not increase smooth muscle sensitivity to NO of vessels pre-contracted by ET-1. In contrast, activation of the PKC pathway with PMA strongly increased NO sensitivity. Altogether, these data suggest that ET-1-dependent PKC activation is not involved in the reduction of smooth muscle sensitivity to NO. In fact, PKC activation increased cerebral artery sensitivity to NO, an effect opposite to that of ET-1.

As an alternative possibility, ET-1 and NO could counteract each other by physiological antagonism, one factor being constrictor, the other being dilator. This possibility was ruled out in our experiments when using a NO donor such as SNP in denuded vessels. For a similar level of pre-contraction, vascular sensitivity to SNP was reduced by ET-1. In all experimental conditions, the level of pre-contraction was not predictive of the efficacy of NO. There is therefore a direct interaction between the cGMP relaxant pathway activated by NO and the intracellular pathway activated by ET_A receptors. It should be pointed out that the effects of ET-

1 on smooth muscle sensitivity to NO were independent of the endothelium. As a consequence, the improvement of ACH-induced NO-dependent relaxation by blockade of ET_A receptors was not due to an acute improvement of the endothelial function but rather to a better efficacy of the smooth muscle relaxant pathway.

In conclusion, our results show that blockade of ET_A but not ET_B receptors, sensitizes vascular smooth muscle to exogenous NO and endothelium-derived NO by a PKC-independent pathway. This represents an additional pathway of cross-reactivity between NO and ET-1 in vascular tissues.

REFERENCES

1. Haynes WG. Endothelins as regulators of vascular tone in man. *Clin Sci*. 1995;88:509-517.
2. White DG, Mundin JW, Summer MJ and Watts IS (1993) The effect of endothelins on nitric oxide and prostacyclin production from human umbilical vein, porcine aorta and bovine carotid artery endothelial cells in culture. *Br J Pharmacol* 109:1128-1132.
3. Thorin E, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Role of ETA receptor in the regulation of vascular reactivity in rats with congestive heart failure. *Am J Physiol*. 2000;279:H844-H851.
4. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995;92:3337-3349.
5. Boulanger C, Lüscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990;85:587-590.

6. Nguyen T-D, Véquaud P, Thorin E. Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and α -adrenergic-dependent contraction of rabbit resistance arteries. *Cardiovasc Res.* 1999;43:755-761.
7. Thorin E, Cernacek P, Dupuis J (1998). Endothelin-1 regulates tone of isolated small arteries in the rat: effects of hyper-endothelinemia. *Hypertension.* 1998;31:1035-1041.
8. Thorin E, Nguyen TD, Bouthillier A. Control of vascular tone by endogenous endothelin-1 in human pial artery. *Stroke.* 1998;29:175-180.
9. Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RMJ. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:2166-2170.
10. Thorin E, Meerkin D, Bertrand OF, Paiement P, Joyal M, Bonan R. Influence of post angioplasty β -irradiation on endothelial function in porcine coronary arteries. *Circulation.* 2000;101:1430-1435.

11. Yamashita T, Kawashima S, Ohashi Y, Ozaki M, Rikitake Y, Inoue N, Hirata K-I, Akita H, Yokoyama M. Mechanisms of reduced nitric oxide/cGMP-mediated vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*. 2000;36:97-102.
12. Bauersachs J, Fraccarollo D, Galuppo P, Widder J, Ertl G. Endothelin-receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000;47:142-149.
13. Shen Y, Buie PS, Lynch JJ, Krause SM, Ma X. Chronic therapy with an ET(A/B) receptor antagonist in conscious dogs during progression of congestive heart failure. Intracellular Ca(2+) regulation and nitric oxide mediated coronary relaxation. *Cardiovasc Res*. 2000;48:332-345.
14. Thorin E, Huang PL, Fishman MC, Bevan JA. Nitric oxide inhibits α_2 -adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ Res*. 1998;82:1323-1329.
15. Brandes RP, Schmitz-Winnenthal F-H, Félétou M, Gödecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and

endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:9747-9752.

16. Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;172:993-999.

17. Soloviev AI, Parshikov AV, Stefanov AV. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res*. 1998;35:325-331.

18. Pérez-Vizcaino F, Cogolludo A, Tamargo J. Modulation of arterial $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduction and relaxation by norepinephrine, ET-1, and PMA. *Am J Physiol*. 1999;276:H651-H657.

19. MacKenzie A, Filippini S, Martin W. Effects of superoxide dismutase mimetics on the activity of nitric oxide in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 1999;127:1159-1164.

20. Hamilton C, Thorin E, McCulloch J, Dominiczak AF, Reid JL. Chronic exposure of bovine aortic endothelial cells to native and oxidised

LDL modifies phosphatidylinositol metabolism. *Atherosclerosis*. 1994;107:55-63.

21. Stewart DJ, Pohl U, Bassenge E. Free radicals inhibit endothelium-dependent dilatation in the coronary resistance bed. *Am J Physiol*. 1988;255:H765-H769.

22. Kontos HA, Wei EP. Hydroxyl radical-dependent inactivation of guanylate cyclase in cerebral arterioles by methylene blue and by LY83583. *Stroke*. 1993;24:427-434.

23. Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RAK, Macharzina R, Bräsen JH, Meinertz T, Münzel T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney*. 1999;55:252-260.

24. Dinerman JL, Lawson DL, Mehta JL. Interactions between nitroglycerin and endothelium in vascular smooth muscle relaxation. *Am J Physiol*. 1991;260:H698-H701.

25. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74:1141-1148.
26. Mohazzab HKM, Kaminski PM, Wolin MS. Oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary endothelium. *Am J Physiol.* 1994;266:H2568-H2572.
27. Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 1995;95:187-194.
28. Bauersachs J, Bouloumié A, Mülsh A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res.* 1998;37:772-779.

Table 1. pD₂ values and maximal relaxation (%) to acetylcholine of vessels with endothelium pre-contracted with 40 mM K⁺ or L-NNA (100 μM; + L-NNA). Experiments were performed in the presence of BQ123 or BQ788 at concentrations of 5 μM and of chelerythrine (1 μM). All solutions contained indomethacin (10 μM).

Experimental conditions	<i>n</i>	pD ₂	% maximum relaxation	pre-constriction level (mg)
40 mM K ⁺	6	6.32±0.11	88±6	268±27
+ BQ123	8	6.77±0.10*	96±3	237±55
+ BQ788	5	6.08±0.22	85±2	285±67
+ Chelerythrine	5	6.31±0.08	89±3	
+ LNNA	5	6.37±0.18	106±1	431±124
+ L-NNA + BQ123	6	6.39±0.23	101±2	625±39*
				768±44*

Results are mean ± SEM (ANOVA, Scheffé's *F* test). *: P<0.05 versus 40 mM K⁺

Table 2. pD₂ values and maximal relaxation (%) to SNP of vessels with or without endothelium pre-constricted by high external K⁺ (40 mM KCl). Experiments were performed after blockade of NO synthase (+ L-NNA, 100 μM), in the presence of BQ123 or BQ788 at concentrations of 5 μM, in the presence of chelerythrine (1 μM), and catalase (CAT, 500 units/ml) combined with superoxide dismutase (SOD, 250 units/ml). All solutions contained indomethacin (10 μM).

Experimental conditions	<i>n</i>	pD ₂	% maximum relaxation	Pre-constriction level (mg)
+ Endothelium	11	6.43±0.13	100±1	290±51
+ LNNA	17	7.02±0.19*	101±3	564±50*
+ LNNA+BQ123	11	7.28±0.19*	105±3	504±94*
+ BQ123	8	6.95±0.10*	100±3	335±46
+ BQ788	7	6.17±0.07	99±4	310±51
+ Chelerythrine	5	6.71±0.25	100±4	356±78
+ CAT + SOD	5	6.41±0.25	94±4	318±11
- Endothelium	7	7.10±0.08*	100±3	445±97
+ BQ123	8	7.14±0.08*	102±6	549±112*

Results are mean ± SEM (ANOVA, Scheffé's *F* test). *: P<0.05 *versus* + Endothelium.

Figure legends

Figure 1. Influence of ET-1 receptor inhibition on cerebral artery reactivity to ACH. Experiments were performed on vessels with endothelium in the absence (control, n=6) or presence of BQ123 (5 μ M, n=9) or BQ788 (5 μ M, n=5). All solutions contained indomethacin (10 μ M). Results are means \pm SEM.

Figure 2. Influence of ET-1 receptor inhibition on cerebral artery reactivity to SNP. Experiments were performed on vessels with endothelium in the absence (control, n=11) or presence of BQ123 (5 μ M, n=6) or BQ788 (5 μ M, n=7). All solutions contained indomethacin (10 μ M). Results are means \pm SEM.

Figure 3. Influence of ET_A receptor inhibition on cerebral artery reactivity to a K⁺-sensitive endothelium-derived relaxing factor ("EDHF") released by ACH. Experiments were performed in the absence (control, n=5) or presence of BQ123 (5 μ M, n=6). Pre-constriction of intact arterial rings was obtained with L-NNA (100 μ M) an inhibitor of NO synthase. All solutions contained indomethacin (10 μ M). Results are means \pm SEM.

