

2m11.2808.4

Université de Montréal

***Étude pharmacologique d'un analogue des peptides sécrétagogues
d'hormone de croissance (GHRP), le EP 70905
dans le coeur de rat perfusé***

par

Audrey Perreault

Faculté de Pharmacie

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

Avril 2000

©Audrey Perreault, 2000



458085 2015

10/10/2015

Étude pharmacologique d'un analogue des peptides sérotoninerges

d'interaction de connexion (GABA), les

QV
705
N58
2000
N. 011

Avant l'essai

Étude de l'interaction

Étude pharmacologique d'un analogue des peptides sérotoninerges

Étude de l'interaction de connexion (GABA), les



10/10/2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

*Étude pharmacologique d'un analogue de type GHRP, le EP 70905
dans le coeur de rat perfusé*

présenté par:

Audrey Perreault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Céline Fiset	présidente du jury
Louis Dumont	membre du jury
Huy Ong	directeur
Daniel Lamontagne	codirecteur

Mémoire accepté le : 7 avril 2000

SOMMAIRE

Il est maintenant bien établi que les GHRPs constituent une classe de peptides synthétiques stimulant la sécrétion de l'hormone de croissance par interaction avec leur récepteur spécifique au niveau hypophysaire. Ce récepteur constitué de 364 acides aminés appartient à la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G. Il est exprimé non seulement au niveau de l'hypophyse mais également au niveau de l'hypothalamus, des noyaux arqués et paraventriculaires. Récemment, il a été découvert par étude de photomarquage covalent que l'hexarelin, un hexapeptide de la famille des GHRPs se lie de façon spécifique à une glycoprotéine membranaire de poids moléculaire de 84 kDa exprimée dans les membranes de coeur de rat. La liaison de l'hexarelin à ce récepteur au niveau cardiaque induit une forte vasoconstriction coronarienne de façon dose-dépendante dans le modèle de coeur de rat perfusé.

Les buts de la présente étude sont premièrement de déterminer si la liaison est spécifique seulement à l'hexarelin ou à d'autres analogues peptidiques de la famille des GHRPs, notamment le dérivé EP 70905. Dans un deuxième temps nous déterminerons si les analogues se liant au récepteur cardiaque des GHRPs exercent un effet vasoconstricteur sur les coronaires utilisant le modèle de cœur de rat perfusé. Troisièmement nous caractériserons les voies de signalisation impliquées dans la vasoconstriction induite par les GHRPs.

Les études de compétition entre le radioligand photoactivable [¹²⁵I-Tyr-Ala-Bpa-hexarelin et le EP 70905 effectuées sur les membranes de cœur de rat démontrent une affinité de liaison comparable du EP 70905 et de l'hexarelin au récepteur cardiaque des GHRPs. Cependant, le EP 70905 induit une augmentation de la pression coronarienne significativement plus élevée que celle induite par l'hexarelin.

Les études des voies de signalisation démontrent que les tyrosine kinases ne semblent pas être impliquées dans la vasoconstriction induite par le EP 70905, puisque la perfusion simultanée avec la génistéine n'affecte pas la vasoconstriction induite par ce peptide. Le rôle de l'endothéline endogène dont la libération est stimulée par le EP 70905 semble être mineur dans la vasoconstriction observée considérant les taux femtomolaires d'endothéline libérés dans le perfusat. De plus, la perfusion simultanée d'un antagoniste des récepteurs d'endothéline, le LU 302872 affecte que faiblement la vasoconstriction induite par le EP 70905. Par contre, la vasoconstriction coronarienne induite par le EP 70905 est inhibée de façon majeure suite à la perfusion de la nifédipine, un bloqueur des canaux calciques de type L. La perfusion simultanée d'un inhibiteur de la protéine kinase C, la chébérythrine affecte de façon significative la vasoconstriction induite par le EP 70905.

TABLE DES MATIÈRES

Page titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abbréviations.....	xii
Dédicace.....	xv

REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

LES PEPTIDES SÉCRÉTAGOGUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE

(GHRPs)

1.1 L'axe neuro-endocrinien.....	1
1.1.1 L'axe hypothalamo-hypophysaire.....	1
1.2 Les régulateurs de la sécrétion de l'hormone de croissance.....	7
1.2.1 Hormones hypothalamiques.....	7
1.2.2 Régulation de GH par rétroaction négative.....	9
1.2.3 Les peptides sécrétagogues de l'hormone de croissance (GHRPs).....	11
1.2.3.1 Sécrétagogues peptidiques de l'hormone de croissance..	12
1.2.3.2 Sécrétagogues non-peptidiques de l'hormone de croissance.....	16
1.2.3.3 Sécrétagogues peptidomimétiques de l'hormone de croissance.....	16

1.2.3.4 Récepteurs au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus.....	20
1.2.3.5 Récepteurs au niveau périphérique.....	23
1.2.3.6 Voies de signalisation des GHRPs.....	26
1.2.3.7 Actions biologiques des GHRPs.....	29
1.2.3.8 Mécanismes d'action des GHRPs.....	30
1.2.3.9 L'aspect thérapeutique des GHRPs.....	33
1.2.3.10 Effets et perspectives dans des conditions pathologiques.....	35

CHAPITRE 2

LA CONTRACTION MUSCULAIRE LISSE VASCULAIRE

2.0 La contraction du muscle lisse vasculaire.....	37
2.1 Les voies effectrices empruntées par les protéines G.....	38
2.1.1 Phospholipases C	38
2.2 Les seconds messagers.....	39
2.2.1 L'IP ₃	39
2.2.2 Diacylglycérol.....	39
2.3 Les canaux ioniques du muscle lisse vasculaire.....	40
2.3.1 Les canaux calciques.....	40
2.3.1.1 Source intracellulaire de calcium.....	41
2.3.1.1.1 La relâche de calcium intracellulaire par l'IP ₃	41
2.3.1.1.2 La relâche de calcium intracellulaire sensible au calcium.....	41
2.3.1.2 Source extracellulaire de calcium.....	41
2.3.1.2.1 Les canaux calciques sensibles au voltage.....	42

2.4 Les protéines kinases.....	45
2.4.1 Les protéines kinases C.....	45
2.4.2 Les kinases des chaînes légères de myosine	47
2.4.3 Les tyrosine kinases.....	47
2.4.3.1 JAK et TYK.....	48
2.4.3.2 Famille SRC kinases.....	48
2.4.3.3 Interaction des récepteurs couplés aux protéines G et certains récepteurs avec activité tyrosine kinases.....	49
2.5 Fonctionnement et régulation de l'appareil contractile.....	49
2.6 L'endothélium vasculaire.....	53
2.6.1 L'endothéline.....	53
2.6.1.1 Effets et mécanismes d'action sur les cellules musculaires lisses Vasculaires.....	55
Le projet de recherche.....	58

CHAPITRE 3

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Cardiovascular effect of EP 70905, a new hormone releasing peptide analog

Title.....	58a
Abstract.....	59
Introduction.....	60
Methods.....	61
Isolated heart preparation.....	61
Experimental protocol with Langendorff hearts.....	62
Endothelin assay.....	62
Membrane preparation.....	63
Iodination of Tyr-Bpa-Ala-Hexarelin.....	63

Receptor binding and photolabelling with [125 I]-tyr-Bpa-Ala-Hexarelin...	64
Chemical.....	64
Data analysis.....	65
Results.....	66
Competition of Hexarelin and EP 70905 for the binding of [125 I]-tyr-Bpa-Ala-Hexarelin in rat cardiac membranes.....	66
Change in coronary perfusion pressure.....	66
Signalling pathways involved in the vasoconstriction.....	67
Discussion.....	69
References.....	74
Figure legends.....	80
Figures.....	81
<u>CHAPITRE 4</u>	
DISCUSSION	87
<u>CHAPITRE 5</u>	
CONCLUSION.....	95
<u>CHAPITRE 6</u>	
REMERCIEMENTS.....	96
<u>CHAPITRE 7</u>	
BIBLIOGRAPHIE.....	98

Liste des figures

À l'intérieur de la revue de littérature

Chapitre 1

- Figure 1.** Coupe transversale du cerveau comprenant le diencephale et le télencéphale3
- Figure 2. A.** L'hypothalamus en relation avec l'hypophyse
B. Circulation portale transportant les facteurs relâchés par l'hypothalamus, au lobe antérieur de l'hypophyse.....6
- Figure 3.** Régulation et actions de l'hormone de croissance.....10
- Figure 4.** Séquence d'acides aminés du récepteur des GHRPs de type 1a.....22
- Figure 5. A.** Voies de signalisation activées par un ligand (GHRP) qui interagit avec le récepteur des GHRPs..... 28
B. GHRH et GHRP agissant sur des récepteurs différents et induisant des voies de signalisation différentes.....28
- Figure 6.** Possibles lieux d'action des GHRPs au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse.....32

Chapitre 2

- Figure 7.** Les principaux systèmes mobilisant le Ca^{2+} de la cellule musculaire lisse.....44
- Figure 8.** Régulation de la contractilité par phosphorylation/déphosphorylation de la myosine.....50

À l'intérieur de l'article scientifique

Chapitre 3

- Figure 1.** Courbes de compétition de l'hexarelin et du EP 70905 avec le ligand [^{125}I]Tyr-Bpa-Ala-hexarelin dans des membranes cardiaques de rat.....81
- Figure 2.** Comparaison entre les changements de pression coronaire (en mmHg) induit par 10 μ M de EP 70905 (n=17) et d'hexarelin (n=29) *p<0.05....82

- Figure 3.** Courbes dose-réponse à l'angiotensine II (panneau de gauche) et au EP 70905 (panneau de droite) en absence (cercles) et en présence (triangles) de 10 μ M de génistéine *différence significative.....83
- Figure 4.** Courbes dose-réponse à l'endothéline-1 (panneau de gauche) et au EP 70905 (panneau de droit) en absence (cercles) et en présence (triangles) de 1 μ M de LU 302 872 * $p < 0.05$84
- Figure 5.** Endothéline immune (en fM) dans l'effluent coronaire durant l'infusion d'une concentration croissante de EP 70905 en comparaison avec la valeur de base * $p < 0.05$85
- Figure 6.** Courbes dose-réponse au EP 70905 en absence (cercles) et en présence (triangles plein) de 1 μ M de nifédipine et 1 μ M de chélérythrine (triangles vides) * $p < 0.05$86

Liste des tableaux

CHAPITRE 1:

Tableau 1	Classe des GHRPs peptidiques.....	15
Tableau 2	Classe des GHRPs non-peptidiques.....	18
Tableau 3	Classe des GHRPs peptidomimétiques.....	19

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
ACTH	<i>Corticotrophin</i> , corticotrophine
ADH	Antidiurétique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Arg	Arginine
ATII	Angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Ca²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
Cl	Chlore
CRH	<i>Corticotrophin releasing hormone</i> , l'hormone de relâche de la corticotrophine
DAG	Diacylglycérol
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , facteur de croissance de l'épiderme
ET-1	Endothéline-1
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i> , l'hormone folliculostimulante
FM	<i>Family member</i> , membre de la famille
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate

GnRH	<i>Gonadotrophin releasing hormone</i> , l'hormone de relâche des gonadotrophines
GH	<i>Growth hormone</i> , hormone de croissance
GHRH	<i>Growth hormone releasing hormone</i> , l'hormone de la relâche de l'hormone de croissance
GHRP	<i>Growth hormone releasing peptide</i> , peptide sécrétagogue de l'hormone de croissance
GHS	<i>Growth hormone secrétagogues</i> , sécrétagogues de l'hormone de croissance
GHS-R	<i>Growth hormone secretagogue receptors</i> , récepteurs sécrétagogues de l'hormone de croissance
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
IGFs	<i>Insulin growth factors</i>
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
JAKs	Janus kinases
LH	<i>Luteinizing hormone releasing hormone</i> , l'hormone lutéinisante
Lys	Lysine
K⁺	Potassium
KCLM	Kinases des chaînes légères de myosine
MSH	<i>Melanocyte stimulating hormone</i> , l'hormone de la relâche de l'hormone mélanotrope
Na⁺	Sodium
NO	<i>Nitric oxyde</i> , oxyde nitrique
PAC	<i>P1 artificial chromosome</i> , chromosome artificiel P1

PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> , facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIP₂	Phosphatidylinositol-1,4,5-biphosphate
PLC	Phospholipase C
PKC	Protéine kinase C
PRF	<i>Prolactine factor</i> , l'hormone de la relâche de la prolactine
Ser	Sérine
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
Thr	Thréonine
Trp	Tryptophane
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> , facteur de croissance des tumeurs
TRH	<i>Thyrotrophin releasing hormone</i> , l'hormone de relâche de la thyrotrophine
TSH	<i>Thyrotrophin hormone</i> , thyrotrophine
Val	Valine

**À François qui a su m'encourager et
me supporter jusqu'à la fin et à mes
parents pour leurs précieux conseils
durant toutes ces années d'études...
Jamais je n'oublierai tout ce que
vous avez fait, Merci!!!!**

REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

LES PEPTIDES SÉCRÉTAGOGUES DE L'HORMONE DE CROISSANCE (GHRPs)

1.1. L'axe neuro-endocrinien

Les systèmes nerveux et endocrinien représentent les deux plus importants systèmes de régulation de l'organisme. Ces deux systèmes travaillent en synergie afin de coordonner l'activité cellulaire dont dépend l'homéostasie de l'organisme. La vitesse et les mécanismes d'action diffèrent d'un système à l'autre. Le système nerveux, par des influx, active les muscles et les différentes glandes. Le système endocrinien, quant à lui, permet la régulation de l'activité métabolique des cellules, par l'intermédiaire de glandes endocrines qui produisent des hormones. On définit sous l'appellation de glande endocrine: l'hypophyse, la thyroïde, la parathyroïde, les surrénales, le corps pinéal, le thymus et finalement les gonades et le pancréas. Les hormones sont des messagers chimiques qui sont directement déversées dans le sang grâce au drainage vasculaire des glandes endocrines. Bien que l'hypothalamus fasse partie intégrante du système nerveux, il produit aussi des hormones et peut donc être considéré comme un organe neuro-endocrinien. La dépendance de l'hypophyse envers l'hypothalamus afin d'exécuter ses fonctions est un bon exemple démontrant la coordination qui existe entre les systèmes nerveux et endocrinien. L'hypophyse, organe endocrinien, sécrète plusieurs hormones qui agissent au niveau des différents tissus de l'organisme. Elle peut effectuer ces fonctions seulement sous le contrôle de l'hypothalamus, intégré au système nerveux. C'est ce que l'on nomme l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cet axe est indispensable à l'équilibre de l'organisme.

1.1.1. L'axe hypothalamo-hypophysaire

L'hypothalamus illustré à la figure 1 et 2A, se retrouve à l'extrémité du tronc cérébral et il compose les parois et la base du troisième ventricule cérébral (1). Malgré sa petite taille, il représente le centre majeur de régulation des fonctions physiologiques et il est essentiel au bon maintien de l'homéostasie. On retrouve sous son influence la plupart des organes du corps. Les multiples fonctions de l'hypothalamus peuvent être divisées en deux

catégories: soit les fonctions endocriniennes et non-endocriniennes. Parmi ces dernières, on compte les centres du système nerveux autonome (SNA). Celui-ci régule la pression artérielle, la fréquence et la force des contractions cardiaques, la motilité du tube digestif, la fréquence et l'amplitude respiratoire, le diamètre pupillaire et de nombreuses autres activités viscérales. On compte aussi la régulation des réactions émotionnelles et du comportement, la température corporelle, l'apport alimentaire, l'équilibre hydrique et de la soif ainsi que la régulation du cycle veille-sommeil. D'autre part, par ses fonctions endocriniennes, l'hypothalamus peut par ces neurones, fabriquer des hormones telles que l'hormone antidiurétique (ADH) et l'ocytocine. Ces hormones sont transportées et emmagasinées dans les terminaisons axonales situées à l'intérieur de l'hypophyse postérieure. C'est lorsque les neurones hypothalamiques envoient des potentiels d'action que ces hormones sont libérées par exocytose à proximité d'un lit capillaire qui permettra de distribuer ces hormones dans tout l'organisme. De plus, l'hypothalamus possède une autre fonction endocrinienne importante qui consiste à contrôler la sécrétion d'hormones hypophysaires par ses transducteurs neuroendocriniens. Ces hormones libérées par l'hypothalamus peuvent activer ou inhiber la sécrétion des diverses hormones de l'hypophyse.

Il existe six transducteurs neuroendocriniens sécrétés par l'hypothalamus et qui permettent la relâche d'hormones au niveau de l'hypophyse: l'hormone de relâche des gonadotrophines (GnRH), l'hormone de relâche de la corticotrophine (CRH), l'hormone de la relâche de la thyrotrophine (TRH), l'hormone de relâche de l'hormone mélanotrope (MSH), l'hormone de relâche de la prolactine (PRF) et l'hormone de relâche de l'hormone de croissance (GHRH). Il existe aussi trois transducteurs neuroendocriniens inhibiteurs de la relâche d'hormones hypophysaires sécrétés par l'hypothalamus soit: la dopamine, la somatostatine (SRIH) et, finalement, l'hormone inhibant la relâche de l'hormone mélanotrope.

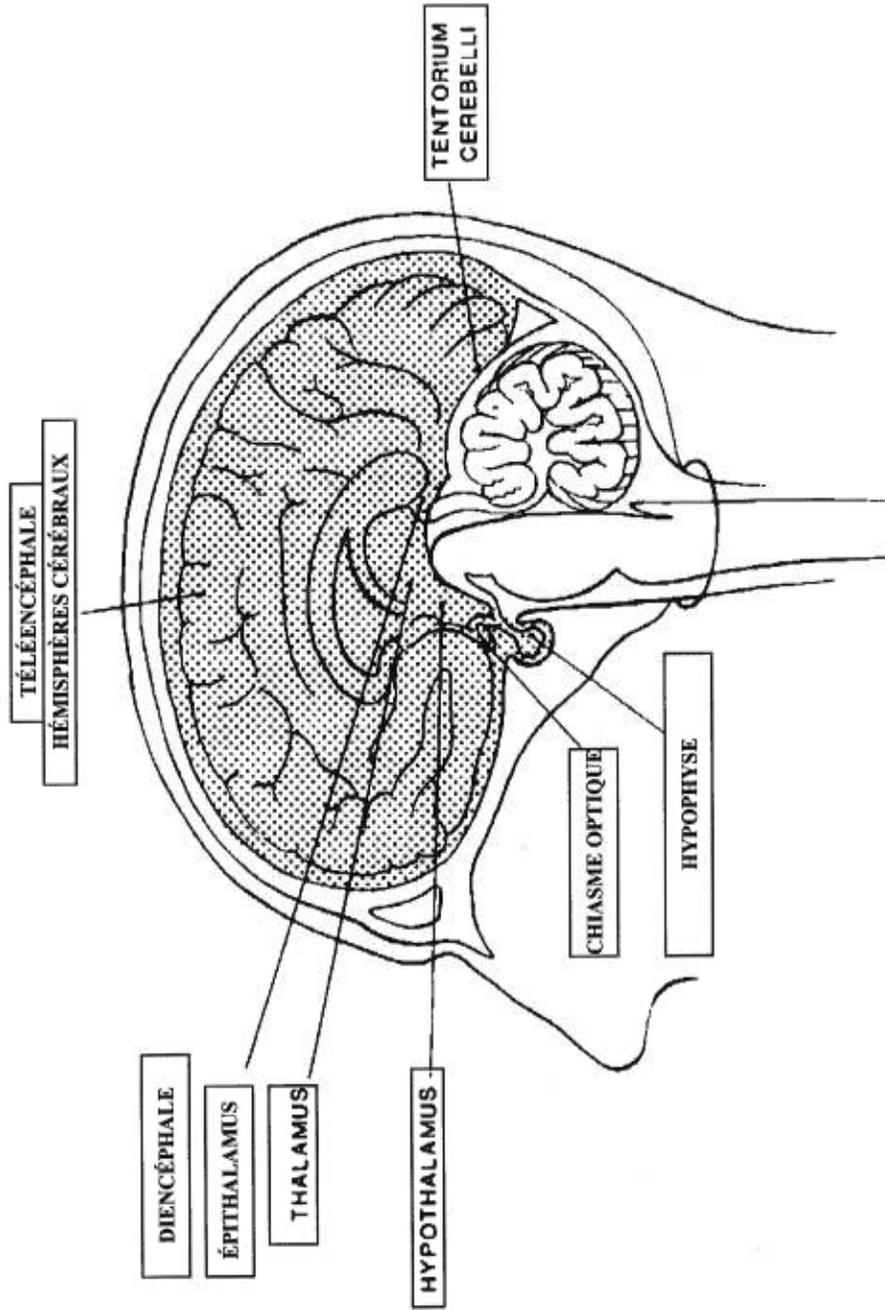


Figure 1. Coupe transversale du cerveau comprenant le diencéphale et le télencéphale.
Barbara F. Westmoreland, Medical Neurosciences 3ème édition, 1994, p.462.

L'hypophyse comme il a été mentionné plus haut, s'associe avec l'hypothalamus pour réguler la relâche d'hormones allant agir à des sites spécifiques de l'organisme. L'hypophyse est reliée à la partie inférieure de l'hypothalamus par une tige de tissus hypothalamique, l'infundibulum. Il est situé entre le chiasma optique et les corps mamillaires (Figure 1, 2A). L'hypophyse comprend deux lobes dont l'un est constitué de tissus nerveux et l'autre de tissu glandulaire. Le lobe postérieur, constitué de tissu nerveux est aussi appelé neurohypophyse. Comme mentionné précédemment, il est formé par les terminaisons axonales provenant des neurones hypothalamiques. Sa fonction est de libérer des hormones préfabriquées par l'hypothalamus (l'ocytocine et l'ADH) suite aux potentiels d'action émis par l'hypothalamus. Le lobe antérieur, ou adénohypophyse, est composé de cellules hormonopoïétiques et, contrairement au lobe postérieur, il produit lui-même plusieurs hormones. Ce sont les neurones de l'hypothalamus ventral qui, par différentes hormones de libération et d'inhibition, régulent les hormones sécrétées par l'adénohypophyse. Ces hormones produites par l'hypothalamus sont libérées tout près d'un réseau de capillaires appelé primaire. Les hormones hypothalamiques sont alors transportées par ce réseau (ou veines portes) jusqu'à l'adénohypophyse où elles vont stimuler ou inhiber la sécrétion d'hormones synthétisées par l'adénohypophyse. Ce même réseau de capillaires entourant l'adénohypophyse est appelé secondaire. Le lien qui relie l'adénohypophyse et l'hypothalamus n'est donc pas de type nerveux mais vasculaire. C'est par l'intermédiaire de ces veines portes que l'activité sécrétrice des cellules hormonopoïétiques est régulée. Les hormones de libération et d'inhibition sécrétées par les neurones de l'hypothalamus ventral, atteignent l'adénohypophyse par la même voie (Figure 2B) (2).

Il existe sept hormones adénohypophysaires qui sont sécrétées sous l'influence des hormones de libération et d'inhibition de l'hypothalamus: la thyrotrophine (TSH), la corticotrophine (ACTH), l'hormone folliculostimulante (FSH), la MSH, l'hormone

lutéinisante (LH), l'hormone de croissance (GH) et la prolactine (PRL). Le lobe antérieur de l'hypophyse est composé de cinq différents types cellulaires: les cellules lactotropes, thyrotropes, gonadotropes, corticotropes et somatotropes (3). Seules les cellules somatotropes qui contiennent les gènes de l'hormone de croissance et qui la sécrètent seront abordées dans le cadre de ce mémoire.

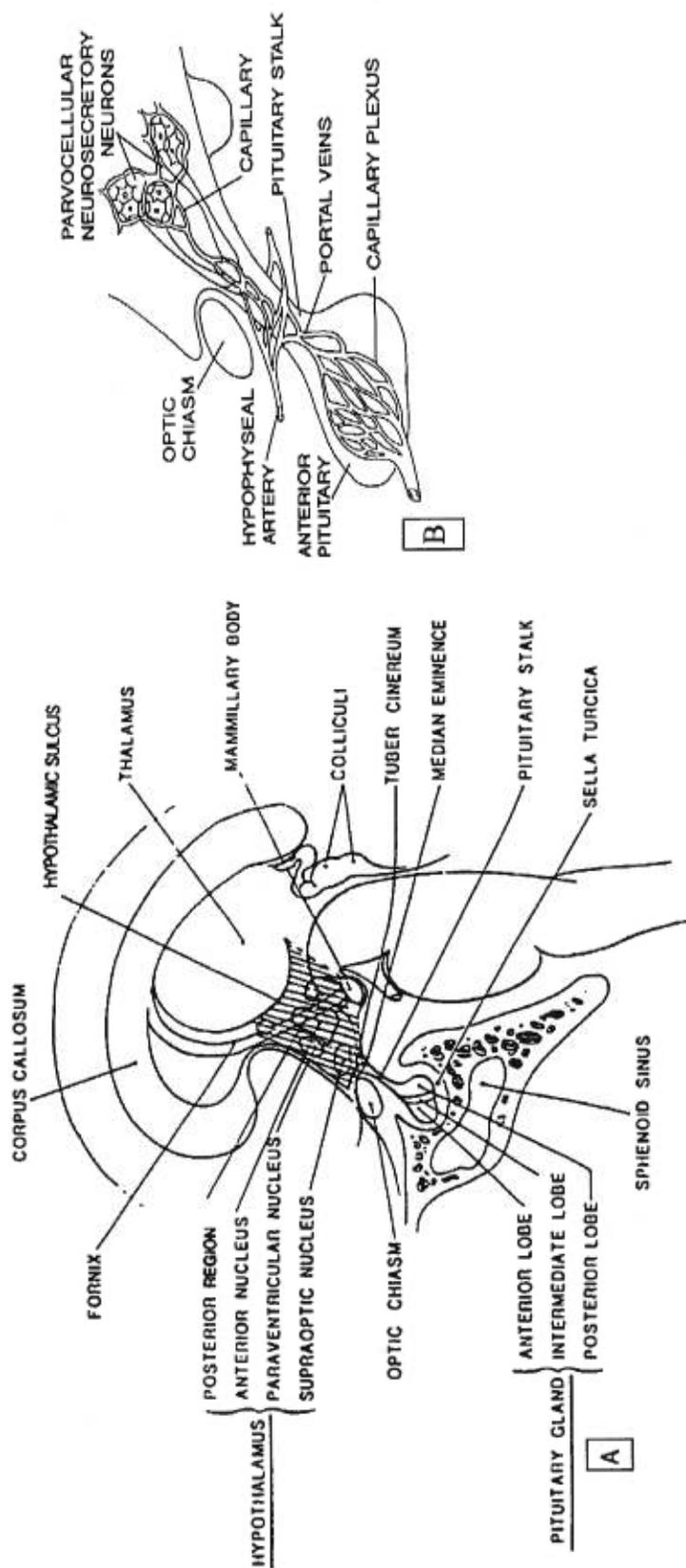


Figure 2. A. L'hypothalamus en relation avec l'hypophyse
 B. Circulation portale transportant les facteurs relâchés par l'hypothalamus, au lobe antérieur de l'hypophyse
 Barbara F. Westmoreland, Medical Neurosciences 3ème édition, 1994, p. 468 (A), 471 (B).

1.2. Les régulateurs de la sécrétion de l'hormone de croissance

La sécrétion de l'hormone de croissance est contrôlée par deux principaux régulateurs sécrétés par l'hypothalamus soit, la somatostatine et le GHRH (Figure 3).

1.2.1. Hormones hypothalamiques

La *GHRH* stimule la synthèse et la relâche de GH. C'est en 1982 que l'hormone endogène causant la relâche de l'hormone de croissance fut isolée par Guillemin et ses collègues au niveau d'une tumeur hypersécrétoire pancréatique chez l'humain (4,5). En 1983, cette hormone fut identifiée au niveau de l'hypothalamus (6). Le gène du GHRH est localisé au niveau du chromosome 20. La production de GHRH se concentre dans des cellules localisées au noyau arqué de l'hypothalamus basal. La forme active du GHRH dérive de deux polypeptides précurseurs, soit le prépro GHRH 107 et 108 (7). Suite à la formation de ce précurseur, il se produit un clivage et des modifications post-traductionnelles qui mènent à la formation de deux formes actives de GHRH, soit le GHRH (1-44) et le GHRH (1-40) comprenant respectivement 44 et 40 acides aminés (8). Lorsque le GHRH est sécrété par l'hypothalamus dans les veines portales, il stimule la transcription du gène ainsi que la traduction des ARNm de l'hormone de croissance au niveau de l'hypophyse (9). Conséquemment, cette augmentation de la synthèse de GH engendre une libération instantanée de GH dans l'hypophyse.

Le GHRH agit via son récepteur que l'on retrouve au niveau de la membrane plasmique des cellules somatotropes (10). Le clonage du récepteur GHRH humain a permis sa classification comme un membre de la superfamille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G (11). Lorsque lié à son récepteur, le GHRH stimule la relâche de GH en induisant un changement de conformation à la protéine *G α s* qui active l'adénylate cyclase (AC). L'AC augmente alors la production intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et indirectement la concentration de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire. On retrouve aussi le récepteur du GHRH au niveau des

noyaux périventriculaires, arqués et ventromédiaux de l'hypothalamus. Le rôle crucial que joue le GHRH dans la sécrétion de GH a été démontré chez le modèle de souris *dwarf lit* suite à l'expression du GHRH muté et non-fonctionnel (12). Lorsque le récepteur GHRH est non-fonctionnel, le GH n'est pas sécrété normalement engendrant un arrêt de croissance. Par exemple, il a été observé, chez certains enfants souffrant de nanisme, une mutation non-sens au niveau de leur récepteur GHRH, le rendant non-fonctionnel et causant des problèmes de croissance (13). Le rôle de GHRH dans la sécrétion de GH est donc d'une importance capitale.

La *somatostatine* fut identifiée par l'équipe de Brazeau en 1973, à partir de l'hypothalamus ovin (14). Comme le GHRH, les formes actives de somatostatine composées de 25 et 28 acides aminés dérivent d'un précurseur la préprosomatostatine de 119 résidus et sont les principaux inhibiteurs de la relâche de GH (15). Il est important de noter qu'elles n'affectent pas la synthèse de GH, mais inhibent sa relâche de deux façons. Premièrement, la somatostatine peut inhiber la relâche de GHRH produite par les cellules hypothalamiques. Deuxièmement, elle peut agir directement au niveau de l'hypophyse en inhibant la sécrétion de GH des cellules somatotropes. Au niveau des cellules somatotropes, la somatostatine et le GHRH opposent leurs mécanismes d'action puisque la somatostatine agit via un récepteur à sept passages transmembranaires couplés à des protéines G inhibitrices qui diminuent la quantité d'AMPc et de Ca^{2+} (16). La présence de somatostatine dans différents tissus de l'organisme démontre les multiples fonctions qu'elle peut occuper. Ce peptide inhibe non seulement la sécrétion de l'hormone de croissance, mais aussi celle de l'insuline, du glucagon ainsi que de la gastrine (17).

En plus de ces deux principaux régulateurs de l'hormone de croissance, on peut retrouver des facteurs physiologiques et environnementaux comme la nutrition et la peur qui peuvent influencer la sécrétion de GH. Il existe aussi de nombreuses substances

neuropeptidiques qui inhibent ou activent la sécrétion de GH. Les peptides sécrétagogues de GH (GHRPs), la galanine, la calcitonine, le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), les peptides opioïdes, la thyrotrophine (TRH), le neuropeptide Y, la substance P, la bombésine et la mélatonine n'en sont que quelques exemples. Toutes ces substances peuvent agir directement sur la sécrétion de GH ou interférer avec les deux plus importants régulateurs de GH. Il existe aussi certains neurotransmetteurs qui participent au contrôle de la relâche de GH directement au niveau de l'hypophyse ainsi qu'au contrôle de la libération de GHRH et de la somatostatine. Dans cette revue de littérature, je vais me concentrer principalement sur le rôle des GHRPs dans la régulation de la sécrétion de GH.

1.2.2. Régulation de GH par la rétroaction négative.

Il existe aussi un autre mécanisme très important de régulation de la sécrétion de GH appelé autorégulation. Le GH, avec l'aide du GHRH et de la somatostatine, régule lui-même sa sécrétion (18,19). La régulation peut se faire de façon directe ou indirecte. Le mécanisme direct implique que l'hormone de croissance exerce un effet direct sur les neuropeptides que l'on retrouve au niveau de l'hypothalamus, soit le GHRH et la somatostatine. Le GH se fixe sur ses récepteurs que l'on retrouve aussi au niveau de l'hypothalamus et inhibe la relâche de GHRH ou active la synthèse de la somatostatine qui agit comme inhibiteur de la sécrétion de GH (20).

Le mécanisme indirect implique la stimulation *d'insulin-like-growth factors* (IGFs) par le GH au niveau du foie et des tissus périphériques. Les IGFs agiront ainsi sur le GHRH et la somatostatine au niveau de l'hypothalamus engendrant ainsi l'inhibition de la relâche de l'hormone de croissance (21).