Figure 4. Influence of the endothelium on cerebral artery reactivity to sodium nitroprusside (SNP). Experiments were on vessels performed with (control, n=11) or without (- E, n=7) endothelium. All solutions contained indomethacin (10 μ M). Results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 1

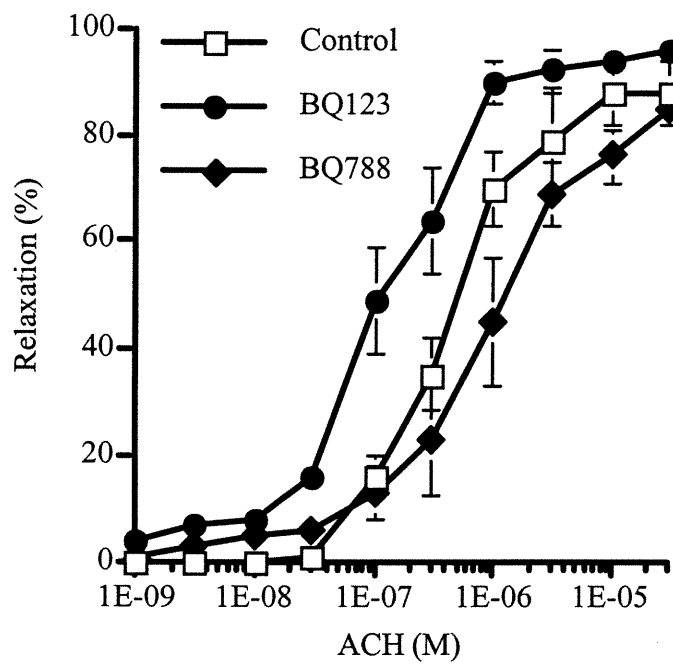


Figure 2

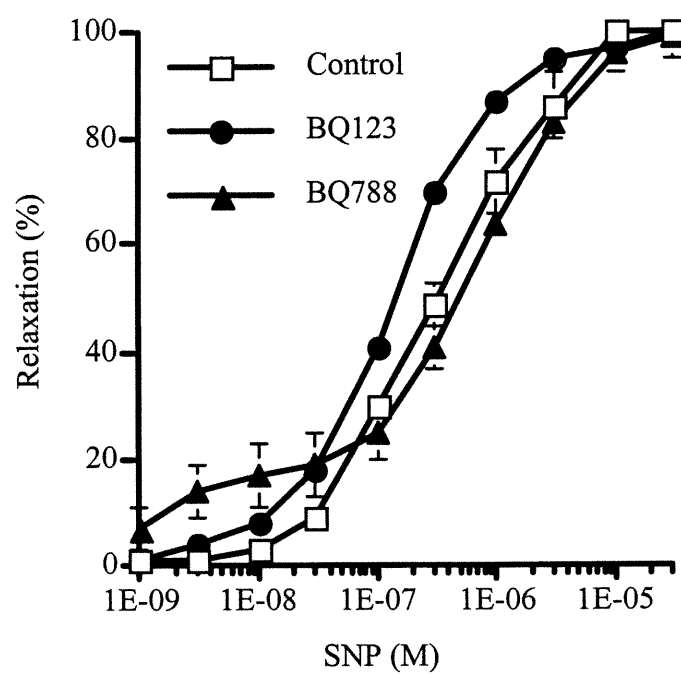


Figure 3

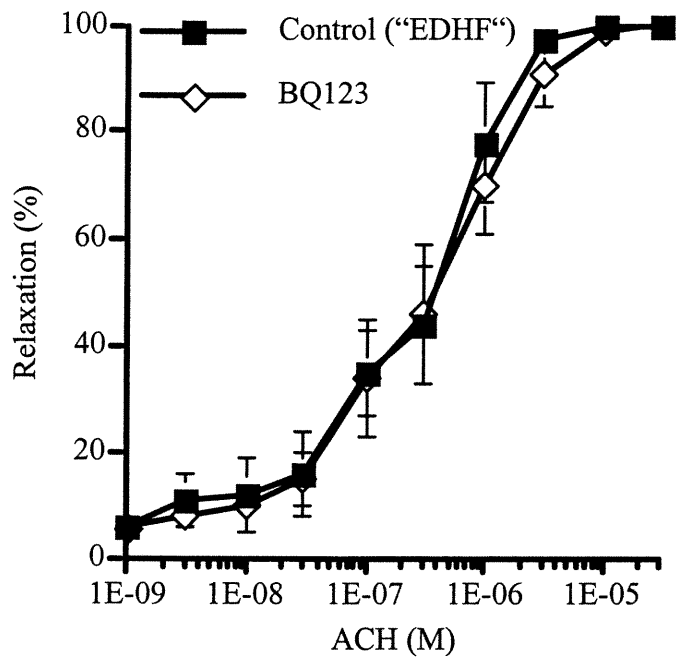
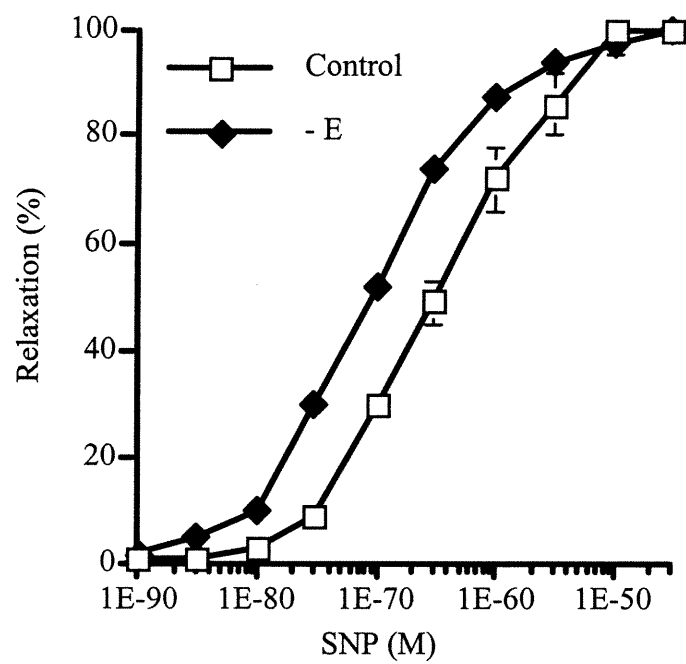


Figure 4



**RÉSULTAT 4.2: ENDOTHELIN-1 ENHANCES β -
ADRENORECEPTOR-INDUCED VASCULAR
RELAXATION.**

ENDOTHELIN-1 ENHANCES β -ADRENOCEPTOR-INDUCED VASCULAR RELAXATION

Patricia Gilbert, B.Sc., Eric Thorin, Ph.D.

Institut de Cardiologie de Montréal, centre de recherche, 5000 rue
Bélanger Est, Montréal (Québec) Canada, H1T 1C8.

Cover title *Endothelin-1 and cAMP-dependent relaxation*

Corresponding author:

Eric Thorin, Ph.D.

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

Email: thorin@icm.umontreal.ca

Soumis à British Journal of Pharmacology

Keywords: phenylephrine; isoprenaline; PKC; calcineurin; rabbit aorta.

Abstract

1. Endothelin-1 (ET-1) has been shown to reduce isoprenaline (ISO)-induced responses in the rat isolated atria. We examined whether ET-1 modulates ISO-dependent activation of β -adrenoceptor (β -AR), cAMP-mediated vascular relaxation.
2. Rings of the rabbit aorta without endothelium were mounted on myographs to measure isometric tension. Vessel pre-treated with indomethacin (10 μ M) were pre-contracted to similar levels with phenylephrine (PHE, 30 μ M) or ET-1 (30 nM). Relaxation to ISO (0.1 nM – 30 μ M) and forskolin (0.1 nM – 30 μ M) were obtained. pD_2 (sensitivity) is the negative Log of the EC_{50} . Maximal relaxation (E_{max}) are reported as % of the pre-contraction. Data are expressed as mean \pm SEM.
3. Vascular sensitivity to ISO was not altered by ET-1 (7.58 ± 0.33 ; $n = 13$) as compared to PHE (7.48 ± 0.27 ; $n = 11$). In contrast, the E_{max} induced by ISO was greater ($P < 0.05$) in the presence of ET-1 (42 ± 5 %), as compared to PHE (23 ± 4 %). Vascular sensitivity and E_{max} to forskolin were similar in the presence of PHE and ET-1.
4. The effects of chelerythrine (10 μ M) were tested to investigate the involvement of the PKC pathway in the permissive effect of ET-1 on ISO-induced relaxation. The PKC inhibitor increased ($P < 0.05$)

E_{\max} to ISO in the presence of PHE ($50 \pm 4 \%$; $n = 8$) but not ET-1 ($57 \pm 9 \%$; $n = 7$), without affecting vascular sensitivity to ISO. Chelerythrine did not affect the sensitivity and the E_{\max} to forskolin.

5. ET-1-dependent activation of the calcineurin-dependent β -AR recycling pathway may promote relaxation to ISO. Blockade of this pathway with cyclosporine A ($10 \mu\text{M}$) however, altered neither vascular sensitivity (7.55 ± 0.55 and 7.44 ± 0.18) nor E_{\max} to ISO ($16 \pm 2\%$ and $42 \pm 1\%$) in the presence of PHE and ET-1, respectively.
6. In conclusion, ET-1 enhances ISO-induced maximal relaxation. The permissive effect of ET-1 on ISO-induced relaxation appears to directly target the smooth muscle β -AR/G protein complex by a PKC-and calcineurin-independent pathway.

INTRODUCTION

Vascular smooth muscle tone is regulated by a complex interaction between intracellular signal transduction pathways. Relaxation of vascular smooth muscle cells by β -adrenoceptor (β -AR) agonists such as isoproterenol (ISO) relates to the activation of adenylate cyclase and accumulation of cAMP. The cyclic nucleotide activates protein kinase A (PKA) and reduces smooth muscle sensitivity to Ca^{2+} (Wegener et al., 1989; Hicks et al., 1979; Tada et al., 1982). Studies demonstrated that the endothelium facilitates the relaxation to β -AR agonists (Kanata et al., 1989; Grace et al., 1988; Dainty et al., 1990; Gray & Marshall., 1992; Delpy et al., 1996; Rubanayi & Vanhoutte., 1985; Ferro et al., 1999). Activation of nitric oxide (NO) production was responsible for the increase in potency of ISO (Delpy et al., 1996; Toyoshima et al., 1998; Graves & Poston, 1993; Parent et al., 1993; Priest et al., 1997; MacDonald et al., 1999; Ferro et al., 1999). Several studies, however, reported a lack of influence of endothelial removal on ISO-induced relaxation (Moncada et al., 1991; MacDonald et al., 1987; Molenaar et al., 1988). Hence, most of the relaxant effects of ISO can be attributed to its activation of smooth muscle β -AR.

In contrast to ISO, endothelin (ET-1), a potent endothelium-derived vasoconstrictor, activates phospholipase C, increasing inositol triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG) production. This causes

mobilisation of intracellular Ca^{2+} and activation of protein kinase C (PKC), respectively. ET-1-dependent PKC activation has been reported to increase smooth muscle sensitivity to Ca^{2+} (Henrion & Laher, 1993) and thus, promote contraction to neurotransmitters (Thorin et al., 1998b). Since cAMP reduces smooth muscle sensitivity to Ca^{2+} (Wegener et al., 1989; Hicks et al., 1979; Tada et al., 1982), it is likely that the effects of ET-1 would be counteracted by β -AR stimulation.

In this connection, Reid et al. (1991) reported that ET-1 caused a reduction in ISO-induced increases in atrial rate and force of contraction. Other studies reported that ET-1 attenuates cAMP formation in response to ISO in rat cardiac myocytes (Hilal-Dandan et al., 1992), cultured human smooth muscle cells (Wu-Wong & Opgenorth, 1998) and brain capillary endothelial cells (Ladoux & Frelin, 1991). In other systems, however, cAMP formation has been shown to be stimulated by ET-1, particularly in rat anterior pituitary (Domae et al., 1994), cultured epidymal cells (Wong & Huang, 1990), rat glomerular mesangial cells (Simonson & Dunn, 1990), bovine iris sphincter muscle (el-Mowafy et al., 1994) and cultured embryonic bovine tracheal cells (Oda et al., 1992). To our knowledge, however, no studies have focussed on the specific interactions existing between smooth muscle ET-1 receptors and β -AR.