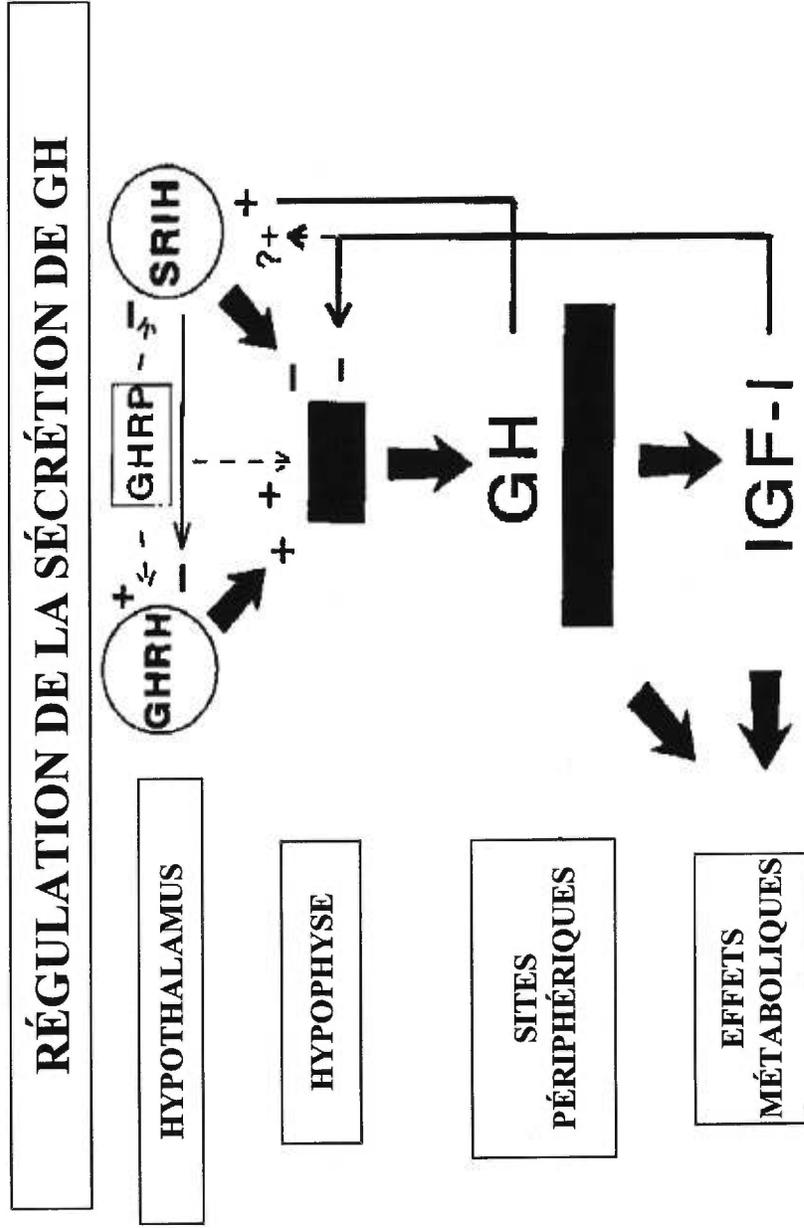


Figure 3. Régulation et actions de l'hormone de croissance
 Michael O. Thurner et al., 1997, Recent progress in hormone research. 52, p.217

1.2.3 Les peptides sécrétagogues de l'hormone de croissance (GHRPs)

Les peptides sécrétagogues de l'hormone de croissance sont d'importants modulateurs de la sécrétion de GH. C'est en 1976 qu'on identifia les premiers peptides sécrétagogues de l'hormone de croissance (GHRPs), lorsqu'une série d'analogues synthétiques dérivés des enképhalines fut développée. Les enképhalines sont des neuropeptides que l'on retrouve au niveau du cerveau et qui agissent comme des opiacés en diminuant la perception de la douleur. À cette époque, l'hormone naturelle responsable de la sécrétion de GH (GHRH) n'avait pas encore été identifiée et plusieurs hypothèses étaient évaluées afin de trouver l'hormone endogène permettant sa sécrétion. L'intérêt de créer une série d'analogues synthétiques dérivés des enképhalines provenait du fait que des études avaient démontré la capacité des opiacés à stimuler la sécrétion de l'hormone de croissance par une action directe au niveau hypothalamique (22).

Cette propriété des peptides opioïdes a alors amené les chercheurs à vérifier le pouvoir sécrétagogue des enképhalines au niveau hypophysaire étant donné que l'expression des gènes de l'hormone de croissance s'y retrouve principalement. Ces expériences ont confirmé qu'il pouvait y avoir stimulation de la sécrétion de GH au niveau de l'hypophyse par les GHRPs(3). Les recherches se sont poursuivies afin de créer des peptides plus spécifiques, c'est-à-dire dépourvus de propriétés opioïdes, et plus puissants pour stimuler la sécrétion de GH. Les GHRPs ont donc subi de nombreuses modifications afin de ressembler à la molécule endogène sécrétant le GH. Durant les modifications des GHRPs, l'hormone naturelle sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHRH) fut finalement isolée. Suite à cette découverte, des études ont été amorcées afin de déterminer si les GHRPs agissaient au niveau du même récepteur que le GHRH. C'est entre les années 1982 et 1984, suite à certaines évidences expérimentales, que l'hypothèse de l'existence de plusieurs ligands endogènes avec une activité somatotrope (autre que le GHRH) s'est avérée plausible.

La première évidence fut observée lorsque des injections répétitives de GHRP administrées à des rats menaient à une désensibilisation causant une altération de la relâche de GH. Cette altération n'était cependant pas observée lorsqu'au même moment il y avait administration du GHRH. Une deuxième évidence fut observée lorsque des études démontrèrent que lors d'une administration de GHRP et GHRH de façon simultanée, la relâche de GH était augmentée par rapport à l'administration seule de GHRH ou de GHRP. Ces résultats ont été observés *in vivo* et *in vitro* (23). Les GHRPs semblaient donc agir différemment du GHRH et cela motivait la poursuite des recherches au niveau des GHRPs. L'évolution dans le développement des GHRPs, a permis de créer trois grandes classes chimiques de GHRPs: les GHRPs peptidiques, non-peptidiques et les peptidomimétiques.

1.2.3.1 Sécrétagogues peptidiques de l'hormone de croissance

Les premiers peptides à avoir été évalués *in vitro* au niveau de l'hypophyse sont la Met- et la Leu-enképhaline ainsi que leurs analogues. C'est en fait le pentapeptide TyrDTrpGlyPheMetNH₂ (DTrp²), dérivé de la Met-enképhaline, qui a été le premier composé stimulant le relargage de l'hormone de croissance *in vitro* sans activité opioïde. Ce pentapeptide était un faible sécrétagogue de GH (3-20 µg de GH/ml de milieu) mais inactif *in vivo* (24). Ce fut cependant le premier peptide à agir directement au niveau de l'hypophyse permettant uniquement la relâche de GH. Entre les années 1978-1980 Monmany, avec des études de conformation des structures de composés, synthétisa des analogues de GHRPs avec une activité sécrétagogue croissante. Il existait à ce moment quatre classes peptidiques de GHRPs, soit DTrp², DTrp³, DTrp^{2,3} et DTrp²LTrp⁴ (Tableau 1) (25,26). Les GHRPs développés avant 1980 étaient seulement actifs *in vitro*.

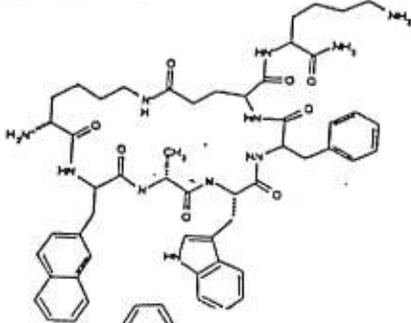
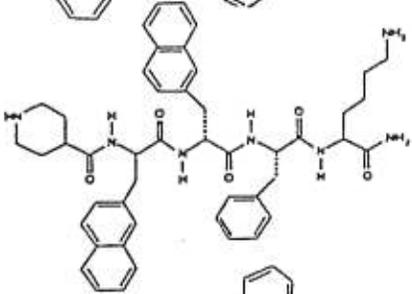
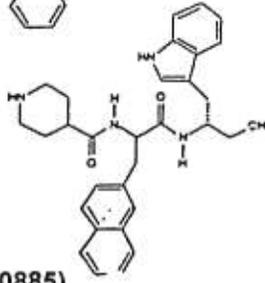
C'est seulement quatre ans plus tard, suite à plusieurs modifications des analogues existant, que le premier GHRP actif *in vitro* et *in vivo*, chez plusieurs espèces fut

synthétisé. Cet hexapeptide HisDTrpAlaTrpDPheLysNH₂ (GHRP-6), provenait de la classe DTrp²L-Trp⁴ des GHRPs (23,27). Les caractéristiques chimiques importantes de ce peptide concernent sa petite taille, ses quatre résidus aromatiques et ses acides aminés de type D en position 2, lesquels augmentent la stabilité de la molécule et diminuent sa dégradation enzymatique. Ce sont ces propriétés qui ont rendu ce peptide actif au niveau oral et intranasal. Les résultats des études par administration intranasale du peptide chez le rat et le chien ont indiqué une biodisponibilité d'environ 43% comparativement à une administration intraveineuse. Cependant, la biodisponibilité orale représente seulement 1% de celle obtenue au niveau respiratoire. La recherche d'un composé actif lorsque pris oralement est très importante étant donné que ce mode de traitement est le plus pratique pour les patients lorsque pris de façon chronique. La faible activité orale de ce peptide a poussé les chercheurs à créer de meilleurs analogues.

Suite au GHRP-6, le GHRP-1 fut synthétisé en 1991 (28). La structure du GHRP-1 permettait une libération de GH plus élevée que le GHRP-6 (29). En 1992, un autre groupe synthétisa un nouveau composé, l'hexarelin, à partir du GHRP-6. La différence entre le GHRP-6 et l'hexarelin est au niveau de la substitution du D-tryptophane en position 2 du GHRP-6 par un groupe 2-méthyl D tryptophane. L'hexarelin est différent des autres GHRPs puisqu'il possède une très grande stabilité contre la dégradation enzymatique (protéases), chimique et oxydative, permettant ainsi d'avoir un peptide sécrétagogue stable au niveau métabolique. La grande stabilité de ce composé n'a cependant pas amélioré le problème de la biodisponibilité orale qui dépend en grande partie du nombre de charges et de liens hydrogène du peptides. Suite à l'hexarelin, d'autres composés ont été synthétisés, dont l'hexapeptide GHRP-2, l'ipamorelin et les peptides cycliques (Tableau 1) (30,31). Le GHRP-6, le GHRP-2 ainsi que l'hexarelin sont actifs oralement, mais leur absorption n'excède pas 1% de la dose administrée. En conclusion, toutes ces molécules possèdent un fort pouvoir sécrétagogue de l'hormone de

croissance, cependant la plupart possèdent une biodisponibilité orale de moins de 1% et leur effet est de très courte durée.

Tableau 1: Classe des GHRPs peptidiques

	Gab : γ Aminobutyryl	β Nal : β Naphtylalanyl	Mrp : 2-Methyl-Trp
	Aib : Aminoisobutyryl		
1976-1980	Tyr-D-Trp ² -Gly-Phe-Met-NH ₂ (DTrp ²) Tyr-Ala-D-Trp ³ -Phe-Met-NH ₂ (DTrp ³) Tyr-D-Trp ² -D-Trp ³ -Phe-NH ₂ (DTrp ^{2,3}) Tyr-D-Trp ² -Ala-Trp ⁴ -D-Phe-NH ₂ (DTrp ² LTrp ⁴)		
1984	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-NH ₂ His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ (GHRP-6)		
1991	Ala-His-D β Nal-Ala-Trp-Dphe-Lys-NH ₂ (GHRP-1)		
1992	His-D2Me-Trp-Ala-Trp-Dphe-Lys-NH ₂ (hexarelin)		
1993	Dala-D β Nal-Ala-Trp-Dphe-Lys-NH ₂ (GHRP-2)		
1995	Aib-His-D-2-Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ (ipamorelin)		
	Série G		
	G-7203 (heptapeptide cyclique)		
			
	G-7039 (pentapeptide)		
			
	G-7502 (pseudotripeptide)		
			
1996	Analogues de l'hexarelin		
	Gab-DMrp-D β Nal-Phe-Lys-NH ₂ (EP 50885)		
	Gab-DMrp-DMrp-Mrp-Lys-NH ₂ (EP 51216)		
	Aib-DMrp-DMrp-NH ₂ (EP 51389)		
	[Spiro(S,S)-Pro-Leu]-DMrp-Dlys-Trp-Dphe-Lys-NH ₂ (EP 70905)		

1.2.3.2 Sécrétagogues non-peptidiques de l'hormone de croissance

Tous les peptides décrits précédemment sont résistants à une dégradation métabolique et sont faiblement absorbés par le tractus gastro-intestinal. On explique cette propriété par les ponts hydrogènes qu'ils forment avec le milieu aqueux ainsi que par leurs petites tailles. En se basant sur ces faits, le groupe de Merck a utilisé une approche différente. Afin de synthétiser un sécrétagogue puissant du GH, actif par voie orale, ils ont adopté une nouvelle stratégie en se basant sur la structure du GHRP-6 et sur le fait qu'un benzodiazépine relié à un autre composé mime ces peptides. Grâce à cette nouvelle approche, le premier composé sélectif non-peptidique de type benzolactame sécrétagogue de GH au niveau de l'hypophyse, le L-692,429, fut décrit en 1993 par le groupe de Merck (Tableau 2). Les expériences réalisées avec ce composé démontraient qu'il agissait comme le GHRP-6 avec, en plus, une augmentation du pouvoir sécrétagogue sur le GH. Cependant, le même problème persistait concernant la biodisponibilité par voie orale. En 1995, le L-692,585 fut synthétisé et s'est avéré être 20 fois plus puissant que le L-692,429, avec une biodisponibilité orale inchangée. Une biodisponibilité orale d'environ 4% s'avérait insuffisante pour un traitement chronique. Malgré plusieurs modifications de la structure, tous les composés demeuraient faiblement actifs lorsqu'administrés par voie orale et la classe des benzolactames fut abandonnée pour la recherche d'une nouvelle structure (32).

1.2.3.3 Sécrétagogues peptidomimétiques de l'hormone de croissance

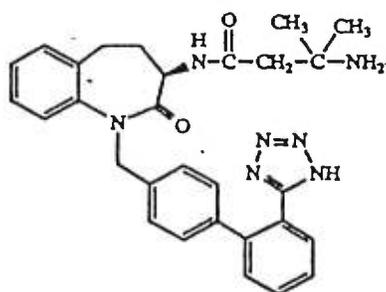
En 1995, le groupe de Patchett a réussi à sélectionner une nouvelle classe de GHRP, et plus particulièrement, le L-163,191 (Tableau 3). Cette molécule est un composé ayant une structure hybride, c'est-à-dire les deux-tiers peptidiques et l'autre tiers composé d'une structure spiroindoline semblable au tryptophane. Le L-163,191 est considéré comme un composé peptidomimétique du GHRP-6 avec une activité sécrétagogue de GH. *In vitro*, le L-163,191 possède les mêmes caractéristiques que le L-692,429, le L-692,585 et le

GHRP-6 mais différent de celles du GHRH. Les propriétés pharmacocinétiques du L-163,191 incluent une biodisponibilité orale se situant entre 6 et 22% chez le rat et supérieure à 60 % chez le chien (33). Le L-163,191 a ensuite été évalué dans les études cliniques, sous le nom de MK-0677, où l'on compara sa biodisponibilité orale par rapport aux autres GHRPs (32,34). La biodisponibilité orale du MK-0677 est de plus de 60%, comparativement à environ 2% pour le L-692,429 et moins de 1% pour le GHRP-6, ce qui constitue une amélioration considérable.

Tableau 2. Classe des GHRPs non-peptidiques**Composés benzolactames**

1992

L-692,429



1994

L-692,585

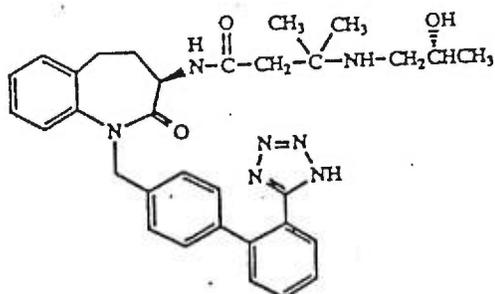
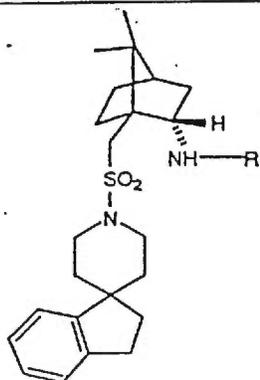


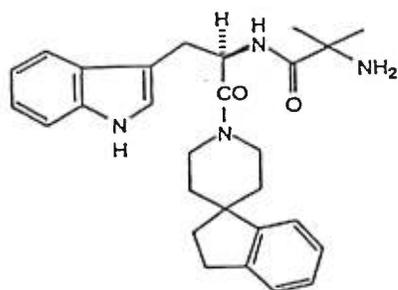
Tableau 3 Classe des GHRPs: petidomimétiques

1995

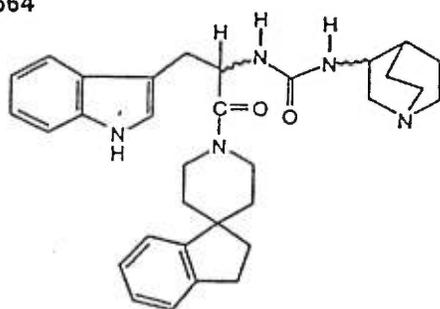
L-368,112



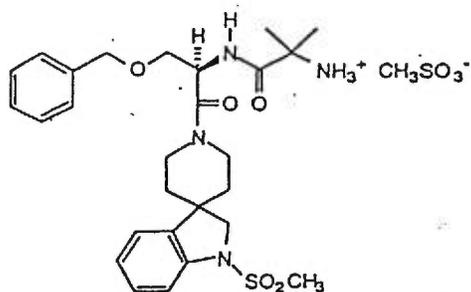
L-162,752



L-252,564



L-163-191 ou MK-0677 (spiroindoline)



1.2.3.4 Récepteurs au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus

Plusieurs données indiquent que les actions biologiques des GHRPs ou des peptidomimétiques ainsi que des GHRPs non-peptidiques sont produites par des récepteurs spécifiques distincts de ceux du GHRH. Aucun ligand naturel correspondant aux GHRPs n'a encore été clairement identifié mais le récepteur des GHRPs a récemment été cloné par le groupe de Merck (35-37) (Figure 4). La séquence du récepteur est hautement conservée chez l'humain, le chimpanzé, le porc, la vache, le rat et la souris. Par exemple, l'analyse de la séquence du porc présente une homologie de 93% avec celle de l'humain (36). Le gène codant pour ce récepteur génère une protéine de 366 acides aminés de 41 kDa. Le récepteur est constitué d'une protéine à sept passages transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. La liaison au récepteur nécessiterait la présence de magnésium et son activation serait inhibée par un analogue non-hydrolysable de GTP. Cette liaison n'est pas déplacée par le GHRH, la somatostatine, la met-enképhaline, la substance P, la galanine, la GnRH, le TRH, PACAP-38, la *gastrin-releasing peptide*, la MSH et d'autres neurotransmetteurs. La séquence du récepteur ne semble pas montrer d'homologie avec d'autres récepteurs connus jusqu'à maintenant.

Les études de la topographie fonctionnelle de récepteurs ont montré qu'une simple mutation de l'acide glutamique en position 124 du troisième passage transmembranaire affectait l'interaction du ligand envers des composés spiropipéridine (MK-0677), des composés benzolactame non-peptidiques et du peptide GHRP-6. La présence d'une charge positive à l'extrémité N-terminale de ces ligands requiert la présence de la glutamine en position 124 pour la liaison de ces ligands au récepteur. La mutation au niveau des passages transmembranaires 2, 5 et 6, affecte différemment la liaison spécifique de ces ligands à ce récepteur. Parmi ces composés, le MK-0677 possède la plus grande affinité dans la liaison au récepteur ($K_d=0.7$ nM). Les transcrits de ce

récepteur sont exprimés principalement au niveau de l'hypophyse et du système nerveux central (SNC), plus spécifiquement dans l'hypocampe, le noyau ventromédial et arqué de l'hypothalamus (35,36,38-40).

Il est important de mentionner que récemment une équipe a rapporté avoir purifié et identifié dans l'estomac du rat un ligand endogène spécifique au récepteur GHS. Le ligand purifié est un peptide de 28 acides aminés, dans lequel la sérine en position 3 est estérifiée par l'acide octanoïque. Le peptide estérifié permet une relâche spécifique de GH *in vivo* et *in vitro*. La O-n-octanoylation au niveau de la sérine est essentielle à son activité. Ils ont nommé ce peptide la ghreline. La ghreline humaine diffère de celle du rat par seulement deux acides aminés. La ghreline s'avère être un agent stimulant puissant de la sécrétion de GH (41).

Parallèlement à l'identification de l'ADNc codant pour le récepteur (une protéine de 41 kDa) des GHS, l'équipe de Ong et al. a identifié par approche de photomarquage avec l'aide d'un dérivé photoactivable de l'hexarelin, le [¹²⁵I]Tyr-Bpa-Ala-hexarelin, un récepteur différent de celui déjà isolé. En fait, l'existence d'un sous-type de récepteur GHRP hypophysaire de poids moléculaire de 57 kDa a été mise en évidence. Les courbes de compétition entre le dérivé photoactivable de l'hexarelin utilisé comme radioligand et l'hexarelin ont permis de démontrer que l'hexarelin se lie avec une plus grande affinité au récepteur de 57 kDa comparativement au MK 0677 suggérant l'existence de sous-types du récepteur GHRP cloné.

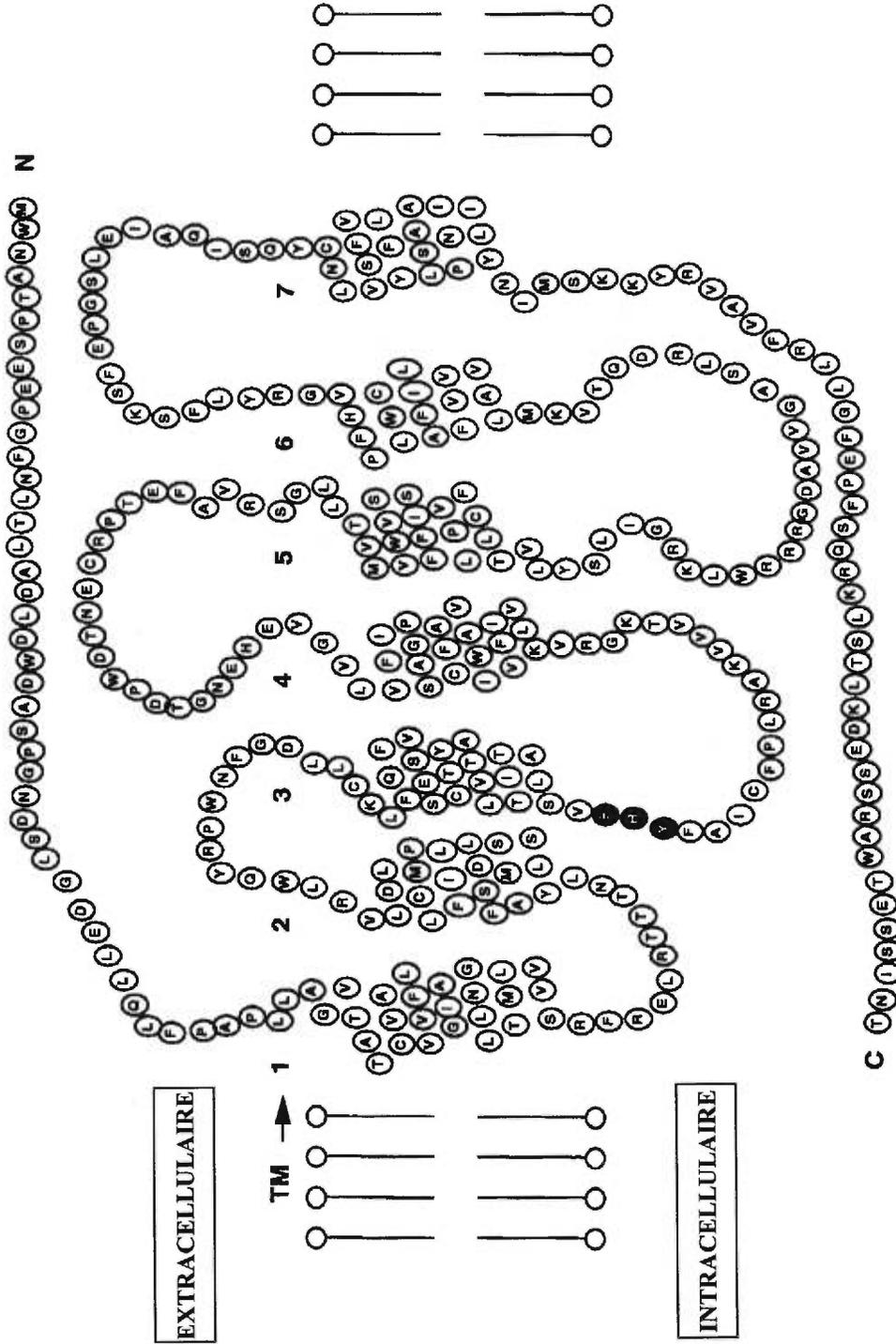


Figure 4. Séquence d'acides aminés du récepteur des GHRPs de type 1a.
 Roy G. Smith et al., 1997, Endocrine Reviews 18(5), p.631

1.2.3.5 Récepteurs au niveau périphérique

Suite à l'identification du récepteur des GHS et ses différents sous-types, les chercheurs se sont demandés s'il n'existait pas d'autres récepteurs GHS à l'intérieur de sites périphériques. Parmi les différents sites périphériques, des sites de liaison à un GHRP, l'hexarelin, ont été clairement identifiés au niveau du cœur.

La présence de sites de liaison des GHRPs au niveau du cœur a tout d'abord été suggérée par certaines études (36,42) démontrant la présence d'ARNm codant pour un récepteur relié aux GHS. Suite à cela l'équipe de Berti a indirectement démontré l'existence de sites de liaison cardiaques occasionnant l'effet cardioprotecteur de l'hexarelin. En fait, ils ont tout d'abord démontré qu'un traitement à l'hexarelin (administration du peptide sous-cutanée durant deux semaines) chez les rats âgés et chez les rats déficients en GH pouvait avoir un effet bénéfique sur les cœurs en condition ischémique (43,44). Les résultats obtenus ont clairement démontré que le traitement à l'hexarelin induisait un effet protecteur contre les dommages au niveau du myocarde chez les rats âgés, déficients en GH et aussi chez les rats témoins suite à une ischémie myocardique. De plus, cet effet bénéfique induit par l'hexarelin, au niveau cardiaque ne serait pas causé par une stimulation apparente de l'axe GH/IGF-1 étant donné qu'il n'y a pas eu augmentation de la fonction somatotrope à cette concentration d'hexarelin (80 µg/kg). La fonction somatotrope a été évaluée en enlevant l'hypophyse antérieure des rats traités et en déterminant le taux d'ARNm de GH extrait de ces hypophyses (116). Cet effet ne semble donc pas être relié à un effet cardio-vasculaire induit par le GH/IGF-1 suite à une interaction avec leurs récepteurs (GH/IGF-1) spécifiques exprimés au niveau du myocarde. Cela suggère donc une action directe de l'hexarelin sur la fonction cardiaque.

Ce n'est que tout récemment que l'approche par photomarquage avec le dérivé photoactivable de l'hexarelin a permis de mettre en évidence la présence de sites de

liaison de l'hexarelin au niveau cardiaque (45). Cette protéine photomarquée présente un poids moléculaire de 84 kDa qui diffère du récepteur cloné (41 kDa) et sous-types de récepteurs des GHS au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus. L'étude de la spécificité de la liaison avec les différents analogues peptidiques (EP 51389) et peptidomimétiques (MK-0677) effectuée par des courbes de compétition avec les membranes cardiaques ont démontré un profil de spécificité différent de celui des membranes hypophysaires suggérant l'existence de sites de liaison distincts au niveau cardiaque.

Les sites de liaison cardiaques sont également distincts des récepteurs neuropeptidiques vasoactifs exprimés dans la vasculature coronaire. En effet, le neuropeptide Y (NPY), la neurotensine, le CGRP et la substance P ne compétitionnent pas pour les sites de liaison de l'hexarelin (45). De plus, l'hexarelin photoactivable, lorsque lié au niveau cardiaque, n'est pas déplacé par des hormones circulantes vasoactives comme l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (AII), l'arginine-vasopressine pour lesquels on retrouve des récepteurs spécifiques au niveau du tissu vasculaire cardiaque. Les sites de liaison du dérivé de l'hexarelin photoactivable se distribuent en grande partie au niveau des ventricules cardiaques et en faible densité dans les oreillettes. De plus, l'étude a aussi permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'hexarelin avait un effet direct sur la fonction cardiaque en utilisant le modèle de cœur isolé (Langendorff). En utilisant des concentrations d'hexarelin de 1 μ M à 30 μ M, un effet de vasoconstriction fut démontré. Les voies de signalisation impliquées dans cette vasoconstriction semblaient impliquer les canaux calciques de type-L et la protéine kinase C puisque la vasoconstriction fut fortement diminuée par des inhibiteurs spécifiques de ces voies (45).

Parallèlement à ces études au niveau cardiaque et suite à la découverte de sous-types de récepteurs autres que le GHS-R au niveau hypothalamo-hypophysaire, l'équipe de

Howard (46) a initié la recherche de membres de la famille du récepteur GHS. C'est en faisant le criblage de la librairie du dérivé chromosomal artificiel P1 (PAC) humain, qu'ils ont pu identifier le FM1 et FM2 (GPR38 et GPR39) de cette librairie génomique. Le GPR38 est exprimé au niveau de la glande thyroïde, de l'estomac, de la moëlle osseuse et le GPR39 dans le cerveau et les tissus périphériques. Suite à l'identification de ces membres de la famille du récepteur GHS, ils ont identifié le FM3 qui est exprimé au niveau du cœur, cerveau, rate, poumon, foie, muscle squelettique, rein et testicules. L'identification de nouveaux membres au niveau du génome humain est très difficile étant donné la complexité et la grandeur de celui-ci. Ainsi, afin de simplifier les recherches, ils ont utilisé un génome beaucoup plus compact provenant d'un organisme vertébré le *pufferfish* (*Speroides nephelus*). Le choix s'est arrêté sur ce vertébré étant donné qu'il se trouve assez éloigné de l'humain au niveau de l'évolution et qu'ainsi nous pourrions savoir si les récepteurs GHS étaient présents à cette période, ce qui amplifierait l'importance de ceux-ci. Ils ont alors utilisé deux sondes radiomarquées dont une comprenant les domaines transmembranaires 3 et 4 du GPR38 et la deuxième comprenant la séquence complète du récepteur GHS. Ils ont alors réussi à cloner trois homologues du récepteur GHS dont l'homologie au GHS-R est de 58, 47 et 41%. Cependant ce qui est remarquable, c'est que les GHRPs synthétiques tel que le GHRP-6 et le MK-0677 activent l'homologue correspondant à 58 % du GHS-R.

On retrouve donc sept membres de la familles du récepteur GHS qui sont couplés aux protéines G (GHS-R, GPR38, GPR39, FM3 et trois gènes provenant du *pufferfish*). Cela suggère donc que la structure du GHS-R a été conservé au moins pendant 400 millions d'années. Cela suggère aussi que probablement un ligand naturel de ces récepteurs a aussi été conservé de façon similaire. Ce ligand naturel semble donc jouer un rôle important dans la physiologie.

1.2.3.6 Voies de signalisation

Lorsque les GHRPs se lient à leur récepteur hypophysaire ils activent la phospholipase C suivi de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) résultant en deux seconds messagers, soit l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (35,47) (Figure 5). L'IP₃ se lie à son récepteur-canal spécifique au niveau du réticulum sarcoplasmique et cause la libération de Ca²⁺ (48-51). Le DAG, quant à lui, permet l'activation de la protéine kinase C au niveau de la membrane cytoplasmique avec entre autre la phosphorylation, des canaux calciques de type-L membranaires (52-54).

De plus, il a été observé que les GHRPs bloquent les courants potassiques (K⁺) au niveau des cellules somatotropes, favorisant ainsi une dépolarisation de la membrane cellulaire et une activation des canaux calciques. Cet ensemble de mécanismes qui mène à une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire a été associé à la sécrétion de GH. Cependant, on ne peut pas attribuer la relâche de GH par les GHRPs au calcium uniquement puisque la somatostatine qui est un inhibiteur de la relâche de GH n'affecte pas la relâche de calcium. Une autre hypothèse suggère que l'IP₃ facilite la relâche de GH en fusionnant les granules sécrétagogues de GH à la membrane cytoplasmique, permettant ainsi leur relâche (55-57).

Bien que les voies de signalisation des GHRPs et du GHRH soient distinctes, il existe une communication entre celles-ci. Une potentialisation de la relâche de GH est observée lorsque les GHRPs et le GHRH agissent au niveau de la même cellule (58,59). Les GHRPs ont un effet amplificateur avec le GHRH au niveau de l'AMPC et, par le fait même, sur la sécrétion de GH (60). Cet effet pourrait être causé par une interaction entre la sous-unité γ , associée au récepteur des GHRPs et la sous-unité α_s associée au récepteur du GHRH (61). Cette augmentation d'AMPC a été associée à la relâche augmentée de GH par le GHRH en présence de GHRP. Aussi, par leur effet inhibiteur au niveau des canaux

potassiques, ils antagonisent le mécanisme de la somatostatine puisque celle-ci hyperpolarise les cellules somatotropes en augmentant la conductance potassique (62,63).