Materials and methods

Experiments were performed with New Zealand white rabbits (Charles River) of either sex (weight 2.8 to 3.0 kg) and were approved by our institutional ethical committee. Rabbits were anesthetized by i.v. injection of pentobarbital (50 mg/kg) and euthanized by exanguination. The thoracic aorta was isolated and placed in ice cold PSS containing indomethacin (10 μ M) and (mM): NaCl 130, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, MgSO_4 1.17, NaHCO_3 14.9, EDTA 0.026, glucose 10, CaCl_2 1.6 and aerated with 12% O_2 , 5% CO_2 , 83% N_2 (pH 7.4, 37°C). After removal of fat and connective tissues, 2 mm segments long were mounted in myographs (IMF, University of Vermont, VT, U.S.A.). Vessels were equilibrated for 30 min at their optimal tension (1.4 - 1.6 g) as previously described (Thorin et al., 1998b). Rings were pre-constricted with phenylephrine (PHE; 30 μ M) or ET-1 (30 nM) and relaxant responses to cumulative doses of isoproterenol (ISO; 0.1 nM - 30 μ M) or forskolin (0.1 nM – 30 μ M) was assessed with or without antagonists. Endothelial integrity was determined in each experiment by addition of 1 μ M acetylcholine (ACH) to rings pre-constricted with PHE. In a series of experiments, the endothelium was removed by gentle rubbing of the intima with a wooden peg. The effectiveness of endothelial removal was confirmed by the absence of relaxation to ACH (1 μ M) in rings pre-constricted with PHE (30 μ M).

STATISTICAL ANALYSIS

Results are expressed as mean \pm SEM. In all experiments, n equals the number of rabbits, and only one segment from one rabbit was used in each protocol. Relaxation was expressed as the % inhibition of the pre-contraction. The half-maximum effective concentration (EC_{50}) of agonist was determined from each individual dose-response curve using a curve-fitting program (Allfit[®], Dr. A. Deléan, Dept of Pharmacology, University of Montreal). The pD_2 value is the negative Log of the EC_{50} of agonist and the maximal relaxation (E_{max}) reported was obtained in the presence of the maximal concentration of the agonist. Statistical differences between means were determined by Student's t -test. A probability value <0.05 was accepted as significant for differences between 2 groups of data. An ANOVA followed by a Scheffé's F test was used for multiple comparisons.

CHEMICALS

The following drugs were purchased from Sigma Chemical Co (St-Louis, MO): ACH, indomethacin, N^{ω} -nitro-L-arginine (L-NNA), forskolin and PHE. ET-1 was purchased from American Peptide Company (Sunnyvale, CA). Chelerythrine chloride and cyclosporine A were purchased from Cedarlane Laboratories Ltd (Ontario, Can). All drugs were dissolved in PSS except for indomethacin, forskolin and cyclosporine A, which were dissolved in ethanol at a final dilution of 0.1%.

RESULTS

Effect of ET-1 on ISO-induced relaxation. We examined the influence of the pre-constricting agent on ISO-induced relaxation of isolated rabbit intact aorta. Vascular sensitivity to ISO was not modified by ET-1 as compared to PHE (Figure 1 and Table 1). In contrast, the efficacy (E_{\max}) of ISO-induced relaxation was greater ($P < 0.05$) in the presence ET-1 as compared to PHE (Figure 1, Table 1). Removal of the endothelium did not alter the permissive effect of ET-1 on ISO-induced relaxation (Figure 1, Table 1). All subsequent experiments were performed in denuded arterial segments.

Pre-treatment of denuded arterial rings with BQ788 (5 μ M; ET_B receptor antagonist; $n = 7$) did not alter ET-1-induced pre-contraction (1400 \pm 52 mg versus 1696 \pm 84 mg in the absence of BQ788). Neither the pD_2 (8.11 \pm 0.21) nor the E_{\max} (50 \pm 3 %) were altered compared to control responses ($n = 13$; 7.58 \pm 0.33 and 42 \pm 5 %, respectively).

Effect of ET-1 on forskolin-induced vasorelaxation. To determine whether ET-1 increased cAMP-dependent relaxation by activating adenylate cyclase, the influence of ET-1 on the relaxation mediated by forskolin was studied. Neither the potency nor the efficacy of forskolin to induce relaxation of denuded aorta were influenced by ET-1 as compared to vessels pre-contracted with PHE (Figure 2, Table 2).

Influence of chelerythrine and cyclosporine on ISO-induced relaxation. To investigate the involvement of the PKC in the permissive effect of ET-1 on ISO-induced relaxation, arterial rings were pre-treated with chelerythrine (1 μ M). The PKC inhibitor increased the efficacy of ISO in the presence of PHE (Table 1) but not ET-1, without affecting vascular sensitivity to ISO. Chelerythrine neither altered potency nor efficacy of forskolin (Table 2).

Alternatively, ET-1-dependent activation of the calcineurin-dependent β -AR recycling pathway may facilitate relaxation to ISO. Blockade of this pathway with cyclosporine (10 μ M) however, altered neither vascular sensitivity nor efficacy to ISO in the presence of PHE and ET-1 (Table 1).

DISCUSSION

In this study, we examined the influence of ET-1 on β -AR-mediated vasorelaxation. Our data demonstrates that ET-1 increases the efficacy of ISO, but not forskolin, to induce endothelium-independent smooth muscle relaxation as compared to PHE. The permissive effect of ET-1 on ISO-induced relaxation appears to be mediated through activation of smooth muscle ET_A receptors, which directly interact with β -AR / G protein complex to promote ISO-induced relaxation. Neither chelerythrine (PKC antagonist) nor cyclosporine (inhibitor of the calcineurin-dependent β -AR recycling pathway) prevented the effects of ET-1.

The contraction of vascular smooth muscle induced by ET-1 is determined by the activation of receptors coupled to inositide-specific phospholipase C via members of the G_q family of the G proteins. This leads to the production of IP_3 and DAG (Somlyo, 1985) and thereby mobilisation of intracellular Ca^{2+} and activation of PKC. In contrast, relaxation of vascular smooth muscle mediated by β -AR activation relies on adenylate cyclase stimulation. Stimulation of the enzyme by ISO increases cAMP, which activates PKA to evoke vasodilation. Consequently, receptors linked to phospholipase C or adenylate cyclase have opposing effects on the vascular smooth muscle cell, and interactions between these pathways could be important in the regulation of vascular tone.

The most important result of this study is the observation that ISO induced a greater maximal relaxation of aortic rings pre-contracted with ET-1 as compared to rings pre-contracted with PHE (Figure 1). To our surprise, however, the level of interaction was limited to the β -AR / G protein complex since none of the pre-constricting agents influenced forskolin-induced relaxation. Forskolin is a direct activator of adenylate cyclase, which when fully activated produced maximal relaxation of aortic rings (Table 2).

It has been previously reported that in cultured vascular smooth muscle cells, chronic ET-1 receptor activation increased β -AR density and adenylate cyclase activity (Brehm et al., 1998; 2000). Angiotensin II (ANG II), which receptors couple to G_q proteins, has also the ability to enhance cAMP formation in response to ISO (Nabika et al., 1985; Kubalak & Webb., 1993; McCumbee et al., 1996). Accordingly, ANG II enhances maximal relaxation to ISO without affecting its potency but also to iloprost and forskolin (Brizzolara-Gourdie & Webb., 1996; Shutzer et al., 2000). Hence, ET-1 clearly differs from ANG II since it did not affect the relaxation induced by forskolin.

Since ET-1 did not alter vascular sensitivity to ISO but increased its efficacy, it is likely that ET-1 increased β -AR / G protein coupling to adenylate cyclase. The mechanism by which ET-1 enhances smooth muscle relaxation to ISO remains, however, unknown. The permissive effect of ET-1 on ISO-induced relaxation is mediated by activation of smooth muscle ET_A receptors since blockade of ET_B receptors did not alter this

property of ET-1. Two known pathways, which could be regulated by ET-1, may contribute to this phenomenon. First, ET-1 could increase relaxation to ISO by activating the PKC pathway. Chelerythine, a potent PKC inhibitor (Herbert et al., 1990) did not prevent ET-1 from increasing ISO-induced relaxation (Table 1). Other studies reported that PKC inhibition by staurosporin partially attenuated the enhancing action of ANG II on ISO-induced cAMP production (Baukal et al., 1994; Kubalak & Webb., 1993) whereas calphostin C and chelerythrine abolished it (Mokkapatti et al., 1998). Hence, ET-1-dependent activation of the PKC pathway does not account for the increase in efficacy of ISO in the rabbit aorta. In contrast, chelerythrine increased the efficacy of ISO in the presence of PHE. It seems therefore that PHE activates the PKC pathway and reduces β -AR coupling to adenylate cyclase. Cross-talks between G_{α_q} -linked receptors, like α_1 -AR, and β -AR have been reported by others. Winstel and collaborators (1996) found that activation of PKC by G_{α_q} -coupled receptors directly phosphorylated β -AR kinase (β -ARK) leading to β_2 -AR desensitisation (Bouvier et al., 1991; Lemire et al., 1998). Recent studies have also demonstrated that activation of α_1 -AR inhibits β -AR-mediated modulation of cardiac Cl^- and Ca^{2+} channels (Chen et al., 1996, Oleksa et al., 1996). β -AR-mediated stimulation of adenylate cyclases is reduced by over-expression of α_1 -AR, and it has been proposed that both heterologous desensitisation and alterations in receptor coupling could play a role in the

desensitisation of β -AR induced by PHE (Akhter et al., 1997). Although ET-1 is a known potent PKC activator (Henrion & Laher, 1993), this pathway does not desensitise β -AR signalling pathway in the rabbit aorta.

A second pathway that could influence β -AR-mediated relaxation is the rate of recycling of the receptors. ET-1 could increase relaxation to ISO by activating the Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin (Klee et al., 1998), a protein responsible for β -AR resensitisation (Shih & Malbon., 1996). Cyclosporine A, a calcineurin inhibitor, did not, however, affect ISO-induced relaxation whether the vessels were pre-contracted with ET-1 or with PHE. Baukal and colleagues (1994) found that the permissive effect of ANG II on agonist-induced cAMP production was blocked by cyclosporine A in rat adrenal glomerulosa cell. Hence, there are differences between the two peptides. The permissive effect of ET-1 on ISO-induced relaxation needs to be further investigated. This interaction could prove to be important in regulating coronary blood flow during exercise in atherosclerotic patients. In these patients indeed, we reported that ET_A receptors are desensitised. During exercise, even moderate, catecholamines increase and contribute to coronary blood flow regulation: whereas β -AR-dependent “feed-forward” dilation tends to increase blood flow, α_1 -AR activation constricts coronary vessels and limits their dilation (Gorman et al., 2000). In conditions where ET_A receptors are desensitised,

the “feed-forward” dilation would be blunted and the α_1 -AR-dependent contraction amplified. This hypothesis needs to be tested.

In conclusion, our results suggest that ET-1 enhances ISO-induced relaxation. This mechanism appears to be PKC- and calcineurin-independent. The permissive effect of ET-1 directly targets smooth muscle β -AR coupling to adenylate cyclase and, most likely, increases the ability of ISO to activate the enzyme.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP 14496), the Heart and Stroke Foundation of Québec, la Fondation pour la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal and the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome. Eric Thorin is a research scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada.

REFERENCES

- Akhter, S.A., Milano, C.A., Shotwell, K.F., Cho, M.C., Rockman, H.A. Lefkowitz, R.J. & Kock, W.J. (1997). Transgenic mice with cardiac overexpression of α_{1B} -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21253-21259.
- Baukal, A.J., Hunyady, L., Catt, K.J. & Balla, T. (1994). Evidence for participation of calcineurin in potentiation of agonist-stimulated cyclic AMP formation by the calcium-mobilizing hormone, angiotensin II. *J. Biol. Chem.*, **269**, 24546-24549.
- Bouvier, M., Guilbault, N. & Bonin, H. (1991). Phorbol-ester-induced phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor decreases its coupling to Gs. *FEBS. Lett.*, **279**, 243-248.
- Brehm, B.R., Zvizdic, M., Bernhard, R., Hoffmeister, H.M., Wolf, S.C. & Karsch, K.R. (1998). Dynamic regulation of β -adrenergic receptors by endothelin-1 in smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31**, S77-S80.
- Brehm, B.R., Heinle, H., Risler, T. & Wolf, S.C. (2000). Chronically elevated endothelin-1 concentration modulate the β -adrenergic receptor system in vitro and in vivo. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, S157-S159.
- Brizzolara-Gourdie, A. & Webb, J.G. (1997). Angiotensin II potentiates vasodilation of rat aorta by cAMP elevating agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **281**, 354-359.

Calogero, A.E., Burrello, N. & Ossine, A.M. (1998). Endothelin (ET)-1 and ET-3 inhibit estrogen and cAMP production by granulosa cells in vitro. *J. Endocrinol.*, **157**, 209-215.

Chen, L., el-Sherif, N. & Boutjdir, M. (1996). Alpha 1-adrenergic activation inhibits beta-adrenergic-stimulated unitary Ca^{2+} currents in cardiac ventricular myocytes. *Cir. Res.*, **79**, 184-193.

Chuang, T.T., Iacovelli, L., Sallese, M. & DeBlasi, A. (1996). G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **17**, 416-421.

Delpy, E., Coste, H. & Le Monnier De Gouville, A.C. (1996). Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 471-478.

Domae, M., Yamada, K., Inoue, T., Satoh, M. & Fukawa, T. (1994). Endothelins stimulate cyclic AMP accumulation in the isolated rat anterior pituitary gland: possible involvement of ET_A receptor activation and prostaglandin E_2 production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 55-60.

El-Mowafy, A.M. & Abdel-Latif, A.A. (1994). Characterization of iris sphincter smooth muscle endothelin receptor subtypes which are coupled to cyclic AMP formation and polyphosphoinositide hydrolysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 1343-1351.

Ferro, A., Queen, L.R., Priest, R.M., Xu, B., Ritter, J.M., Poston, L. & Ward, J.P.T. (1999). Activation of nitric oxide synthase by β -

adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1872-1880.

Gilbert, P. & Thorin, E. (2001). Endothelium-derived endothelin-1 reduces cerebral artery sensitivity to NO by a PKC-independent pathway. *Stroke.*, In press.

Gorman, M.W., Tune, J.D., Richmond, K.N. & Feigl, E.O. (2000). Quantitative analysis of feedforward sympathetic coronary vasodilation in exercising dogs. *J. Appl. Physiol.* 2000, **89**, 1903-1911.

Grace, G.C., Macdonald, P.S. & Dusting, G.J. (1988). Cyclic nucleotide interactions involved in endothelium-dependent dilatation in rat aortic rings. *Eur. J. Pharmacol.*, **148**, 17-24.

Graves, J. & Poston, L. (1993). β -adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 631-637.

Gray, D.W. & Marshall, I. (1992). Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent β -adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **107**, 684-690.

Henrion, D. & Laher, I. (1993). Potentiation of norepinephrine-induced contractions by endothelin-1 in the rabbit aorta. *Hypertension*, **22**, 78-83.

Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J. & Maffrand, J.P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 993-999.

Hicks, M., Shigekawa, M. & Katz, A.M. (1979). Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Cir. Res.*, **44**, 384-391.

Hilal-Dandan, R., Urasawa, K. & Brunton, L.L. (1992). Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10620-10624.

Kamata, K., Mitayata, N. & Kasuya, Y. (1989). Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**, 890-894.

Klee, C.B., Ren, H. & Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13367-13370.

Kubalak, S.W. & Webb, J.G. (1993). Angiotensin II enhancement of hormone-stimulated cAMP formation in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, **264**, H86-H96.

Ladoux, A. & Frelin, C. (1991). Endothelins inhibit adenylate cyclase in brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 169-173.

Lemire, I., Allen, B.G., Rindt, H. & Hebert, T.E. (1998). Cardiac-specific overexpression of α_{1B} AR regulates β AR activity via molecular crosstalk. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **30**, 1827-1839.

Macdonald, A., McLean, M., MacAulay, M. & Shaw, A.M. (1999). Effects of propranolol and L-NAME on β -adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. *J. Auton. Pharmacol.*, **19**, 145-149.

MacDonald, P.S., Dubbin, P.N. & Dusting, G.J. (1987). β -adrenoceptors on endothelial cells do not influence release of relaxing factor in dog coronary arteries. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*, **14**, 525-534.

McCumbee, W.D., Hickey, V.L. & Mangiarua, E.I. (1996). Interactions between angiotensin II and adenosin 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of amino acid transport by vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 173-181.

Mokkapatti, R., Subhash, J.V., Guillermo, G.R., Zaichuan, M.I., Inoue, T., Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Stout, A.K. & Jackson, E.K. (1998). Modulation by angiotensin II of isoproterenol-induced cAMP production in preglomerular microvascular smooth muscle cells from normotensive and genetically hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 223-231.

Molenaar, P., Malta, E., Jones, C.R., Buxton, B.R. & Summers, R.J. (1988). Autoradiographic localisation and function of β -adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.*, **95**, 225-233.

Moncada, S., Rees, D.D., Schulz, R. & Palmer, R.M.J. (1991). Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 2166-2170.

Nabika, T., Nara, Y., Yamori, Y., Lovenberg, W. & Endo, J. (1985). Angiotensin II and phorbol ester enhance isoproterenol-and vasoactive

intestinal peptide (VIP)-induced cyclic AMP accumulation in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 30-36.

Oda, K., Fujitani, Y., Watakabe, T., Inui, T., Okada, T., Urade, Y., Okuda-Ashitaka, E. & Ito, S. (1992). Endothelin stimulates both cAMP formation and phosphatidylinositol hydrolysis in cultured embryonic bovine tracheal cells. *FEBS Lett.*, **299**, 187-91.

Oleksa, L.M., Hool, L.C. & Harvey, R.D. (1996). Alpha 1-adrenergic inhibition of the beta-adrenergically activated Cl⁻ current in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.*, **78**, 1090-1099.

Parent, R., Al-Obaidi, M. & Lavallée, M. (1993). Nitric oxide formation contributes to β -adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circ. Res.*, **73**, 241-251.

Priest, R.M., Hucks, D. & Ward, J.P.T. (1997). Noradrenaline, β -adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 1375-1384.

Reid, J.J., Lieu, A.T. & Rand, M.J. (1991). Interactions between endothelin-1 and other chronotropic agents in rat isolated atria. *Eur. J. Pharmacol.*, **194**, 173-181.

Rubanyi, G. & Vanhoutte, P.M. (1985). Endothelium-removal decreases relaxations of canine coronary arteries caused by β -adrenergic agonistes and adenosine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**, 139-144.

Shih, M. & Malbon, C.C. (1996). Protein kinase C deficiency blocks recovery from agonist-induced desensitization. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21478-21483.

Schutzer, W.E., Xue, Hong., Reed, J.F., Roulet, J.B., Anderson, S. & Mader, S.L. (2000). Angiotensin II enhances β -adrenergic receptor-mediated vasorelaxation in aortas from young but not old rats. *Am. J. Physiol.*, **279**, H2807-H2814.

Simonson, M.S. & Dunn, M.J. (1990). Endothelins stimulates contraction of rat glomerular cells and potentiates β -adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J. Clin. Invest.*, **85**, 790-797.

Somlyo, A.V., Bond, M., Somlyo, A.P. & Scarpa, A. (1985). Inositol triphosphate induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 5231-5235.

Tada, M. & Katz, A.M. (1982). Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu. Rev. Physiol.*, **44**, 401-423.

Thorin, E., Huang, P.L., Fishman, M.C. & Bevan, J.A. (1998a). Nitric oxide inhibits α_2 -adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ. Res.*, **82**, 1323-1329.

Thorin, E., Cernacek, P. & Dupuis, J. (1998b). Endothelin-1 regulates tone of isolated small arteries in the rat: effect of hyperendothelinemia. *Hypertension*, **31**, 1035-1041.

Toyoshima, H., Nasa ,Y., Hashizume, Y., Koseki ,Y., Isayama, Y., Kohsaka, Y., Yamada, T. & Takeo, S. (1998). Modulation of cAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **32**, 543-551.

Wegener, A.D., Simmerman, H.K., Lindermann, J.P. & Jones, L.R. (1989). Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11468-11474.

Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. & Lohse, M.J. (1996). Protein kinase cross-talk: Membrane targeting of the β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 2105-2109.

Wong, P.Y.D. & Huang, S.J. (1990). Secretory agonists stimulate a rise in intracellular cyclic AMP but not Ca^{2+} and inositol phosphates in cultured rat epidemial epithelium. *Exp. Physiol.*, **75**, 321-337.

Wu-Wong, J.R. & Opgenorth ,T.J. (1998). Endothelin and isoproterenol counter-regulate cAMP and mitogen-activated protein kinases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31**, S185-S191.