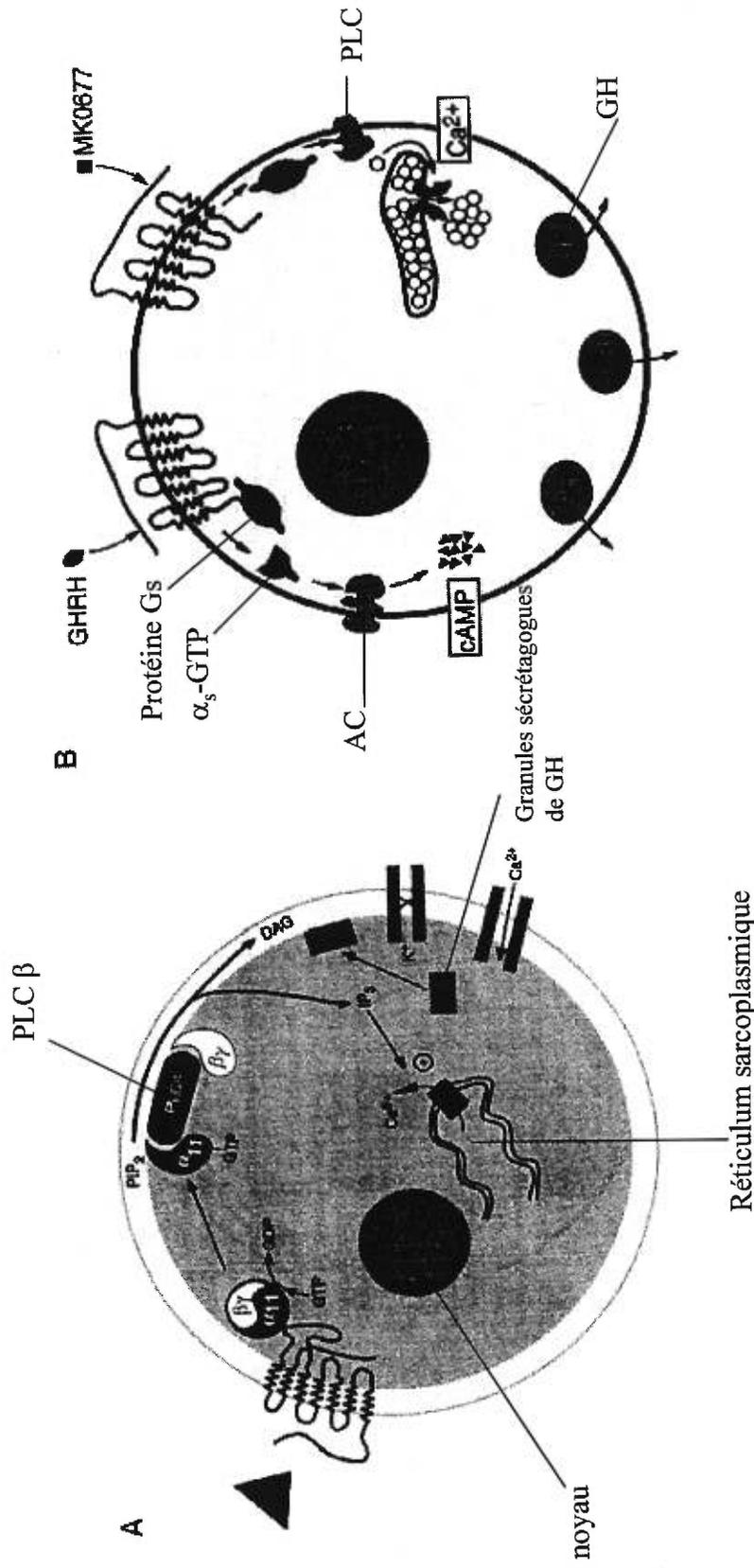


Figure 5. A. Voies de signalisation activées par un ligand (GHRP) qui interagit avec le récepteur desGHRPs
 B. GHRH et GHRP agissant sur des récepteurs différents et induisant des voies de signalisation différentes
 Roy G. Smith et al., 1997, Endocrine Reviews. 18 (5), p.629

1.2.3.7 Actions biologiques des GHRPs

À la même dose intraveineuse (1µg/kg), les GHRPs induisent une sécrétion de GH beaucoup plus élevée que le GHRH chez l'humain et les modèles animaux (64-68). Cependant, l'effet maximal sur la sécrétion de GH par les GHRPs est observé à 2 µg/kg (26,27,69). L'activité des GHRPs ne dépendrait pas du sexe (47,65,67) mais serait dépendante de l'âge (70-73). En fait, la relâche de GH par les GHRPs est observée à la naissance et de façon similaire à la pré-puberté. Cependant, à la puberté, on observe une très forte augmentation de la libération de GH par les GHRPs qui persiste jusqu'à l'âge adulte pour ensuite diminuer avec les années (72,74). Ces résultats ont été observés avec les différents composés peptidiques, non-peptidiques et peptidomimétiques. Avec le GHRH, la sécrétion de GH est maximale à la naissance et diminue progressivement avec l'âge.

Les mécanismes pouvant expliquer les modifications de la relâche de GH par les GHRPs en fonction de l'âge sont très mal compris. Certains chercheurs prétendent que l'augmentation de la libération de GH par les GHRPs à la puberté serait associée à la hausse des hormones sexuelles comme la testostérone et les oestrogènes. Cependant, une baisse d'oestrogènes durant la ménopause ne semblerait pas jouer un rôle dans la réduction de la réponse somatotrope induite par les GHRPs (75). De plus, il a été observé que l'administration des GHRPs par voie parentérale, intranasale et orale augmente le GH durant 24 heures ainsi que le taux d'IGF-1 chez les jeunes adultes normaux et les enfants. Ceci suggère que le traitement avec les GHRPs peut stimuler l'axe GH/IGF-1 (76-78).

Concernant leurs actions biologiques, les différents sécrétagogues de GH n'ont pas démontré une spécificité totale chez les individus normaux. La libération d'autres hormones est stimulée par l'administration des GHRPs comme l'adrénocorticotropine, le cortisol et la prolactine. De plus, ils ont un effet stimulant sur le sommeil et l'appétit.

Dans certaines pathologies, ces effets sont grandement augmentés comme la relâche excessive de cortisol dans le syndrome de Cushing. Certaines de ces hormones sont relâchées de façon variable selon l'âge. Par exemple, la libération de la prolactine ne change pas avec l'âge mais celle de l'ACTH augmente avec celui-ci (79). Certains de ces effets pourraient être dûs au manque de spécificité de ces composés pour leur récepteur. En fait, il fut récemment démontré que l'activité du MK-0677 est aussi partiellement spécifique pour la relâche de GH. Certains effets indésirables lui ont été attribués touchant l'appétit, le sommeil ainsi qu'une faible relâche de prolactine, d'hormone adrénocorticotropine et de cortisol (76).

Chez les humains et les animaux, l'administration conjointe de GHRPs et de GHRH exerce un effet de synergie sur la relâche de GH. Cependant, celle-ci est fortement affectée lorsque l'hypophyse est endommagée (80). L'importance de l'intégrité fonctionnelle de l'hypothalamus et de l'hypophyse est donc essentielle pour une activité maximale des GHRPs (81,82).

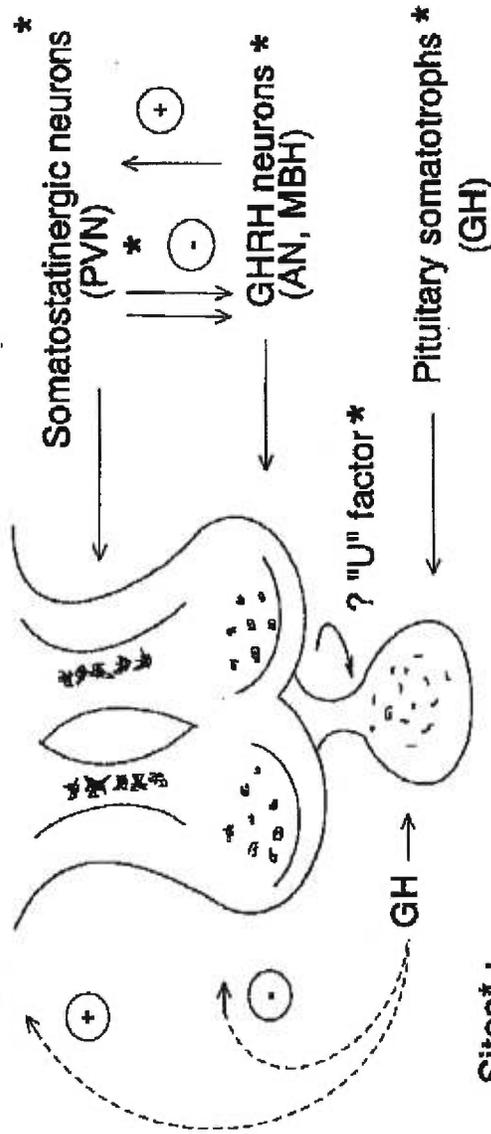
1.2.3.8 Les mécanismes d'action des GHRPs

Les mécanismes d'action des GHRPs menant à la sécrétion de GH sont encore très controversés. Plusieurs mécanismes plausibles ont été considérés par de nombreux laboratoires (Figure 6). Parmi ceux-ci, on retrouve l'action directe des GHRPs au niveau de l'hypophyse antérieure. Ce mécanisme semblerait jouer un rôle mineur dans la sécrétion de GH (35,83-85). Un deuxième mécanisme, observé chez le mouton, le rat et l'humain, (35,86-90) est l'action indirecte des GHRPs au niveau de l'hypothalamus menant à la relâche de GHRH et diminuant l'activité de la somatostatine. En fait, il a été observé que les GHRPs augmentaient l'expression d'un facteur transcriptionnel *c-fos* au niveau des neurones sécrétant le GHRH dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Ce facteur de transcription augmente l'expression de l'ARNm de GHRH d'environ 25 %, en présence

des GHRPs. De plus, les GHRPs semblaient réduire le taux de somatostatine, augmentant ainsi le pouvoir d'action des GHRH (68). Cependant, la stimulation de GH par les GHRPs ne nécessite pas la présence absolue de GHRH étant donné que les GHRPs restent actifs suite à une désensibilisation de GHRH au niveau hypophysaire (91). De plus, les GHRPs peuvent stimuler la sécrétion de GH dans les lignées cellulaires (GH1) n'exprimant pas le récepteur de GHRH (92).

Finalement, le troisième mécanisme proposé est la relâche possible d'un facteur U (unknown), encore inconnu, au niveau de l'hypothalamus. Ce facteur U agirait de manière synergique avec le GHRH et mènerait à la relâche de GH (65,93).

LIEUX D'ACTION DES GHRPS AU NIVEAU HYPOPHYSAIRE



Sites* :

- (a) direct pituitary actions (human, rat, sheep)
- (b) stimulate GHRH release (sheep)
- (c) decrease somatostatin effect (rat, human: indirect evidence)
- (d) attenuate GH autonegative feedback (human, rat)
- (e) oppose SS's inhibition of GHRH neurons (rat)
- (f) release "U" factor, which synergizes with GHRH (?)

Figure 6. Possibles lieux d'action des GHRPs au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse.

Giustina, A et al., 1998, Endocrine Review 19 (6) p.728

1.2.3.9 L'aspect thérapeutique des GHRPs

Plusieurs maladies impliquent des problèmes de régulation de l'hormone de croissance, soit par une hypersécrétion (acromégalie) ou une hyposécrétion. Le vieillissement, qui n'est pas une maladie, est également associé à une baisse du niveau de l'hormone de croissance. En fait, lors du vieillissement, la baisse des taux de GH serait responsable d'une diminution de la masse musculaire, de la masse osseuse et d'une augmentation du tissu adipeux (94). Malgré que ce sujet soit très controversé, certains chercheurs croient qu'une augmentation du taux de GH chez les personnes âgées pourrait avoir un effet bénéfique sur certaines maladies comme l'ostéoporose et la diminution du taux de fracture. Il a aussi été rapporté qu'une déficience en GH est associée avec un profil lipidique qui favorise les maladies cardio-vasculaires dont l'athérosclérose (95-97). En fait, une déficience en GH diminue la régulation des lipides et du métabolisme des lipoprotéines. Certaines lipoprotéines appelées protéines de haute densité (HDL) permettent de véhiculer et solubiliser le cholestérol dans le plasma sanguin pour ensuite l'éliminer dans le tube digestif. Ces protéines sont donc une relative protection des tissus périphériques, des parois artérielles et plus elles sont élevées plus le risque vasculaire est atténué. La fraction de cholestérol fixée sur les protéines de basse densité (LDL et VLDL) est au contraire celle qui va être distribuée aux tissus périphériques et qui correspond au maximum de risque. Chez les personnes déficientes en GH, le taux de LDL est très élevé car l'absence de GH diminue l'activité des récepteurs aux LDL dans le foie. De plus, les personnes dépressives auraient aussi une mauvaise régulation de GH (98). L'importance de trouver un traitement afin de régulariser le taux de GH pourrait s'avérer une perspective thérapeutique intéressante.

Hormones de croissance hypophysaires

Depuis les cinquante dernières années, de nombreux traitements ont été utilisés pour contrer les problèmes de déficience en GH. Ces traitements ont subi une évolution rapide afin de trouver le traitement idéal. Parmi ces traitements on retrouve l'injection par voie

intramusculaire d'hormone de croissance extraite d'hypophyses de cadavres humains (99,100). Ce traitement a longtemps été utilisé (de 1957 à 1985) puisqu' aucun problème majeur lui était associé et que c'était la seule source de GH à cette époque. Ce n'est qu'en 1985 que ce traitement a été abandonné suite à la transmission de la maladie de Creutzfeldt Jacob diagnostiquée chez quelques rares patients traités avec l'hormone de croissance humaine. En fait, les préparations de GH extraites de différentes hypophyses humaines avaient été contaminées par des hypophyses porteuses de prions causant cette maladie. Par la suite, aucun protocole d'extraction de GH n'a été accepté et de nouvelles avenues thérapeutiques ont dû être envisagées (101,102).

Les hormones de croissance recombinantes

Le deuxième traitement, qui a ensuite été envisagé et qui est encore utilisé aujourd'hui, consiste à utiliser l'hormone de croissance recombinante produite en grande quantité par des bactéries auxquelles les gènes de GH ont été introduits dans leur génome. L'hormone de croissance recombinante peut être injectée par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Ce traitement permet d'obtenir de bons résultats pour les personnes souffrant d'une déficience de GH (103). Cependant, ce traitement engendre des effets secondaires comme par exemple la création d'anticorps contre le GH recombinant. Les facteurs responsables de la création de ces anticorps sont principalement dus aux procédés de purification utilisés et les modifications structurales de l'hormone. Un autre risque associé à ce traitement est la possibilité de développer une leucémie étant donné l'effet potentiel stimulateur de la prolifération cellulaire et synthèse protéique. Certains cas ont été observés suite à un traitement avec l'hormone recombinante (104-106). Cependant, tous ces effets secondaires n'ont pas encore été totalement analysés et bien documentés. L'injection de GH exogène engendre donc certains problèmes et la recherche doit se poursuivre en vue de contrer ces nombreux effets secondaires.

Les sécrétagogues de l'hormone de croissance

Depuis quelques années, l'élaboration de traitements visant à induire la sécrétion endogène de l'hormone de croissance est de plus en plus envisagée. Plusieurs avantages encouragent la communauté scientifique à développer ce type de traitement. D'abord, la production d'anticorps ne serait pas observée comme c'était le cas pour l'hormone de croissance recombinante. De plus, aucune contamination par des agents infectieux serait engendrée comme dans le cas du premier traitement. Finalement aucune surproduction de GH n'aura effectivement lieu. En fait, l'avantage d'administrer des sécrétagogues de GH comme le GHRH ou GHRP est que le mécanisme de rétroaction négative pour le GH va permettre d'éviter un excès de GH. Ainsi le GHRH et les GHRPs vont promouvoir la relâche de GH d'une manière beaucoup plus "physiologique" puisque le cycle oscillatoire de GH ne sera pas dérégulé étant donné le mécanisme d'autorégulation mentionné précédemment.

Plusieurs analogues synthétiques de GHRH sont présentement étudiés et utilisés (107,108). L'utilisation des GHRPs comme agents thérapeutiques suscite un très grand intérêt étant donné leur capacité de sécrétion de GH plus élevée que le GHRH chez l'humain et leurs effets synergiques avec le GHRH (109-111). Cependant, les sujets pouvant répondre à ce traitement doivent avoir un axe hypothalamo-hypophysaire intact et avoir déjà produit du GH de façon normale. Conséquemment dans certains cas, le traitement avec le GH recombinant demeure la seule option.

1.2.3.10 Effets et perspectives des GHRPs dans des conditions pathologiques

1. Diagnostiquer et traiter les enfants et les adultes déficients en GH

Les GHRPs en combinaison avec le GHRH ont une activité sécrétagogue de GH importante chez les personnes déficientes en GH, permettant ainsi de pallier à cette déficience (112-114). La possibilité de diagnostiquer une déficience en GH chez certains

sujets, en évaluant la capacité maximale de leurs cellules somatotropes à sécréter du GH en présence de GHRPs, a également été proposée par certains chercheurs (18,115). Cette hypothèse offre une perspective intéressante comme outil diagnostique de la maladie.

2. Traitement des personnes de petites tailles (idiopathiques)

Les GHRPs ont un important potentiel thérapeutique pour les enfants ayant une petite taille. Récemment, des expériences ont démontré qu'un traitement à long terme avec de l'hexarelin administré par voie intranasale chez les enfants de petites tailles est capable d'augmenter le taux de GH et d'IGF-1, occasionnant une augmentation de croissance significative (115). Il a aussi été observé qu'un traitement prolongé avec le MK-0677 induit une augmentation d'IGF-1 et de GH chez les adultes déficients en GH (114). Prenant en considération que le traitement avec les hormones de croissance recombinantes ne donne pas toujours le résultat espéré, le traitement avec les GHRPs devient une perspective nouvelle et intéressante. De plus, très peu d'anticorps sont développés contre les GHRPs comme c'était le cas pour le GH recombinant.

3. Traitement de maladies cardiovasculaires

La récente découverte du rôle de GH et de sites de liaison des GHRPs au niveau cardiaque suggère une perspective thérapeutique intéressante par les GHRPs pour les gens souffrant de problèmes cardiaques. Par exemple, chez des rats ayant une déficience en GH, la masse ventriculaire gauche est beaucoup plus faible que celle d'un rat normal (116). De récentes expériences effectuées chez le rat ont démontré le potentiel thérapeutique des GHRPs à faibles doses au niveau cardiaque chez le rat âgé, jeune et déficient en GH (43,44). Les GHRPs s'avère un agent thérapeutique pour les problèmes de régulation de GH au niveau de l'hypophyse mais peut-être aussi pour les maladies cardiaques.

CHAPITRE 2

LA CONTRACTION MUSCULAIRE LISSE VASCULAIRE

2.0 La contraction du muscle lisse vasculaire

Récemment, il a été démontré que les GHRPs exercent un effet vasoactif sur la circulation coronarienne en induisant une augmentation importante mais réversible de la pression de perfusion dans le modèle de cœur isolé selon Langendorff de rat.

La contraction musculaire lisse est induite, entre autres par des agonistes de récepteurs à sept passages transmembranaires. Ces récepteurs sont liés à une protéine G constituée de trois sous-unités $\alpha\beta\gamma$. C'est la sous-unité α qui permet aux protéines G d'avoir une spécificité au niveau de leurs récepteurs ainsi qu'au niveau de leurs effecteurs, puisqu'elle possède plusieurs isoformes. Ce sont ces différentes isoformes qui ont permis la classification des protéines G en différentes familles. La sous-unité α possède un site de liaison pour des nucléotides guaniliques. En absence de ligand, la sous-unité α a une forte affinité pour la molécule de guanosine diphosphate (GDP) et en présence de ligand, elle a une forte affinité pour la molécule de guanosine triphosphate (GTP) (117). Les sous-unités $\beta\gamma$ quant à elles forment un complexe qui permet de lier la sous-unité α et qui est commun à plusieurs protéines G différentes. Cette entité ne possède donc pas la spécificité que possède la sous-unité α . Cependant, lorsque ce dimère n'est pas lié à la sous-unité α , il peut activer certains effecteurs en agissant sur des sites distincts de la sous-unité α (118).