Table 1. pD₂ values and maximal relaxation (E_{max}, %) to ISO of aortic rings with or without endothelium pre-contracted (mg) with PHE (30 μM) or ET-1 (30 nM). Experiments were performed in the presence of chelerythrine (1 μM) and cyclosporine A (10 μM).

Experimental Conditions	<i>n</i>	pD ₂	E _{max}	Level of Pre-contraction (mg)
<i>PHE pre-contraction</i>				
+ Endothelium	8	6.70 ± 0.50	25 ± 3	2081 ± 298
- Endothelium	11	7.48 ± 0.27	23 ± 4	2001 ± 149
+ Chelerythrine	8	7.01 ± 0.13	50 ± 4*	1725 ± 97
+ Cyclosporine A	6	7.55 ± 0.55	16 ± 2	1871 ± 117
<i>ET-1 pre-contraction</i>				
+ Endothelium	7	7.21 ± 0.17	45 ± 7†	1764 ± 141
- Endothelium	13	7.58 ± 0.33	42 ± 5†	1696 ± 84
+ Chelerythrine	7	8.56 ± 0.38*†	57 ± 9	1944 ± 179
+ Cyclosporine A	5	7.44 ± 0.18	42 ± 1†	1495 ± 151

All solutions contained indomethacin (10 μM). Results are means ± SEM. *: P < 0.05 versus “-Endothelium”; †: P < 0.05 versus PHE pre-contraction;

Table 2. pD_2 values and maximal relaxation (E_{max} , %) to forskolin of vessels without endothelium pre-contracted (mg) with PHE (30 μ M) or ET-1 (30 nM). Experiments were performed in the absence and in the presence of chelerythrine (1 μ M).

Experimental Conditions	<i>n</i>	pD_2	E_{max}	Level of Pre-contraction (mg)
<i>PHE pre-contraction</i>				
- Endothelium	7	6.73 \pm 0.53	99 \pm 1	1488 \pm 93
+ Chelerythrine	4	6.49 \pm 0.14	91 \pm 7	1704 \pm 113
<i>ET-1 pre-contraction</i>				
- Endothelium	5	7.28 \pm 0.32	93 \pm 7	1493 \pm 121
+ Chelerythrine	5	6.50 \pm 0.35	95 \pm 3	1397 \pm 211

All solutions contained indomethacin (10 μ M). Results are means \pm SEM.

Figure legends

Figure 1. Influence of ET-1-induced pre-contraction on the reactivity to ISO of aortic rings. Experiments were performed on vessels with and without (- E) endothelium and pre-contracted with PHE (n = 8 and 11, respectively) or ET-1 (n = 7 and 13, respectively). All solutions contained indomethacin (10 μ M). ET-1 significantly increased the maximal relaxation with or without (-E) as compared to PHE. Results are means \pm SEM.

Figure 2. Influence of ET-1-induced pre-contraction on the reactivity of aortic rings to forskolin. Experiments were performed on vessels without endothelium and pre-contracted with PHE (n = 7) or ET-1 (n = 5). All solutions contained indomethacin (10 μ M). Results are means \pm SEM.

Figure 1

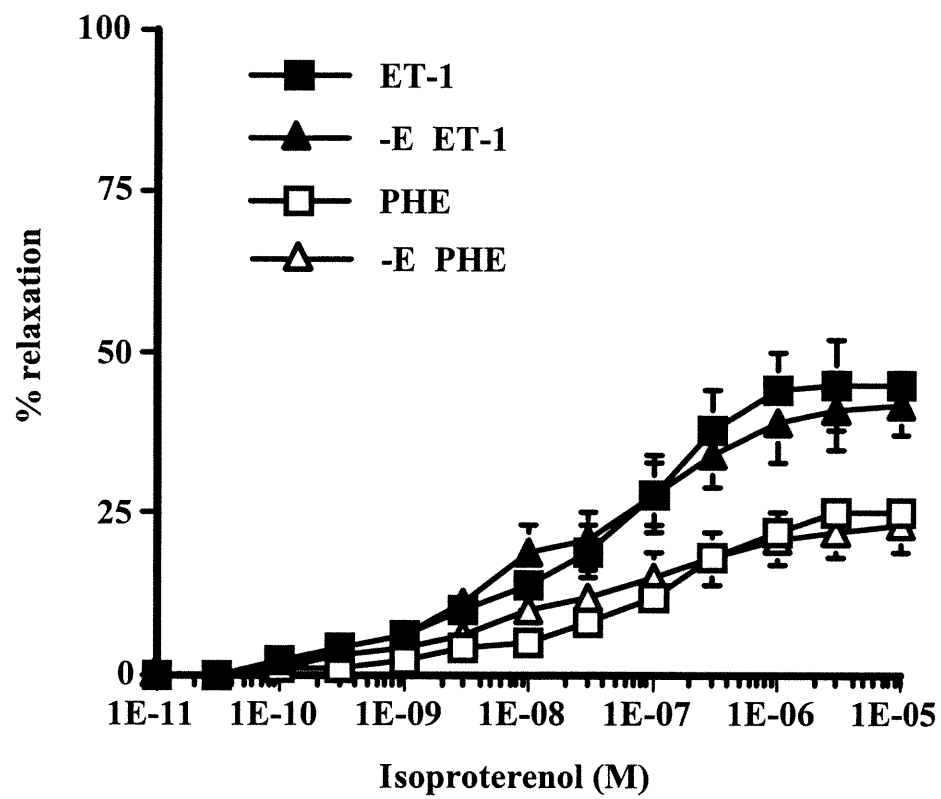
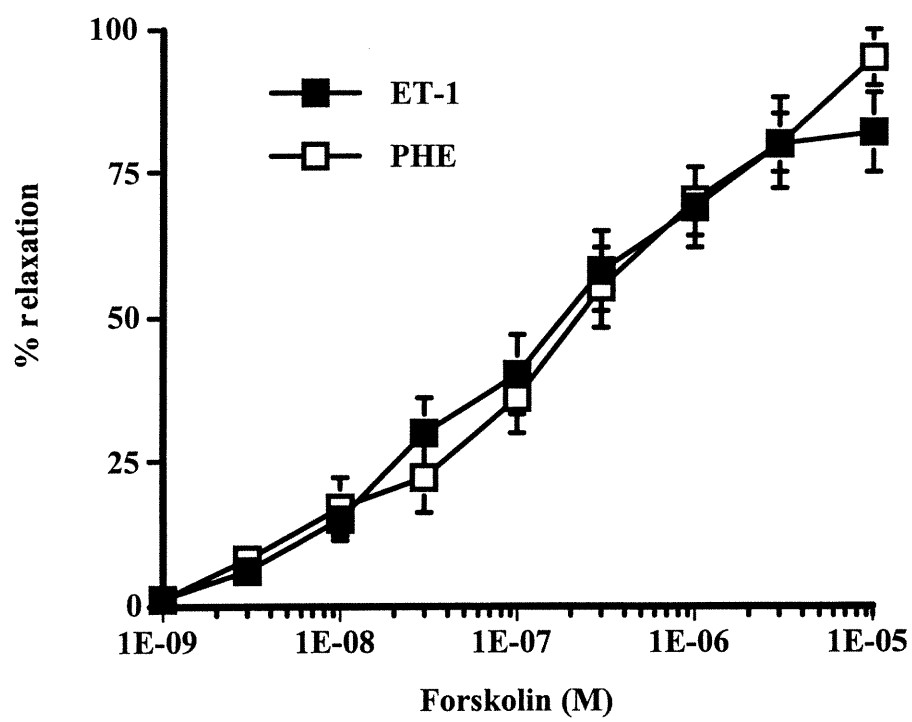


Figure 2



5-DISCUSSION

5.1 Relation ET-1/GMPc et ET-1/AMPc

5.1.1 ET-1/GMPc

L'endothélium vasculaire joue un rôle important dans le contrôle et le maintien du tonus vasculaire grâce à la synthèse de facteurs dilatateurs et constricteurs tels le NO et l'ET-1. Il a été démontré que le NO pouvait contrecarrer la production et les effets proconstricteurs de l'ET-1 par un mécanisme qui est dépendant du GMPc⁷⁹. Cependant, aucune étude n'a démontré une interaction possible entre l'ET-1 et la régulation de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO en condition physiologique.

Nous avons testé l'hypothèse que l'ET-1 modulait la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO. Nos résultats confirment cette hypothèse. En effet, sur des vaisseaux sans endothélium précontractés à l'ET-1, la sensibilité vasculaire au SNP est diminuée lorsque comparée à celle obtenue à partir de segments artériels pré-contractés par une solution dépolarisante. Nous avons aussi observé sur des vaisseaux intacts et pré-contractés avec une solution dépolarisante contenant 40 mM de KCl, une augmentation de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO

endogène et exogène libéré par l'ACH et le SNP, respectivement, en présence de BQ123, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET_A (Figure 1 et 2, p.62-63 et Tableau I et II, p.58-59). L'effet de l'ET-1 est lié à l'activation des récepteurs ET_A, puisqu'aucun changement n'est observé en présence de BQ788, un antagoniste sélectif des récepteurs ET_B (Tableau I et II, p.58-59 et Figure 1 et 2, p.62-63).

L'effet modulateur de l'ET-1 engendré par les récepteurs ET_A semble être spécifique pour le NO puisque le BQ123 n'affecte pas la relaxation dépendante de l'AMPc produite par la forskoline, un activateur direct de l'adénylate cyclase, ainsi que celle dépendante du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) induit par l'ACH en présence de LNNA et d'indométhacine (Tableau I, p.58 et Figure 3, p.64). L'ET-1 endogène influence donc la sensibilité de la guanylate cyclase du muscle lisse vasculaire.

Par quel mécanisme l'ET-1 peut-elle réguler la sensibilité de cette enzyme? Des études ont démontré que l'ET-1 pouvait produire des anions superoxydes en activant une oxydase de type NAD(P)H¹⁴⁰. Afin d'identifier le rôle que pouvaient jouer les radicaux libres dans la régulation de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO, nous avons pré-traité les artères par la SOD (superoxyde dismutase) en combinaison avec la catalase afin d'inactiver les anions superoxydes. L'utilisation de

cette combinaison enzymatique n'a cependant pas eu d'effet sur la sensibilité vasculaire au SNP (Tableau II, p.58). Il est à noter que les études impliquant la voie des radicaux libres dans la diminution de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO ont été réalisées en conditions pathologiques où le stress oxydatif était augmenté ^{100, 141}. Par conséquent, il semble que les radicaux libres soient augmentés dans certaines pathologies vasculaires et affectent la relaxation au NO. Toutefois, leur implication en condition physiologique reste limitée dans nos conditions expérimentales.

L'ET-1 pourrait diminuer la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO suite à l'activation de la PKC. En effet, en conditions pathologiques, Soloviev et collaborateurs ¹⁴² ont observé que l'atténuation de la relaxation dépendante de l'endothélium manifestée sur des segments aortiques de rat spontanément hypertendus (SHR) était due à la diminution de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO résultant d'une augmentation de l'activité de la PKC. Cependant, la chélérythrine, un inhibiteur spécifique de la PKC, n'a pas influencé la sensibilité vasculaire au NO dépendant ou non de l'endothélium (Tableaux I et II, p.58-59). De plus, la chélérythrine n'a pas affecté la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO précontracté à l'ET-1. En résumé, ces données suggèrent que l'activation de la PKC par l'ET-1 n'est pas impliquée dans la réduction de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO. Il apparaît

donc que ni les radicaux libres ni l'activation de la voie de la PKC expliquent la régulation de la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO par l'ET-1.

Une explication possible pourrait être que l'ET-1, par son action vasoconstrictrice, augmenterait les niveaux de pré-contraction et diminuerait les effets vasodilatateurs du NO. Cependant, cette possibilité doit être exclue car dans toutes nos conditions expérimentales, les niveaux de pré-contraction étaient les mêmes. De plus, on constate que cet effet est spécifique pour la voie du GMPc: or, si l'action de l'ET-1 était due à une augmentation de la vasoconstriction, l'effet de l'ET-1 serait généralisé à tous les facteurs vasodilatateurs dépendants ou non de l'endothélium. Ce mécanisme est donc indépendant de l'endothélium et l'amélioration de la relaxation au NO en présence d'un bloqueur des récepteurs ET_A ne peut donc pas être assimilée à une amélioration de la fonction endothéliale mais plutôt à une plus grande efficacité vasodilatatrice du muscle lisse vasculaire. L'ET-1, par un mécanisme inconnu, pourrait favoriser l'activation d'une phosphodiesterase accélérant la dégradation du GPMc, expliquant l'amélioration de la relaxation du muscle lisse vasculaire au NO en présence du BQ123. Cette hypothèse pourrait être testée lors d'expériences ultérieures.

5.1.2 Relation ET-1/ β -AR

La vasoconstriction du muscle lisse vasculaire par l'ET-1 est déterminée par l'activation des récepteurs ET_A qui couplés à la phospholipase C conduit à la production d' IP_3 et de DAG. Par opposition, la relaxation du muscle lisse vasculaire produite par l'activation des récepteurs β -adrénergiques est associée à la stimulation de l'adénylate cyclase et à une augmentation des niveaux d'AMPc activant la PKA. Les récepteurs couplés à la phospholipase C ou à l'adénylate cyclase ont donc des effets opposés sur le muscle lisse vasculaire, et les interactions entre ces différentes voies pourraient influencer le tonus vasculaire.

Dans cette étude, nous avons examiné l'influence de L'ET-1 sur la relaxation du muscle lisse vasculaire à l'isoprotérénol (ISO), un agoniste β -adrénergique. Les résultats obtenus ont démontré que l'ET-1 augmente l'efficacité de l'ISO à induire la relaxation du muscle lisse vasculaire. En effet, la relaxation maximale induite par cet agoniste est augmentée lorsque les vaisseaux sont précontractés à l'ET-1 comparativement aux vaisseaux précontractés à la PHE (Tableau I, p.90 et Figure 1, p.93). De plus, cet effet est indépendant de l'endothélium et spécifique au complexe protéine G/récepteur β -adrénergique puisque la relaxation produite par la forskoline, un activateur direct de l'adénylate cyclase, n'a pas été

influencée par l'ET-1 (Tableau II, p.91 et Figure 2, p.94). L'effet facilitateur induit par l'ET-1 sur la relaxation dépendante de l'activation du récepteur β -adrénergique semble donc être dû à l'augmentation du couplage de l'adénylate cyclase au récepteur β -adrénergique/protéine G.

Des études de cultures cellulaires ont démontré l'effet permissif de l'ET-1 sur la formation d'AMPc, entre autre en augmentant la densité des récepteurs β -adrénergiques¹⁵⁰⁻¹⁵¹ et l'activité de l'adénylate cyclase^{133, 135}. Toutefois, dans notre étude, nous ne pouvons pas attribuer le changement de densité des récepteurs β -adrénergiques sur nos vaisseaux *in vitro* puisque l'effet que l'on observe par l'ET-1 se produit en moins de 30 minutes, tandis que l'augmentation des récepteurs β -adrénergiques se produit au moins en 24 heures¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

Les mécanismes par lesquels l'ET-1 augmente la relaxation du muscle lisse vasculaire à l'ISO restent toutefois inconnus. Des études ont démontré que la voie de la PKC serait impliquée dans la resensibilisation des récepteurs β -adrénergiques¹³⁷⁻¹³⁹. En effet, l'angiotensine II permet une augmentation des niveaux d'AMPc *in vitro* et ceci est bloqué par un inhibiteur de la PKC^{137, 138, 143}. La chélerythrine n'a pas prévenu l'effet facilitateur de l'ET-1 sur la relaxation du muscle lisse vasculaire à l'ISO. L'inhibition de la PKC a par contre augmenté l'efficacité de l'ISO sur les

vaisseaux pré-constrictés par la PHE (Tableau I, p.90). Il a été démontré que les récepteurs α_1 -adrénergiques, activés par la PHE, pouvaient désensibiliser les récepteurs β -adrénergiques par phosphorylation selon un mécanisme dépendant de la PKC¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Nos résultats confirment donc que la PKC activée par les récepteurs α_1 -adrénergiques désensibilise les récepteurs β -adrénergiques. Bien que l'ET-1 soit un puissant activateur de la PKC, il semble que cette protéine activée par l'ET-1 ne désensibilise pas les récepteurs β -adrénergiques sur les artères de conductance. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'ET-1 active un isoforme de la PKC qui est différent de celui activé par la PHE ou de manière plus probable, cela reflète un niveau de compartimentalisation intracellulaire des voies de signalisation élevé.

Une autre voie qui pourrait expliquer l'effet facilitateur de l'ET-1 sur la relaxation induite par l'activation des récepteurs β -adrénergiques passe par l'activation de la calcineurine. Cette phosphatase est impliquée dans la resensibilisation des récepteurs β -adrénergiques^{137, 139}. Il a été démontré en effet que l'angiotensine II pouvait augmenter les niveaux d'AMPC et que ceci était bloqué par un inhibiteur de la calcineurine¹³⁷. La cyclosporine A, un inhibiteur de cette phosphatase, n'a pas affecté la relaxation vasculaire à l'ISO sur les vaisseaux préconstrictés à l'ET-1 et à la PHE (Tableau I, p.90).

Il apparaît donc que l'effet facilitateur de l'ET-1 sur la relaxation du muscle lisse vasculaire à l'ISO est un phénomène indépendant de la PKC et de la calcineurine. L'effet de l'ET-1 semble être dirigé sur le couplage de l'adénylate cyclase/récepteur β -adrénergique favorisant ainsi une augmentation de l'activité de cette enzyme. Mais comment l'ET-1 peut favoriser un meilleur couplage du récepteur à son effecteur? Une hypothèse possible pourrait être que le complexe calcium-calmoduline agirait au niveau des récepteurs β -adrénergiques et favoriserait une augmentation du couplage récepteur-effecteur. Une étude de Kubalak et collaborateur ¹³⁸ démontre que l'utilisation d'un inhibiteur de la calmoduline ou même d'un chélateur de calcium diminuent l'augmentation d'AMPc induite par l'ISO en présence d'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses. Cependant, dans notre modèle de vaisseaux isolés, il est impossible d'éliminer le calcium ou d'inhiber la calmoduline car ceux-ci sont des éléments essentiels de leur contraction.

5.2 Significations physiologiques

L'endothéline est un puissant vasoconstricteur qui joue un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire en conditions physiologiques. Nos résultats montrent que l'ET-1 diminue les effets relaxants du NO en agissant directement sur le muscle vasculaire. Un inhibiteur des récepteurs ET_A non seulement dilate en bloquant les récepteurs musculaires mais également en améliorant la relaxation de ce muscle au NO. Il existe plusieurs pathologies cardiovasculaires associées à une augmentation de l'ET-1 circulante. Dans toutes ces pathologies, un tel traitement pourrait améliorer la relaxation du muscle lisse vasculaire et augmenter la perfusion sanguine.

Nous avons également observé que l'ET-1 favorisait une augmentation de la relaxation β -adrénergique. Ceci pourrait avoir des conséquences sur la régulation de la circulation coronaires notamment lors de l'exercice chez des patients athérosclérotiques. Dans les artères coronaires de ces patients la sensibilité des récepteurs ET_A est diminuée¹⁴⁴. Lors de l'exercice, il y a une augmentation des catécholamines qui contribue à la régulation de la circulation coronarienne en favorisant la dilatation des artères épocardiques. Il y a donc d'une part, l'activation des récepteurs β -adrénergiques qui tend à augmenter le débit coronarien et

d'autre part, l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques qui limite cette dilatation ¹⁴⁵. Dans l'athérosclérose où les récepteurs ET_A sont désensibilisés, la relaxation β -adrénergique serait réduite et la réponse vasoconstrictrice produite par l'activation des récepteurs α_1 -adrénergique serait amplifiée. Cette hypothèse reste cependant à être vérifiée. Enfin, nous avons observé que l'inhibition des récepteurs ET_A favorisait la relaxation au NO. Il serait donc possible d'améliorer la relaxation du muscle lisse vasculaire dépendante du NO chez des patients athérosclérotiques ¹⁴⁴.

5.3 Pertinences et limites du modèle expérimental

L'utilisation de vaisseaux isolés peut toujours être remise en question. Il est évident que les conditions *in vivo* sont trop complexes pour nous permettre des études pharmacologiques et physiologiques précises. L'avantage de notre modèle réside donc dans la possibilité de réaliser des études en isolant des facteurs très précis soit pharmacologiquement (grâce à l'indométhacine, les antagonistes et les bloqueurs enzymatiques) soit mécaniquement (suppression de l'endothélium).

Une suite logique des études présentées dans ce mémoire serait donc de vérifier *in vivo* quelques une des hypothèses mises en avant dans notre discussion. Par exemple, est-ce que les effets des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 améliorent la fonction endothéliale (augmentent la production de NO) ou, comme le suggèrent nos résultats, la sensibilité du muscle vasculaire au NO? Est-ce que l'inhibition de ces récepteurs améliorerait la perfusion coronarienne en rétablissant la sensibilité ET_A favorisant ainsi la dilatation -adrénergique, selon un mode identique à celui des β -bloqueurs dans la défaillance cardiaque?