Lorsque le récepteur n'est pas activé par son agoniste, il est lié à une protéine G hétérotrimérique. À cette étape, les protéines G sont dans un état inactif et sont associées à une molécule de GDP. Au moment où le récepteur lie son agoniste, il y a alors dissociation du GDP qui est rapidement remplacé par une molécule de GTP. La sous-unité α liée au GTP peut maintenant aller activer son effecteur spécifique. Lorsque la sous-unité α active l'effecteur, l'activité GTPasique de la sous-unité α entre en jeu et elle hydrolyse un phosphate de la molécule GTP. À ce moment, l'activation de l'effecteur est

arrêtée et la sous-unité α est de retour sous une forme liée à la molécule GDP (119-121). Le retour à la forme α α -GDP permet une réassociation au dimère $\beta\gamma$, permettant ainsi de se réassocier à un autre récepteur au niveau de la membrane pour pouvoir recommencer le cycle. C'est donc par un processus de rétroinhibition que la sous-unité α peut revenir à un état inactif (34).

2.1. Les voies effectrices empruntées par les protéines G

Suite à l'activation des protéines G, plusieurs effecteurs peuvent être activés dépendamment du sous-type de protéine G impliqué. Les effecteurs peuvent être des enzymes, des canaux ioniques ou des transporteurs. C'est l'effecteur qui permettra l'activation de seconds messagers qui activeront d'autres messagers pour finalement arriver à la réponse désirée. L'effecteur est donc celui qui va initier une cascade d'événements au niveau de la cellule. L'effecteur le plus souvent retrouvé dans la vasoconstriction des cellules musculaires lisses vasculaires induites par les récepteurs à sept passages transmembranaires est la phospholipase C (PLC). La PLC implique les protéines Gq (122,123). L'activation des PLC par l'angiotensine II, l'endothéline-1 et la vasopressine a été démontrée comme étant la voie impliquée dans la vasoconstriction (124-126).

2.1.1. Phospholipases C (PLC)

Les PLC sont des phosphoinositidases qui hydrolysent spécifiquement le lien glycérophosphate de la molécule phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP₂) excluant les autres phospholipides membranaires. La molécule PIP₂ est présente à la surface de la membrane et compte pour moins de 8% de tous les phospholipases membranaires. Donc, lorsque qu'il y a hydrolyse de PIP₂, cela amène la formation de deux seconds messagers (l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) qui ont une durée de vie très courte et qui sont importants pour la contraction musculaire lisse vasculaire (127).

Les différentes phospholipases C peuvent être classées dans trois différentes familles (β, γ, δ) et elles sont toutes dépendantes du calcium (128). Les PLC sont constituées de deux parties dont une forme le site catalytique et l'autre le site liant le calcium. Les phospholipases de la famille β sont activées par les protéines G et impliquées dans la contraction du muscle lisse vasculaire alors que ceux de la famille γ le sont par les récepteurs à activité tyrosine kinase (récepteurs cytokines et facteurs de croissance). On ne connaît cependant pas les médiateurs de la famille des PLC- δ (129-131).

2.2. Les seconds messagers

2.2.1. L'IP₃

L'IP₃ interagit avec un récepteur-canal calcique qui est spécifique à la membrane du réticulum sarcoplasmique (132). L'IP₃ permet, lorsque lié à son récepteur, l'ouverture du canal ionique du récepteur. La libération du Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol augmente la concentration de calcium intracellulaire. Il est à noter que le canal peut aussi être activé au niveau du segment N-terminal par l'ATP et le calcium. La durée de l'activité de l'IP₃ est de quelques secondes et il est ensuite transformé par des phosphatases et kinases en d'autres seconds messagers, dans un cycle reconstituant le PIP₂ (133).

2.2.2. Diacylglycérol (DAG)

Le diacylglycérol formé par l'hydrolyse du PIP₂ fixé à la membrane active les PKC et ses différents isozymes. Les PKC activés permettent la phosphorylation de leurs substrats (134).

2.3. Les canaux ioniques des cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont excitables et elles possèdent plusieurs canaux ioniques pour les ions Ca^{2+} , Na^+ , K^+ et Cl^- . La concentration de chacun de ces ions permet aux cellules de conserver un équilibre que l'on nomme potentiel de repos. Cependant lors de la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires, cet équilibre est changé. Plusieurs mécanismes et mouvements d'ions sont responsables de cette contraction. Seuls les canaux calciques seront abordés dans le présent texte étant donné que notre étude est concentrée sur ceux-ci.

2.3.1. Les canaux calciques

Les canaux calciques jouent un rôle important dans la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (Figure 7). Lorsque le muscle est au repos, les concentrations de calcium ionisé intracellulaires sont faibles. C'est lorsque le muscle est activé que l'on observe une augmentation de calcium ionisé intracellulaire permettant la contraction. Le processus contractile sera déclenché lorsque quatre ions calcium se lient à une protéine, la calmoduline. L'augmentation de calcium intracellulaire peut provenir de deux sources, soit intracellulaire ou extracellulaire. Le calcium extracellulaire aura une influence en augmentant le calcium relâché au niveau intracellulaire et inversement. Cette influence pourra se faire directement ou par l'intermédiaire d'enzymes dépendantes du calcium. Il existe de nombreux mécanismes cellulaires permettant la contraction des muscles lisses vasculaires. Cependant seuls les mécanismes impliqués dans la contraction du muscle lisse lors d'une activation par un agoniste seront abordés puisque c'est le sujet principal de notre étude (34).

2.3.1.1. Source intracellulaire de calcium

2.3.1.1.1. Relâche de calcium intracellulaire par l'IP₃

Tel que mentionné précédemment, la relâche de calcium intracellulaire est observée lorsque le second messenger, l'IP₃, se lie à son récepteur-canal. Ce récepteur est spécifique au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique.

L'IP₃ permet donc une très grande régulation du calcium intracellulaire. Cependant l'IP₃ et son récepteur-canal calcique ne seraient pas les seuls à induire une augmentation de calcium intracellulaire favorisant la contraction du muscle lisse (134).

2.3.1.1.2 La relâche de calcium intracellulaire sensible au calcium

Il existe en fait d'autres récepteurs insensibles à l'IP₃ mais sensibles à la ryanodine au niveau du réticulum sarcoplasmique. Ces récepteurs seraient sensibles au calcium et permettraient eux aussi de libérer du calcium du réticulum sarcoplasmique. Cette relâche peut s'expliquer par le fait que l'IP₃ relâchant du calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique permettrait à ce calcium de se lier au récepteur canal activant ainsi celui-ci à la relâche de calcium du réticulum sarcoplasmique. Cependant, la présence de ces canaux libérant du calcium suite à une activation par le calcium au niveau du muscle lisse est présentement un sujet complexe et controversé (135,136).

2.3.1.2. Source extracellulaire de calcium

Le calcium que l'on retrouve à l'extérieur de la cellule peut, grâce à des canaux au niveau de la membrane cytoplasmique, entrer dans la cellule. La quantité de calcium que l'on retrouve à l'extérieur de la cellule est beaucoup plus importante que celle retrouvée à l'intérieur. Cela crée donc un important gradient électrochimique permettant une forte entrée de calcium dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Cette entrée de calcium

est contrôlée par les différents canaux calciques qui s'ouvrent suite à des changements de potentiel transmembranaire ou par l'activation de certains récepteurs.

2.3.1.2.1. Les canaux calciques sensibles au voltage

Les différents canaux ioniques sensibles au voltage permettent une entrée de calcium lorsqu'ils modifient leurs conformations lors d'un changement du potentiel transmembranaire. Il existe plusieurs types de canaux calciques dont les canaux de type L (Long lasting), T (Transient) et N (Neuronal) (137). Plus récemment, on a identifié les courants calciques de type P (Purkinje), Q et R (138-140). Cependant au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires on ne retrouve que les types L et T (141).

La structure moléculaire des canaux calciques de type T a été démontrée au niveau cardiaque (142). Cependant, les canaux calciques de type T sont beaucoup moins abondants dans le cœur. Ces deux types de canaux sont activés à des potentiels transmembranaires différents permettant de les différencier. Par exemple, des études d'électrophysiologie ont démontré que le canal de type T est activé par un potentiel plus hyperpolarisé que le canal de type L (141,143). Le seuil d'activation (au niveau des cellules musculaires lisses) des canaux calciques de type T se situe à environ -70 mV alors que le canal de type L se situe à environ -20 mV. Suite à leur activation les canaux de type T sont rapidement inactivés en comparaison au type L qui s'inactive très lentement. La contribution relative des deux types de courant démontrent des variations importantes en fonction du type de cellules utilisées. De plus, il a été observé que le canal de type T est moins sensible aux bloqueurs organiques des canaux calciques et qu'il contribue beaucoup moins au maintien du tonus vasculaire lisse que le canal de type L (144). Au potentiel de repos, le courant calcique de type T est inactif puisque le potentiel à cet état ne favorise pas son activation. Les canaux de type T sont impliqués dans l'activité pacemaker et au niveau d'oscillations neuronales. Des mutations au niveau des

gènes des canaux de type T peuvent contribuer à des troubles cardiovasculaires et neurologiques comme l'épilepsie, l'arythmie et l'hypertension. Les canaux calciques de type L ont un rôle important dans la dépolarisation cardiaque qui résulte d'une entrée de calcium dans différentes cellules excitables dont les cellules cardiaque. Un dérèglement de ces canaux peut engendrer de nombreux problèmes d'ordre cardiaque

Les canaux calciques sont impliqués dans plusieurs réponses cellulaires. Par exemple, l'action de plusieurs agents vasoactifs impliquent les canaux calciques. Ces substances vasoactives peuvent causer une dépolarisation membranaire et moduler directement l'activité de ces canaux permettant l'entrée de calcium extracellulaire (145,146). C'est le cas de l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses de rat et de lapin ainsi que de la sérotonine dans les artères cérébrales de lapin qui augmente l'activité des courants calciques (147). Cette augmentation de calcium a aussi été observée avec l'endothéline au niveau des cellules musculaires lisses (148,149). L'activité des canaux calciques de type L peut aussi être modifiée par des variations de pH extracellulaire et grandement par des mécanismes de phosphorylation (150-152). La PKC et la calmoduline sont de forts modulateurs des canaux calciques voltage-dépendants (153,154).

Il existe de très bons bloqueurs des canaux calciques de type L dont les dihydropyridines (nifédipine), les benzothiazépines (diltiazem) et les phénylalkylamines (vérapamil) (155). Les mécanismes d'action de ces bloqueurs ont été étudiés dans plusieurs types cellulaires (144,156). Il semble que les cellules musculaires lisses soient beaucoup plus sensibles aux dihydropyridines (157). En fait, ces différents bloqueurs permettent de déplacer l'état d'inactivation des canaux à des potentiels plus négatifs. Cependant, plusieurs expériences ont démontré que les canaux de type T sont insensibles aux antagonistes organiques du calcium à l'exception du mibéfradil. L'absence d'antagoniste spécifique pour le type T explique la difficulté de caractériser ce canal (156).

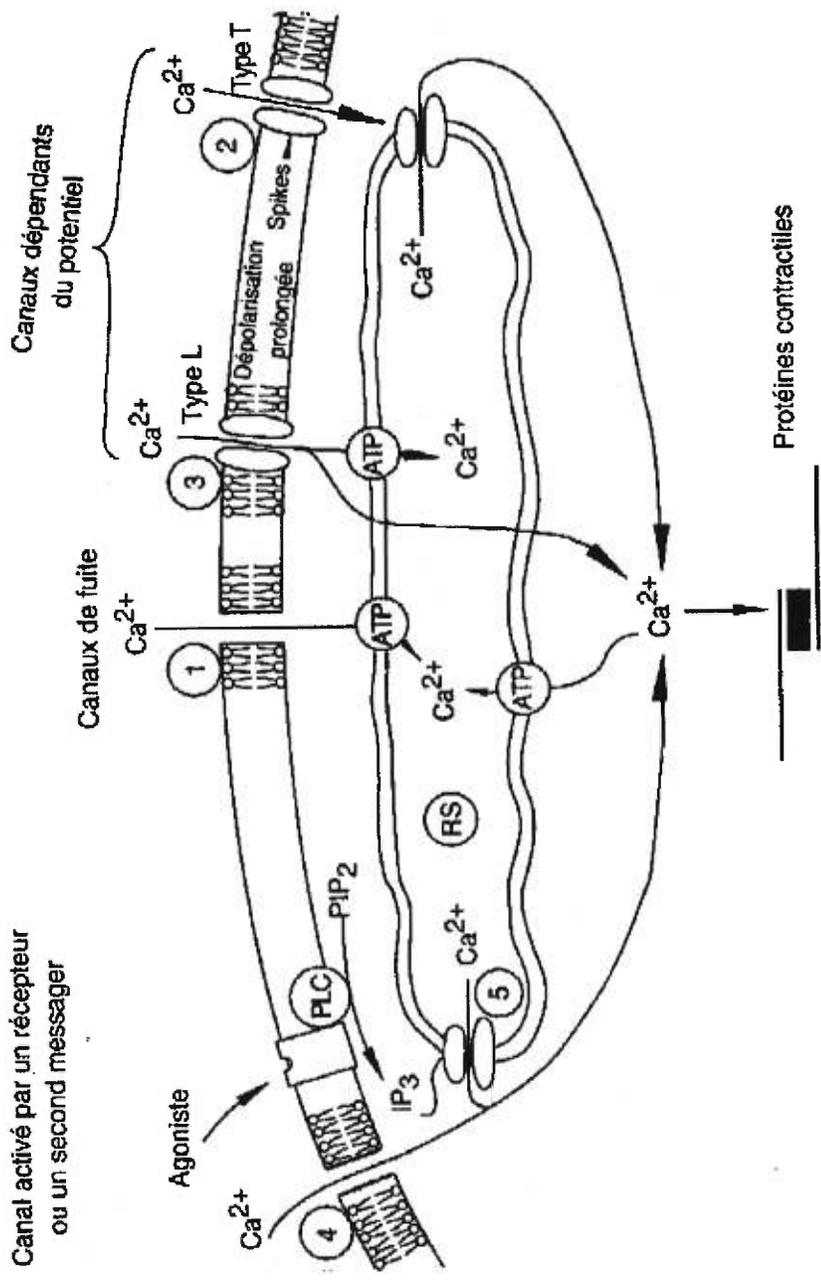


Figure 7. Les principaux systèmes mobilisant le Ca²⁺ de la cellule musculaire lisse
Adapté de Landry et Gies (1994) p.593

2.4. Les protéines kinases

Les protéines kinases ont un rôle important dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires dont la contraction du muscle lisse vasculaire. Ces enzymes sont très nombreuses et possèdent un domaine commun: le domaine catalytique responsable du transfert d'un groupement phosphate. Le domaine catalytique des différentes protéines kinases possède des sites de liaison de l'ATP, des sites de reconnaissance et de liaison du substrat et des sites de phosphorylation du substrat. Les protéines kinases peuvent phosphoryler plusieurs substrats ou plusieurs fois un même substrat. Elles peuvent aussi être phosphorylées plusieurs fois étant donné qu'elles possèdent elles aussi des sites de phosphorylation. La réaction de phosphorylation peut se faire au niveau des résidus sérine, thréonine et tyrosine. Parmi ces protéines kinases on retrouve principalement les protéines-kinases dépendantes des nucléotides cycliques, les protéines kinases C et les protéines-kinases dépendantes du couple Ca^{2+} -calmoduline (34). Les protéines kinases principalement impliquées dans la contraction du muscle lisse vasculaire sont les PKC, une catégorie de protéines kinases-dépendantes du couple Ca^{2+} -calmoduline, les kinases des chaînes légères de la myosine et finalement les tyrosines kinases.

2.4.1. Les protéines kinases C

Le rôle des PKC dans la contraction du muscle lisse vasculaire peut être activateur ou inhibiteur. Cette diversité d'action est due au grand nombre d'isoenzymes des PKC. L'étude des PKC a été facilitée par l'existence de différents modulateurs dont les esters de phorbol qui sont des bons activateurs de celle-ci. À l'inverse, il existe également plusieurs inhibiteurs dont la chélérythrine et aussi la staurosporine (158,159). Il existe au moins dix isoenzymes des PKC: quatre isoenzymes sont dépendantes du calcium soit, α , β I, β II, γ et six isoenzymes indépendantes du calcium. Les isoenzymes que l'on retrouve dans le muscle lisse sont les formes α , β , δ , ϵ , ζ (160,161).

Les structures des PKC dépendantes du calcium peuvent se diviser en quatre régions constantes (C1-C4) et cinq régions variables (V1 à V5). Ces différentes régions peuvent se retrouver dans le domaine régulateur ou dans le domaine catalytique. Dans le domaine catalytique, on retrouve le site de liaison à l'ATP et son site actif. Le site catalytique seul (PKM) a la propriété d'être actif de façon constitutive. Au niveau du domaine régulateur, on retrouve les sites de liaison au calcium, aux phospholipides et au DAG. C'est la région C1 du domaine régulateur qui va lier le DAG (structure en doigts de zinc). De plus, c'est dans cette région que l'on retrouve une partie qui agit comme pseudosubstrat permettant l'inhibition du site catalytique de l'enzyme lorsque celle-ci est en position inactive. La différence structurale pour les enzymes indépendantes du calcium se situe au niveau de la région C2 puisqu'elle est absente pour ces enzymes. Le reste de la structure est similaire.