Il est donc clair que les études réalisées sur les artères isolées n'ont qu'une signification physiologique limitée. Cependant, elles

permettent d'élaborer des concepts physiologiques qui peuvent être ensuite validés *in vivo*.

6-CONCLUSION

L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur dérivé de l'endothélium. Nous avons démontré que ce peptide peut jouer un rôle très important dans le contrôle du tonus vasculaire en conditions physiologiques. En effet, au niveau du muscle lisse d'artères cérébrales, l'ET-1, par l'activation de son récepteur ET_A, diminue la sensibilité du muscle lisse vasculaire au monoxyde d'azote. Nous avons également démontré que l'ET-1 pouvait avoir un effet modulateur sur la relaxation vasculaire à l'ISO un agoniste β -adrénergique, au niveau soit des artères de conduction, soit de l'aorte chez le lapin. En effet, l'ET-1 favorise le couplage de l'adénylate cyclase au récepteur β -adrénergique/protéine G. Dans tous les cas, il semble que l'effet de l'ET-1 au niveau des artères cérébrales et de conduction soit indépendant de la voie de la PKC. Étant donné que l'ET-1 est un puissant activateur de cette protéine, il est intéressant de constater si l'effet modulateur de l'ET-1, qu'il soit positif ou négatif, implique une autre voie qu'il serait intéressant d'approfondir lors d'études ultérieures.

7-REFERENCES

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 299: 373-376.
2. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.
3. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-666.
4. Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. 1991; 7(4): 615-624.
5. Dinerman JL, Loverstein CJ, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Relevance to cardiovascular disease. *Circ. Res.* 1993; 73: 217-222.
6. Busse R, Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth and muscle cells. *FEBS. Lett.* 1991; 275: 87-90.
7. Xie Q, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric

- oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992; 256: 225-228.
8. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985; 232(3): 708-716.
 9. Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.* 1989; 96(2): 418-424.
 10. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 153(3): 1251-1260.
 11. Furchgott RF, Zawadzki JV. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. *Cir. Res.* 1983; 53: 557-573.
 12. Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood vessels*. 1990; 27 (2-5): 218-229.
 13. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: H1145-H1149.
 14. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The antiaggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1987; 92: 639-646.

15. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 1983; 306(5939): 174-176.
16. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. Clin. Invest.* 1986; 78(1): 1-5.
17. Gruetter CA, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite. *Can. J. Pharmacol.* 1981 ; 59(2) : 150-156.
18. Fiscus RR, Rapoport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced activation of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat aorta. *J. Cyclic. Nucleotide. Protein. Phosphor. Res.* 1983; 9(6): 415-425.
19. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 1991; 40 : 923-931.
20. Karczewski P, Hendrichke T, Wolf-Peter W, Maorano I, Bartel S, Schrader J. Phosphorylation of phospholamban correlates with relaxation of coronary artery induced by nitric oxide, adenosine, and prostacyclin in the pig. *J. Cell. Biochem.* 1998 ; 70 : 49-59.
21. Blatter LA, Wier WG. Nitric oxide decreases Ca^{2+}_i in vascular smooth muscle by inhibition of calcium current. *Cell Calcium.* 1994 ; 15 : 122-131.

22. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1993 ; 265 : C299-C303.
23. Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994 ; 91 : 7583-7587.
24. Furukawa K, Ohsima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. Cyclic GMP stimulates Na^+/Ca^+ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266 : 12337-12341.
25. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension.* 1990;15(5): 486-492.
26. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; 86(9): 3375-3378.
27. Arnal J, Warin L, Michel J. Determinants of aortic cyclic GMP in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 647-652.
28. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arterial tone in man. *Lancet.* 1989; 2: 997-1000.

29. Packer M, Lee W, Kessler PD, Gottlieb SS, Medina N, Yushak M. Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 799-804.
30. Zimrin D, Reichek N, Bogin KT, Aurigemma G, Douglas P, Berko B, Fung HL. Antianginal effects of intravenous nitroglycerin over 24 hours. *Circulation.* 1988; 77: 1376-1384.
31. Packer M. What causes tolerance to nitroglycerin? The 100 years of mystery continues. *J. Am. Coll. Card.* 1990; 16: 932-935.
32. Feelisch M, Kelm M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 190: 286-293.
33. Molina CR, Andresen JW, Rapoport RM, Waldman S, Murad F. Effect of in vivo nitroglycerin therapy on endothelium-dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 198; 10: 371-378.
34. Packer JO, Parker JD. Neurohormonal activation during nitrate therapy: a possible mechanism for tolerance. *Am. J. Cardiol.* 1992; 70: 24.
35. Kurz S, Hinf U, Nickenig G, Borthayre AB, Harrison DG, Münzel T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation.* 1999; 99: 3181-3187.

36. Münzel T, Giaid A, Kurz S, Stewart DJ, Harrison DG. Evidence for a role of endothelin-1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 5244-5248.
37. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxidase to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976; 263: 663-665.
38. Parsaee H, Mc Ewan JR, Sunil J, Dermot MC J. Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107: 1013-1019.
39. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 1979; 30: 293-331.
40. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* 1990; 259: C3-C18.
41. Nishiye E, Nakao K, Itoh T, Kuriyama H. Factors inducing endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig basilar artery as estimated from the actions of haemoglobin. *Br. J. Pharmacol.* 1989; 96: 645-655.
42. Komori K, Suzuki H. Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circ. Res.* 1987; 61: 586-593.

43. Keef KD, Bowen SM. Effect of ACh on electrical and mechanical activity in guinea pig coronary arteries. *Am.J. Physiol.* 1997; 257: H1096-H1103.
44. Petersson J, Zygmunt PM, Brandt L, Högestätt ED. Substance P-induced relaxation and hyperpolarization in human cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 115: 889-894.
45. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1997; 18: 252-256.
46. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolic in mammals. *J. Physiol. (Lond).* 1994; 481: 407-414.
47. Campell WB, Gerbremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* 1996; 78: 415-423.
48. Chen G, Cheung DW. Modulation of endothelium-dependent hyperpolarizing and relaxation to acetylcholine in rat mesenteric artery by cytochrome P450 enzyme activity. *Cir. Res.* 1996; 79: 827-833.
49. Corriu C, Feletou M, Vanhoutte PM. Inhibitors of the cytochrome P450-monooxygenase and endothelium-dependent hyperpolarizations in the guinea-pig isolated carotid artery. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 117: 607-610.

50. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarizing by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 439-446.
51. Jiang F, Li CG, Rand MJ. Mechanisms of nitric oxide-independent relaxations induced by carbachol and acetylcholine in rat isolated renal arteries. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 130: 1191-1200.
52. Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, Davis SC, Hogestätt ED. Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 118: 1147-1152.
53. Chen G, Suzuki H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarizing recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.* 1989; 410: 91-106.
54. Ayotunde SO, Adeagbo ASO, Triggle CR. Varying extracellular $[K^+]$: a functional approach to separating EDHF-and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; 21: 423-429.
55. Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1995; 16: 23-30.
56. Zygmunt PM, Hogestätt ED. Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 117: 1600-1606.

57. Kitagawa S, Yamaguchi Y, Kunitomo M, Sameshima E, Fujiwara M. N^G-nitro-L-arginine-resistant endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in the rabbit renal artery. *Life. Sci.* 1994; 55: 491-498.
58. Prieto D, Simonssen U, Hernandez M, Garcia-Sacristan A. Contribution of K⁺ channels and ouabain-sensitive mechanism to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123: 1609-1620.
59. Standen NB, Quayle JM, Davies NM, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science.* 1989; 245: 177-180.
60. Brayden JE. Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilatation. *Am. J. Physiol.* 1990; 259: H668-H673.
61. Garcia-Pascual A, Labadia A, Jimenez E, Costa G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K⁺ conductance. *Br. J. Pharmacol.* 1995 ; 115 : 1221-1230.
62. Murphy ME, Brayden JE. Apamin-sensitive K⁺ channels mediated an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J. Physiol.* 1995; 489: 723-734.
63. Kanmura Y, Itoh T, Kuriyama H. Mechanisms of vasoconstriction induced by 9,11-epithio-11, 12-methano-thromboxane A₂ in the rabbit coronary artery. *Cir. Res.* 1987; 60: 402-409.

64. Smith JB, Araki H, Lefer AM. Thromboxane A₂, prostacyclin and aspirin: effects on vascular tone and platelet aggregation. *Circulation*. 1980; 62 (suppl V): 19-25.
65. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxyde anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factors. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: H822- H827.
66. Yangisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163): 411-415.
67. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol.Rev.* 1994; 46: 328-415.
68. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB. J.* 1990; 4: 2989-3000.
69. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989; 86: 2863-2870.
70. Minkes RK, Higuera TR, Rogers GF, Sheldon EA, Langston MA, Kadowitz PJ. Cardiovascular responses to vasoactive intestinal contractor, a novel endothelin-like peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989; 86: 2863-2870.

71. Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990; 348: 732-735.
72. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaus S, DeWit D, Yanadisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*. 1994; 78: 473-485.
73. Ikegawa R, Matsumura Y, Tsukahara Y, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, suppresses the secretion of endothelin-1 from cultured endothelial cells by inhibiting a big endothelin-1 converting enzyme. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1990; 171: 669-75.
74. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper S, Parzer S, Nowotny PJ, et al.. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 1992; 267: 16066-16068.
75. Haynes WG. Endothelins as regulators of vascular tone in man. *Clin. Sci.* 1995;88:509-517.
76. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*. 1996; 94: 1578-1584.
77. Resink TJ, Hahn AW, Scott-Burden T, Powll J, Weber E, Buhler FR. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168: 1303-1310.

78. Kohno M, Yasunari K, Yotokawa K, Murakawa K, Horio T, Takeda T. Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin II and thrombin of cultured human endothelial cells. *J.Clin. Invest.* 1991 ; 87(6) : 199-2004.
79. Boulanger C, Lüscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J.Clin. Invest.* 1990; 85: 587-590.
80. Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *Lancet.* 1988; 1: 205.
81. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325: 997-1001.
82. Miyauchi T, Yanagisawa T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet.* 1989; 1: 53-54.
83. Grenier O, Komajda M, Maistre G. Endothelin plasma concentration is increased in chronic congestive heart failure. *Circulation.* 1990; 82:381.
84. Asano T, Ikegaki I, Suzuki Y, Satoh SI, Shibuya M. Endothelin and the production of cerebral vasospasm in dogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 159: 1345-1351.