Habituellement, l'activation des PKC dans la contraction du muscle lisse vasculaire se fait par l'intermédiaire du DAG (162). Le DAG permet à l'enzyme qui est dans son état inactif, par un repliement de la molécule, de changer de conformation et ainsi déplacer l'inhibiteur du site catalytique, c'est-à-dire le pseudosubstrat. L'enzyme qui était au niveau du cytosol se transporte à la membrane plasmique. Par exemple, les PKC potentialisent grandement l'activité des canaux calciques de type L en les phosphorylant. Cela permet donc de faire entrer plus de calcium à l'intérieur de la cellule favorisant ainsi la contraction musculaire lisse. La PKC peut maintenant phosphoryler de nombreux substrats qui sont impliqués dans la régulation de l'influx calcique favorisant le mécanisme contractile. Ceci inclut le fragment de 20 kDa de la chaîne légère des myosines, les kinases de la chaîne légère des myosines, les canaux calciques sensibles au voltage, la phospholipase A2 et D ainsi que la pompe Na^+/Ca^+ . Par exemple, les PKC peuvent potentialiser grandement l'activité des canaux calciques de type L en les phosphorylant. Ceci permet donc de faire entrer plus de calcium à l'intérieur de la cellule

favorisant ainsi la contraction musculaire lisse. La PKC dans cette série d'événements permet l'activation de la contraction de muscle lisse (163).

2.4.2. Les kinases des chaînes légères de myosine (KCLM)

Ces kinases sont parmi les plus impliquées au niveau de la contraction du muscle lisse. Elles ont une spécificité très grande pour leur substrat qui est le résidu Ser près de l'extrémité N-terminale des chaînes légères de myosine. On retrouve différentes isoformes dont le poids moléculaire se situe entre 80 et 150 kDa. Ces kinases possèdent un site de liaison pour le complexe Ca^{2+} -calmoduline, un site d'autoinhibition, un site de liaison à l'actine, la myosine et l'ATP, et un site de phosphorylation par différentes protéines kinases (164).

Au repos, l'enzyme se retrouve dans un état semblable à celui de la PKC, c'est-à-dire qu'une partie de l'enzyme agit comme un pseudosubstrat et l'empêche d'être active. C'est lors d'une liaison au complexe Ca^{2+} -calmoduline qu'il y a changement de conformation et activation de l'enzyme. Lorsque la KCLM est active, elle phosphoryle la sérine libérant ainsi les têtes de myosines et provoquant l'interaction actine-myosine et la contraction du muscle lisse (165,166).

2.4.3. Les tyrosines kinases

Les tyrosines kinases ont la propriété de phosphoryler les résidus tyrosines et on les regroupe dans différentes familles. Elles peuvent faire partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, de la famille des kinases cytosoliques ou bien de la famille associée à la membrane. Parmi les récepteurs tyrosine kinases, on retrouve le récepteur à l'insuline, le récepteur à l'EGF et le récepteur PDGF. Dans la famille des tyrosines kinases cytosoliques on retrouve les protéines JAKs et les kinases de type membranaires,

les protéines Src. Parmi les protéines Src il y a deux sous-types, c-Src et Fyn, que l'on retrouve dans le muscle lisse vasculaire (167).

Il semblerait que des tyrosines kinases de la famille cytosolique ou bien de la famille associée à la membrane, pourraient jouer un rôle dans la contraction. Certaines études démontrent en effet que l'angiotensine II, la vasopressine et l'ET-1 stimulent la phosphorylation des résidus tyrosine (168,169). Certaines tyrosine kinases semblent plus impliquées dans les processus vasoconstricteurs engendrés par certains peptides comme par exemple l'ATII.

2.4.3.1 JAK et TYK

De récentes études ont démontrées que le récepteur AT1 stimulait la phosphorylation de tyrosines activant la voie de signalisation de la MAP kinase induisant l'expression de l'ARNm *c-fos*. La phosphorylation de ces tyrosine kinases serait causée par des protéines associées avec le récepteur, incluant les kinases Src, Lck, Fyn et les kinases de la famille Janus (JAK et TYK). La famille JAK serait un médiateur clef pour l'expression d'ARNm de gènes impliqués dans la croissance. Récemment, il a été démontré que JAK et TYK associés aux récepteurs activés par son agoniste, stimulaient la phosphorylation de tyrosines d'une famille de facteurs de transcription nommée STAT. De récentes études ont démontré que l'ATII activait rapidement JAK2 et TYK2 et qui par le fait même phosphorylait les tyrosines de STAT113 et STAT91 dans les fibroblastes cardiaques néonatales. De plus, JAK2 immunoprécipite avec le récepteur AT1 suggérant le rôle de ces kinases très tôt dans l'activation du récepteur par l'ATII.

2.4.3.2 Famille SRC kinases

Les kinases de la famille SRC sembleraient être les candidates permettant d'initier l'activation des voies de signalisation suite à l'activation du récepteur AT1. En fait, cette

affirmation provient du fait que l'ATII stimule la phosphorylation de la PLC- γ , un substrat Src. La c-Src est le membre de la famille tyrosine kinases cytosoliques le mieux caractérisé pour participer à la transduction du signal stimulé par les facteurs de croissance. Il y a au moins 14 différentes kinases Src dont 3 membres (c-Src, Fyn, et Yes) qui sont exprimés dans la plupart des tissus. Plusieurs laboratoires ont suggéré que la kinase c-Src jouent un important rôle dans la transduction du signal de l'ATII. Il a été démontré que l'activation des cellules musculaires lisses par l'ATII était associée avec l'activation rapide de c-Src. Dans les fibroblastes cardiaques l'ATII activerait les tyrosine kinases Fyn et c-Src.

2.4.3.3 Interactions des récepteurs couplés aux protéines G et certains récepteurs avec activité tyrosine kinases

Récemment, il a été démontré qu'une activation rapide des récepteurs à tyrosine kinases (EGF, PDGF) était observée lors de la liaison de récepteurs liés aux protéines G par leurs agonistes tel que l'endothéline, la thrombine et les acides lysophosphatidiques et l'ATII. Ceci suggère donc que les effets de ces agonistes sont en partie causés par l'activation intermédiaire de PDGF et EGF(170).

Afin d'identifier les voies de signalisation empruntées par de nouveaux composés vasoconstricteurs, certains inhibiteurs des tyrosine kinases ont été très utiles. Parmi ceux-ci, il y a la génistéine, la tyrphostine et l'erbstatine. Ces inhibiteurs sont assez sélectifs puisque qu'on observe peu d'effets au niveau des Ser/Thr kinases (171-174).

2.5. Fonctionnement et régulation de l'appareil contractile

Comme mentionné précédemment, plusieurs protéines et mécanismes cellulaires sont responsables d'une augmentation intracellulaire de calcium (Figure 8). Cette augmentation de Ca^{2+} ainsi que la présence de protéines régulatrices vont permettre

l'interaction actine-myosine nécessaires à la contraction du muscle lisse. Comme le démontre la figure 8, la tête globulaire de la myosine permet l'hydrolyse de l'ATP et ainsi la liaison à l'actine. Lors de cette liaison, un phosphate est libéré permettant au processus de glissement des filaments de se faire. Le glissement des filaments d'actine et de myosine permet le raccourcissement des myofibrilles, ce qui entraîne la contraction musculaire lisse. L'hydrolyse d'une autre molécule d'ATP va permettre le retour en position de repos de ces filaments (175). Le processus contractile est régulé par de nombreux facteurs. Parmi ces facteurs, on retrouve la protéine calmoduline. La liaison du calcium à la calmoduline va permettre un changement de conformation causant une augmentation du taux d'hélicité de la protéine et l'exposition d'une partie hydrophobe de la molécule. Cette partie hydrophobe permet à la calmoduline de lier et de réguler certaines protéines importantes dans la régulation de la contraction. Comme il a été déjà mentionné, le complexe Ca^{2+} -calmoduline est essentiel à la régulation de kinases des chaînes légères de la myosine, qui joue un rôle majeur dans la contraction. Suite au changement de conformation du complexe Ca^{2+} -calmoduline, celui-ci se lie avec la KCLM. Ces kinases deviennent actives et peuvent phosphoryler les chaînes légères de myosine (176,177).

Le processus contractile est observé lorsqu'il y a une forte concentration de calcium ionisé dans le cytoplasme. Cependant lorsque cette quantité de calcium est faible ($<10^{-7}$ M), les myosines ont une activité phosphatase qui empêche le mécanisme d'action de se faire. Une forte concentration de Ca^{2+} permet à l'activité des KCLM de l'emporter sur l'activité phosphatase des myosines et la contraction a lieu. Outre ces protéines et mécanismes de régulation, il existe d'autres protéines récemment mises en évidence. Ces protéines de régulation, la caldesmone et la calponine, se retrouvent sur les filaments d'actine.

La caldesmone est une protéine qui serait un peu l'équivalent de la troponine au niveau du muscle strié. Elle a un poids d'environ 130 kDa et elle interagit avec l'actine, la myosine et la tropomyosine. En absence d'ions calciques, elle se lie à l'actine plutôt qu'à la calmoduline et inhibe ainsi l'activité ATPasique de la myosine et par le fait même la contraction. Lorsque la concentration de calcium se situe de 1 à 10 μM , la caldesmone se lie à la calmoduline permettant l'interaction actine-myosine de se faire. La caldesmone peut être phosphorylée par plusieurs kinases tel la Ca^{2+} -CaM Kinase III (178), la PKC (179), la caséine kinase (180,181) et les MAP kinases, diminuant son affinité pour l'actine-myosine. La protéine calponine, quant à elle, semble exercer des fonctions semblables à la caldesmone mais son rôle n'est pas encore clairement déterminé (182).

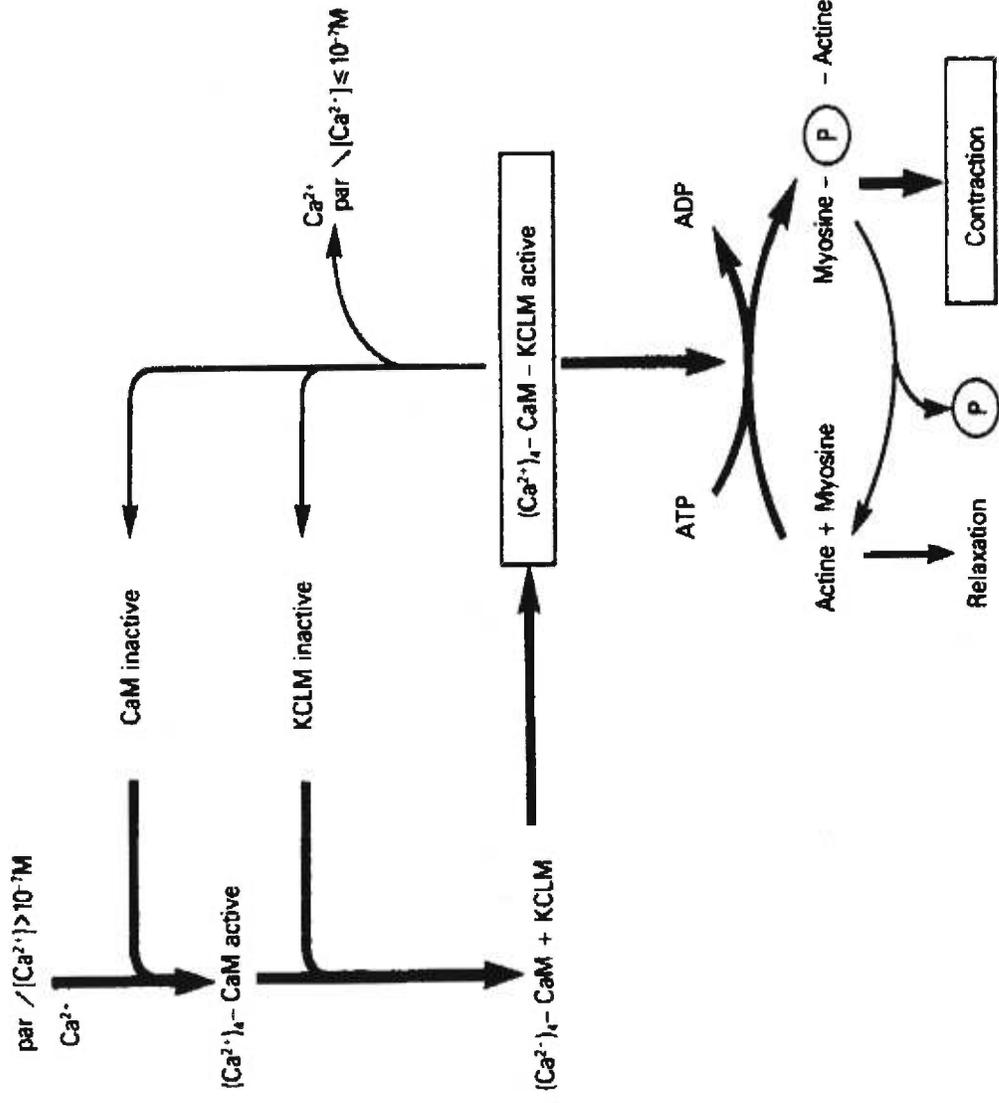


Figure 8. Régulation de la contractilité par phosphorylation/déphosphorylation de la myosine
Adapté de Landry et Gies (1994) p.584

2.6. L'endothélium vasculaire

Outre le muscle lisse, les artères sont tapissées d'une couche de cellules endothéliales en contact avec le sang. Cet endothélium libère de nombreuses substances agissant sur la contractilité des cellules musculaires lisses. Ces différentes substances peuvent être libérées et potentialisées par des agonistes. On retrouve des substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote, la prostanglandine I₂ et vasoconstrictrices comme l'endothéline, l'ATII. Ces différentes substances vasoactives se lient à des récepteurs ou enzymes cytosoliques au niveau du muscle lisse et peuvent ainsi effectuer leur action vasoconstrictrice ou vasodilatatrice.

2.6.1. L'endothéline

Ce polypeptide fut isolé et purifié par l'équipe de Yanagisawa en 1988 (183). L'endothéline est le plus puissant vasoconstricteur connu jusqu'à maintenant. Sa structure moléculaire est semblable à certaines neurotoxines (safariotoxines) produites par le scorpion. L'endothéline fut isolée à partir de plusieurs lignées cellulaires provenant de différents organismes. L'endothéline est un polypeptide composé de 21 acides aminés et comprend trois types d'isoformes dont l'endothéline-1 (ET-1), (ET-2) et (ET-3) lesquels diffèrent de quelques acides aminés. Cependant, l'ET-1 représente la forme la plus abondante. De plus, il existe une quatrième forme d'endothéline (ET-4) que l'on retrouve plutôt au niveau de l'intestin (184,185).

Synthèse et libération

L'endothéline est produite par les cellules endothéliales ainsi que par une variété d'autres cellules (cellules musculaires lisses au niveau vasculaire ainsi que les cardiomyocytes) comprises dans différents tissus. La synthèse de l'endothéline débute tout d'abord par la formation d'un peptide de 211 ou de 145 ou de 138 acides aminés que l'on nomme préproendothéline-1, -2, -3. Cette forme précurseur de l'endothéline subira deux clivages

dont un par l'endopeptidase (clivant des acides aminés dibasiques) aux sites Lys51-Arg53 et Arg92-Arg93 ainsi que la carboxypeptidase qui coupe séquentiellement les résidus Arg92 et Lys91 de la queue carboxy-terminale. Suite à l'action de ces enzymes il y a formation de la pro-ET ou plutôt la big ET composés de 38, 38 et 41 acides aminés respectivement. Ensuite la big ET est clivée entre le Trp73-Val74 par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) en peptides matures physiologiquement et actifs (185).

La synthèse et la libération de l'endothéline est sous le contrôle de différents facteurs. L'angiotensine-II, la vasopressine, la bradykinine, l'endotoxine, le PAK, le TNF- α , l'IL-1, le TGF- β ainsi que les forces de cisaillement sont des stimulateurs de la synthèse et relâche d'ET-1 (186). Comme effet contraire le monoxyde d'azote, les peptides natriurétiques de type A et B ont pour effet de diminuer la production d'endothéline (187).

Les récepteurs de l'endothéline

Les récepteurs de l'endothéline ont été isolés et clonés. Deux récepteurs ont été caractérisés, ET_A et ET_B. Ces récepteurs (chez l'humain) sont en fait des glycoprotéines avec environ 63% d'identité au niveau des acides aminés. Un troisième récepteur (ET_C) a été décrit seulement chez un espèce de grenouilles *X. Leavis*. Cependant son homologie avec les deux autres récepteurs est moins grande (environ 50%). Ces récepteurs ont une affinité différente en ce qui concerne les différentes isoformes d'endothéline. Le récepteur ET_A reconnaît des segments de l'extrémité N-terminale et C-terminale de la structure tertiaire de ET, alors que le récepteur ET_B reconnaît de manière prédominante, la partie C-terminale. De plus, étant donné une homologie de seulement 63% entre ces deux récepteurs explique aussi les différences d'affinités des récepteurs pour les isoformes de l'endothéline puisque se sont des molécules relativement différentes.