85. Miller LW, Redfield MM, Burnett JC Jr. Integrated cardiac renal, and endocrine action of endothelin. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 317-320.
86. Goetz KL, Wang BC, Madwed JB, Zhu JL, Leadley RJ. Cardiovascular, renal and endocrine responses to intra-venous endothelin in conscious dogs. *Am.J.Physiol.* 1988; 255: R1064-R1068.
87. Yang ZH, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Luscher TF. Threshold concentrations of endothelin-a potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm? *Circulation.* 1990; 82 (1): 188-195.
88. Matsumura Y, Fujita K, Miyazaki Y, Takaola M, Morimoto S. Involvement of endothelin-1 in deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and cardiocascular hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; 26: S456-S458.
89. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi A, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M et al. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS. Lett.* 1991; 287: 23-26.
90. Takayanagi R, Kitazumi K, Takasaki C, Ohnaka K, Aimoto S, Tasaka K, Ohashi M, Nawata H. Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular enndothelium and its linkage to vasodilatation. *FEBS. Lett.* 1991 ; 282(1) : 103-106.
91. Clozel M, Gray GA, Breu V, Loffler BM, Osterwalder R. The endothelin ETB receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992 ; 186(2) : 867-873.

92. Simonson MS, Wann S, Mene P et al. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J.Clin.Invest.* 1990; 85: 708-712.
93. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 1984 ; 312(5992) : 315-321.
94. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhaüst W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation.* 1990; 81: 1415-1418.
95. Haynes W, Webb D. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet.* 1994; 344: 852-854.
96. Lüscher TF, Yang Z, Von Segesser L et al. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ.Res.* 1990; 66: 1088-1094.
97. Richard V, Hogie M, Clozel M, Loffler BM, Thuillez C. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Circulation.* 1995; 91(3): 771-775.
98. Thorin E, Lucas M, Cernacek P, and Dupuis J. Role of ETA receptor in the regulation of vascular reactivity in rats with congestive heart failure. *Am J Physiol.* 2000; 279: H844-H851.
99. Moncada S, Rees DD, Schulz R, and Palmer RMJ. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis *in vivo.* *Proc Natl Acad Sci.USA.* 1991; 88: 2166-2170.

100. Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, and Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 1995; 95: 187-194.
101. Thorin E, Meerkin D, Bertrand OF, Paiement P, Joyal M, and Bonan R. Influence of post-angioplasty β -irradiation on endothelial function in porcine coronary arteries. *Circulation.* 2000; 101: 1430-1435.
102. Ahlquist RP. Present state of alpha-and beta-adrenergic drugs I. The adrenergic receptor. *Am. Heart. J.* 1976; 92(5): 661-664.
103. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 615-649.
104. Mueller E, van Breemen C. Role of intracellular Ca^{2+} sequestration in beta-adrenergic relaxation of a smooth muscle. *Nature.* 1979; 281: 682-683.
105. Walsh DA, Van Patten SM. Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB. J.* 1994; 8: 1227-1236.
106. Wegener AD, Simmerman HK, Lindermann JP, Jones LR. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 11468-11474.

107. Hicks M, Shigekawa M, Katz AM. Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Cir.Res.* 1979; 44: 384-391.
108. Tada M, Katz AM. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu. Rev. Physiol.* 1982 ; 44 : 401-423.
109. Iyer RB, Koritz SSB, Kirchberger MA. A regulation of the level of phosphorylated phospholamban by inhibitor-1 in rat heart preparations in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1988 ; 55(1) : 1-6.
110. Adelstein RS, Conti MA, Pato MD. Regulation of myosin light chain kinase by reversible phosphorylation and calcium-calmodulin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980 ; 356 : 142-150.
111. Sellers JR, Spudich JA, Sheetz MP. Light chain phosphorylation regulates the movement of smooth muscle myosin on actin filaments. *J. Cell. Biol.* 1985 ; 101 : 1897-1902.
112. Dabrowska R, Sherry JMF, Aromatorio DK, Hartshorne DJ. Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. *Biochemistry.* 1978 ; 17 : 253-258.
113. Adelstein RS, Klee CB. Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 1981 ; 256(14) : 7501-7509.

114. James P, Inui M, Tada M, Ciesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*. 1990; 342: 90-92.
115. Grace GC, Macdonald PS, Dusting GJ. Cyclic nucleotide interactions involved in endothelium-dependent dilatation in rat aortic rings. *Eur.J.Pharmacol.* 1988; 148: 17-24.
116. Kamata K, Mitayata N, Kasuya Y. Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1989; 249: 890-894.
117. Gray DW, Marshall I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent β -adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br.J.Pharmacol.* 1992; 107: 684-690.
118. Delpy E, Coste H, Le Monnier De Gouville AC. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br.J.Pharmacol.* 1996; 119: 471-478.
119. Rubanyi G, Vanhoutte PM. Endothelium-removal decreases relaxations of canine coronary arteries caused by β -adrenergic agonistes and adenosine. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1985; 7: 139-144.
120. Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, Ward JPT. Activation of nitric oxide synthase by β -adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br.J.Pharmacol.* 1999; 126: 1872-1880.

121. Toyoshima H, Nasa Y, Hashizume Y, Koseki Y, Isayama Y, Kohsaka Y, Yamada T, Takeo S. Modulation of cAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1998; 32: 543-551.
122. Graves J, Poston L. β -adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br.J.Pharmacol.* 1993; 108: 631-637.
123. Parent R, Al-Obaidi M, Lavallee M. Nitric oxide formation contributes to β -adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circ.Res.* 1993; 73: 241-251.
124. Priest RM, Hucks D, Ward JPT. Noradrenaline, β -adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 122: 1375-1384.
125. Macdonald A, McLean M, MacAulay, Shaw AM. Effects of propranolol and L-NAME on β -adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. *J.Auton.Pharmacol.* 1999; 19: 145-149.
126. MacDonald PS, Dubbin PN, Dusting GJ. β -adrenoceptors on endothelial cells do not influence release of relaxing factor in dog coronary arteries. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 1987; 14: 525-534.
127. Molenaar P, Malta E, Jones CR, Buxton BR, Summers RJ. Autoradiographic localisation and function of β -adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. *Br.J.Pharmacol.* 1988; 95: 225-233.

128. Reid JJ, Lieu AT, Rand MJ. Interactions between endothelin-1 and other chronotropic agents in rat isolated atria. *Eur.J.Pharmacol.* 1991; 194: 173-181.
129. Ladoux A, Frelin C. Endothelins inhibit adenylate cyclase in brain capillary endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991; 180: 169-173.
130. Calogero AE, Burrello N, Ossine AM. Endothelin (ET)-1 and ET-3 inhibit estrogen and cAMP production by granulosa cells in vitro. *J.Endocrinol.* 1998; 157: 209-215.
131. Hilal-Dandan R, Urasawa K, Brunton LL. Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 1992; 267: 10620-10624.
132. Wu-Wong JR, Opgenorth TJ. Endothelin and isoproterenol counter-regulate cAMP and mitogen-activated protein kinases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 31: S185-S191.
133. Domae M, Yamada K, Inoue T, Satoh M, Fukawa T. Endothelins stimulate cyclic AMP accumulation in the isolated rat anterior pituitary gland: possible involvement of ET_A receptor activation and prostaglandin E₂ production. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1994; 270: 55-60.
134. Wong PYD, Huang SJ. Secretory agonists stimulate a rise in intracellular cyclic AMP but not Ca²⁺ and inositol phosphates in cultured rat epidemial epithelium. *Exp.Physiol.* 1990; 75: 321-337.

135. Simonson MS, Dunn MJ. Endothelins stimulates contraction of rat glomerular cells and potentiates β -adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J.Clin.Invest.* 1990; 85: 790-797.
136. Frielle T, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ. Structural basis of β -adrenergic receptor subtype specificity studies with chimeric β_2/β_2 -adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988 ; 85 : 9494-9498.
137. Baukal AJ, Hunyady L, Catt KJ, Balla T. Evidence for participation of calcineurin in potentiation of agonist-stimulated cyclic AMP formation by the calcium-mobilizing hormone, angiotensin II. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 24546-24549.
138. Kubalak SW, Webb JG. Angiotensin II enhancement of hormone-stimulated cAMP formation in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: H86-H96.
139. Shih M. , Malbon CC. Protein kinase C deficiency blocks recovery from agonist-induced desensitization. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 21478-21483.
140. Heitzer T., Wenzel U., Hink U., Krollner D., Skatchkov M., Stahl RAK., Macharzina R., Bräsen JH., Meinertz T., Münzel T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney.* 1999; 55: 252-260.

141. Bauersachs J., Bouloumié A., Mülsh A., Wiemer G., Fleming I., Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc.Res.* 1998; 37: 772-779.
142. Soloviev A.I., Parshikov A.V., Stefanov A.V. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats. *J.Vasc.Res.* 1998; 35: 325-331.
143. Mokkapatti R., Subhash J.V., Guillermo G.R., Zaichuan M.I., Inoue T., Dubey R.K., Gillespie D.G., Stout A.K. & Jackson E.K.. Modulation by angiotensin II of isoproterenol-induced cAMP production in preglomerular microvascular smooth muscle cells from normotensive and genetically hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 287: 223-231.
144. Thorin E. Influence of nitric oxide synthase inhibition and endothelin-1 receptor blockade on acetylcholine-induced coronary artery contraction in vitro in dilated and ischemic cardiomyopathies. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001; 38: 90-98
145. Gorman M.W., Tune J.D., Richmond K.N., Feigl E.O. Quantitative analysis of feedforward sympathetic coronary vasodilation in exercising dogs. *J. Appl. Physiol.* 2000; 89: 1903-1911.
146. Akhter S.A., Milano C.A., Shotwell K.F., Cho M.C., Rockman H.A. Lefkowitz R.J., Kock W.J. Transgenic mice with cardiac

overexpression of α_{1B} -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 21253-21259.

147. Bouvier M., Guilbault N., Bonin H. Phorbol-ester-induced phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor decreases its coupling to Gs. *FEBS. Lett.* 1991; 279: 243-248.
148. Lemire I., Allen B.G., Rindt H., Hebert T.E. Cardiac-specific overexpression of α_{1B} AR regulates β AR activity via molecular crosstalk. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1998; 30: 1827-1839.
149. Winstel R., Freund S., Krasel C., Hoppe E., Lohse M.J. Protein kinase cross-talk: Membrane targeting of the β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 2105-2109.
150. Brehm B.R., Zvizdic M., Bernhard R., Hoffmeister H.M., Wolf S.C., Karsch, K.R. Dynamic regulation of β -adrenergic receptors by endothelin-1 in smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 31: S77-S80.
151. Brehm B.R., Heinle H., Risler T., Wolf S.C. Chronically elevated endothelin-1 concentration modulate the β -adrenergic receptor system in vitro and in vivo. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000; 36: S157-S159.