Les récepteurs de l'endothéline sont des récepteurs à sept passages couplés aux protéines G. La liaison de l'endothéline à son récepteur est très étroite mais sa dissociation est relativement longue. Ceci engendre donc un effet prolongé. La distribution de ces récepteurs varie d'un tissu à l'autre. Les récepteurs ET_A dont l'affinité de liaison pour ET-1 est égale à ET-2 et supérieure pour ET-3 se retrouvent principalement dans le coeur, les vaisseaux sanguins du cerveau et les muscles lisses vasculaires. Les récepteurs ET_B démontrent une affinité comparable aux trois endothélines et sont plutôt concentrés dans le rein, l'utérus, le système nerveux central et les cellules endothéliales. On retrouve aussi le récepteur ET_B au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, cependant son abondance est beaucoup moins grande que le récepteur ET_A à ce niveau. L'activation des récepteurs ET_A et ET_B sur le muscle lisse vasculaire induit une vasoconstriction. Par contre, l'activation du récepteur ET_B sur les cellules endothéliales induit une vasodilatation car il y a relâche de NO et /ou prostacycline. Par conséquent, l'effet hémodynamique prédominant de l'endothéline dans un organe donné dépend du type de récepteur stimulé, de sa localisation et de son abondance (188).

2.6.1.1. Effets et mécanismes d'action sur les cellules musculaires lisses vasculaires

La liaison de l'endothéline à son récepteur sur la cellule musculaire lisse peut avoir plusieurs effets. L'endothéline par le biais de protéines G (plus spécifiquement G_q), occasionne l'activation la phospholipase C (189). Cette dernière enzyme peut alors hydrolyser le PIP₂ afin de former l'IP₃ et le DAG. La stimulation du récepteur ET_A par l'endothéline-1 dans les cellules vasculaires engendre une augmentation biphasique du calcium intracellulaire. La première phase est causée par la production de l'IP₃ qui engendre une libération de calcium intracellulaire. La seconde phase, beaucoup plus lente et soutenue proviendrait d'un influx calcique provenant du milieu extracellulaire. Cette forte augmentation intracellulaire de calcium ionisé peut moduler divers processus comme la relâche de neurotransmetteurs, la sécrétion, et l'activation d'enzymes comme les

kinases de la chaîne légère des myosines qui activeront la machinerie cellulaire contractile. La nifédipine, un agent qui inhibe l'influx de calcium extracellulaire via les canaux calciques de type L, antagonise certaines actions de l'endothéline. Le DAG occasionne une activation prolongée de la PKC qui phosphoryle différentes protéines impliquées dans l'activation et l'inactivation de l'expression de certains gènes et autres protéines (190). Le DAG peut être considéré comme un agent sensibilisant l'appareil contractile vis-à-vis le Ca^{2+} . Ce processus de sensibilisation serait consécutif à des phosphorylations par suite de l'activité de la PKC. L'activation de la PKC augmente l'activité des kinases des chaînes légères de la myosine par rapport à celle des phosphatases des chaînes légères de la myosine sensibilisant ainsi l'appareil contractile vis-à-vis du Ca^{2+} .

De plus, l'endothéline peut aussi engendrer une augmentation du pH intracellulaire. En effet, il a été suggéré que l'endothéline pouvait stimuler les pompes de protons des ions sodium et hydrogène au niveau du sarcolemme. Cette augmentation du pH intracellulaire augmente la sensibilité des myofilaments au calcium, ce qui augmente la contractilité sans changer la concentration de calcium. Il est aussi à noter que l'augmentation du pH intracellulaire peut aussi causer une stimulation des réponses hypertrophiques et mitogéniques dans différentes cellules. De plus, la liaison de l'endothéline à son récepteur peut aussi altérer la perméabilité des canaux ioniques (comme les canaux calciques voltage-dépendant de type-L et augmenter le calcium intracellulaire). Elle peut aussi causer l'activation d'autres seconds messagers comme la phospholipase A qui ira activer la production des prostaglandines et thromboxanes. Ces différents mécanismes d'action sont observés dans les cellules musculaires lisses puisque l'on retrouve plus de récepteurs ET_A que de ET_B (184).

Au niveau des cellules endothéliales on retrouve le récepteur ET_B qui est activé par les mêmes mécanismes d'action. Cependant au niveau des cellules endothéliales l'entrée de calcium dans la (causée par l'endothéline sur le récepteur ET_B) va causer l'activation de la NO synthétase constitutive qui est une enzyme intracellulaire Ca^{2+} /Calmoduline-dépendante. Cette enzyme produit le monoxyde d'azote (NO) qui diffuse au niveau des cellules musculaires lisses où il initie ses propres actions physiologiques en activant la guanylate cyclase soluble cytosolique. L'activation de cette guanylate cyclase transforme le GTP en GMPc, avec augmentation du niveau de GMPc intracellulaire. Cette augmentation a pour conséquence d'entraîner la relaxation du muscle lisse vasculaire ou cardiaque. Le GMPc peut entraîner une relaxation du muscle lisse de différentes façons. Il peut moduler la concentration intracellulaire de calcium ionique en inhibant l'influx calcique au niveau des canaux calciques dépendants du potentiel ou bien en faisant extrusion du Ca^{2+} par les Ca^{2+} -ATPase de la membrane cytoplasmique et par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} . De plus, il peut aussi y avoir stimulation de la pompe Na^+/K^+ ATPase. Une autre façon d'entraîner une relaxation est par la modulation de l'activité des protéines contractiles. En fait, le GMPc peut diminuer la sensibilité de l'appareil contractile envers le Ca^{2+} . Ceci module donc directement l'activité du système actine-myosine. Le GMPc stimule la PKG qui elle phosphoryle les chaînes légères de myosine. Ceci se traduit par une diminution de son activité et ainsi une diminution de la contraction. Le GMPc peut aussi stimuler le transfert du Ca^{2+} dans le reticulum sarcoplasmique et inhiber la formation de l' IP_3 . L'effet vasorelaxant du NO diminue la vasoconstriction causée par l'endothéline (via ET_A et ET_B au niveau des cellules musculaires lisses) cependant, cette vasoconstriction est toujours présente malgré cela. De toute évidence celle-ci serait encore plus importante s'il n'y avait pas de NO libéré.

LE PROJET DE RECHERCHE

PROJET DE RECHERCHE

De récentes études ont démontré que l'hexarelin, un analogue GHRP, a un effet protecteur contre les dysfonctions ventriculaires cardiaques observées suite à une ischémie myocardique chez les rats déficients en GH et chez les rats âgés. L'hexarelin semble agir directement au niveau du coeur sans l'implication de l'axe GH et IGF-1. Des sites de liaison ont été mis en évidence dans les membranes cardiaques de rat à l'aide d'un dérivé photoactivable de l'hexarelin qui se lie à une protéine de poids moléculaire de 84 kDa. De plus, la liaison de l'hexarelin engendre une vasoconstriction coronarienne dans le modèle de coeur de rat isolé, perfusé.

Afin de démontrer que l'effet cardiaque observé avec l'hexarelin n'est pas unique à cette molécule, nous avons décidé d'étudier un autre analogue GHRP, le EP 70905, en suivant les mêmes méthodologies que pour l'hexarelin. Tout d'abord, nous tentons de démontrer que le EP 70905 se lie aux membranes cardiaques avec une affinité semblable à celle de l'hexarelin. En second lieu, nous voulons démontrer par des études fonctionnelles que la réponse pharmacologique du EP 70905 dans le coeur de rat est similaire à celle induite par l'hexarelin. Certains mécanismes d'action potentiellement responsables de la vasoconstriction au EP 70905 sont aussi étudiés. L'implication des canaux calciques de type L, de la PKC et des tyrosine kinases a été analysée puisque ces voies sont impliquées dans les effets d'agents vasoconstricteurs.

Ces différentes expériences permettront de confirmer l'hypothèse que des sites de liaison pour plusieurs GHRPs existent au niveau cardiaque. De plus, une meilleure caractérisation des voies de signalisation utilisées par les GHRPs au niveau cardiaque sera importante pour mieux comprendre leur rôle au niveau cardiaque.

CHAPITRE 3
ARTICLE SCIENTIFIQUE

**CARDIOVASCULAR EFFECT OF EP 70905, A NEW HORMONE RELEASING
PEPTIDE ANALOG.**

**A. Perreault¹, JF. Bouchard¹, V. Bodart¹, R. Deghenghi², H. Ong¹ and D.
Lamontagne¹**

¹ Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Canada

² Europeptides (R.D), Argenteuil, France.

Address for correspondence:

Dr. Daniel Lamontagne

Faculté de Pharmacie Université de Montréal

P.O Box 6128, Succursale Centre-Ville

Montreal, Quebec, H3C 3J7 Canada

Telephone: (514) 343-5909

Fax: (514) 343-2102

E-mail: daniel.lamontagne@umontreal.ca

Abstract

EP 70905, a new analog of the growth hormone releasing peptides (GHRP) has been shown to displace a radiolabeled photoactivatable hexarelin derivative from specific binding site in cardiac membrane preparations. In order to assess the cardiovascular activity of this GHRP analog, dose-response curves to EP 70905 were charted by successive infusions of this ligand from 10 nM to 10 μ M in the perfused Langendorff rat heart. EP 70905 infusion induced an increase of the coronary perfusion pressure from 75 ± 1.0 mmHg to 148 ± 5.3 mmHg for a coronary flow rate of 12 ± 0.9 ml/min. The increase of coronary pressure was significantly more important with EP 70905 than with hexarelin. Perfusion with genistein, a tyrosine kinases inhibitor, at 1 μ M did not affect the coronary perfusion pressure induced by EP 70905 suggesting that tyrosine kinases are unlikely to be involved in the coronary vasoconstriction. Perfusion of LU 302 872 an antagonist of ET-A and ET-B receptors decrease slightly the coronary pressure induced by EP 70905, suggest that endothelin-1 plays a minor role in the EP 70905 vasoconstriction. The role of protein kinase C (PKC) in mediating the increase of the coronary perfusion pressure was demonstrated by a selective inhibitor, chelerythrine, as this compound (1 μ M) significantly reduced the coronary perfusion pressure induced by EP 70905. Nifedipine (1 μ M) evoked a significant right shift of the EP 70905 curve and decreased the maximal effect suggesting the involvement of L-type Ca^{2+} channels as signalling transduction pathway. In conclusion, the GHRP derivative EP 70905 binds to the same binding sites than hexarelin and induces a potent but reversible coronary vasoconstriction in the perfused Langendorff rat heart. This effect is, at least in part, mediated by PKC activation, calcium influx through L-type channels and a minor contribution of endothelin-1.

1. Introduction

Growth hormone-releasing peptides (GHRPs) and non-peptidyl GHRP mimetics are synthetic analog derived from the enkephalin, an opiate family. These small peptides and peptidomimetics are GH secretagogues both *in vitro* and *in vivo* (1). GH secretagogues act through the activation of their receptors found in the pituitary gland and the hypothalamus. Specific GH secretagogue receptors (2,3,4) and receptor subtypes (5) have been identified in humans and in some mammals. These receptors possess a seven transmembrane topography similar to that of the G-protein coupled receptor family. Using a photolabelling approach, Bodart et al (6) reported that hexarelin, a hexapeptide member of the GHRP family with a strong GH-releasing activity, exhibits specific binding sites in the heart and exerts a strong vasoconstriction in rat isolated Langendorff hearts. However, until now, we didn't know if the cardiovascular effects of hexarelin was only specific to this peptide. Therefore, the first aim of our study was to test the cardiovascular effects of a new GHRP, namely EP 70905. The second aim of our study was to further investigate the mechanisms of the vasoconstriction induced by GHRP. The mechanisms assessed were endothelin release, tyrosine kinase and protein kinase C activation, and Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels.

2. Methods

2.1. *Isolated heart preparation*

The investigation was performed in accordance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague Dawley rats (300-325 g) were narcotized with CO₂ until a complete loss of consciousness and promptly decapitated. Hearts were rapidly excised and immersed into ice-cold Krebs-Henseleit heparinised buffer (10 IU. ml⁻¹). They were immediately mounted on the Langendorff setup and perfused at a constant flow rate by means of a digital roller pump. The normal perfusion solution consisted of a modified Krebs-Henseleit buffer containing (in mM): NaCl 118, KCl 4, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1, NaHCO₃ 24 and D-glucose 5 and pyruvate 2. The buffer solution was gassed with 95% O₂-5% CO₂ (pH 7.4) and kept at a constant temperature of 37° C. A 20-ml compliance chamber along the perfusion line ensured a continuous flow. The flow rate was adjusted during the 20-min stabilization period to obtain a coronary perfusion pressure of approximately 75 mmHg and was held constant thereafter. Flow rate was measured during all the experiment with an in-line ultrasonic flow probe and meter (Transonic Systems Inc., model T106). All drugs were administered through a Y connector into the aortic cannula with syringe pumps (Harvard Apparatus, model 11) at one hundredth of the coronary flow rate. Adequate mixing of the drugs was ensured by the turbulent flow created in the reverse drop shaped aortic cannula. All concentrations mentioned in the text and figures refer to the final concentration after mixing. Coronary perfusion pressure was measured with a pressure transducer connected to a side arm of the aortic perfusion cannula. Isovolumetric left ventricular pressure and its first derivative (dP/dt) were measured by a fluid filled latex balloon inserted into the left ventricle and connected to a second pressure transducer. The volume of the balloon was adjusted to obtain a diastolic

pressure between 5 and 10 mmHg. Heart rate was derived from the left ventricular pressure trace by a tachograph. Data were recorded on a polygraph system (Grass Model 79 polygraph, Astro-Med Inc.).

2.2. Experimental protocol with Langendorff hearts

The pharmacological effect of EP 70905 was studied by performing dose-response curves (from 10 nM to 10 μ M) by successive infusions of increasing concentrations. The infusions were maintained for 5-10 min, which was long enough to reach a steady state, without any washout period between infusions. To assess the signaling pathways involved, dose-response curves to EP 70905 were performed 30 min after the beginning of a continuing infusion with either the L-type calcium channel blocker nifedipine (1 μ M), the PKC inhibitor chelerythrine (1 μ M) the tyrosine kinase inhibitor genistein (10 μ M), the non-selective ET-A and ET-B receptor antagonist LU 302 872 (1 μ M), or their respective vehicles.

2.3. Endothelin assay

Coronary effluent samples (60 ml) were collected in propylene tubes containing 10% trifluoroacetic acid (TFA) to give a final concentration of approximately 0,1 % TFA, and kept at 4°C until they were processed (during the day). The entire sample was loaded into preconditioned (3 ml 100 % acetonitrile, 6 ml 0,1% TFA) Sep-Pak cartridges (Waters Ass., Milford, MA, USA), followed by a wash with 3 ml 0,1% TFA. Endothelin was eluted with 2 ml 60 % acetonitrile in 0,1% TFA yielding a recovery of 100%. The eluates were dried and the dry residue stored at -80°C until assay. The dry

residue was redissolved in 0.25 ml of assay buffer, and endothelin-1 and -2 measured using a commercial radioimmunoassay (RIA) kit (RPA 545, Amersham).

2.5. Membrane preparation

Male Sprague-Dawley rats were anesthetized with sodium pentobarbital and the hearts were promptly removed and placed in ice-cold saline buffer. Cardiac membranes were prepared according to Harigaya et al (32). Briefly, the cardiac tissue was homogenized at 4° C in 10 mM NaHCO₃ pH 7.0, 5 mM NaN₃, 10 μM Pefabloc. The homogenate was centrifuged at 8 700g for 20 min at 4° C. The supernatant was kept on ice and the pellet was homogenized once more in the same buffer. After centrifugation at 8 700g for 10 min at 4° C, the supernatant was pooled with the previous one and both were centrifuged at 35 000 g for 20 min at 4° C. The pellet was resuspended and homogenized in 20 mM Tris-Maleate pH 6.8 containing 0.6 M KCl. The homogenate was then centrifuged at 35 000g for 60 min at 4° C. The resulting pellet was washed once in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 with 2 mM EGTA and frozen in liquid nitrogen. Protein concentration was determined with the bicinchoninic acid method using BSA as standard.

2.6. Iodination of Tyr-Bpa-Ala-Hexarelin

The iodination procedure was performed according to Ong et al (5). Briefly, [¹²⁵I] Tyr-Bpa-Ala-hexarelin was radiolabelled by the lactoperoxidase method and the radiotracer purified by HPLC on a reverse-phase column. The theoretical specific activity of the mono-iodo derivative was 2 000 Ci/mM.

2.7. Receptor binding and photolabelling with [125 I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin

Membranes were incubated in darkness in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM EGTA, 0.01% bacitracin (buffer A) in the presence of the indicated concentration of [125 I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin. Buffer A was degassed under vacuum, sparged with nitrogen and used in capped tubes in order to minimize lipid peroxidation. For the competition binding assays, the incubations were performed in the presence of a fixed concentration of radioiodinated photoactivatable hexarelin derivative (0.33 mM) and increasing concentrations of competitive ligands from 0.1 nM to 10 μ M. After an incubation period of 30 min at 22° C, membranes were submitted to irradiation with UV lamp (365 nm) for 15 min. at 4° C. After centrifugation at 12,000g for 15 min at 4° C, the pellets were resuspended in sample buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 15% 2-mercapto-ethanol and 0.05% bromophenol blue) and boiled for 5 min prior to be subjected to 7.5% SDS-PAGE. Autoradiographic exposure was done at -80°C using Dupont films and Reflection intensifying screen. After autoradiography, the bands corresponding to the specific Mr 84 000 protein were cut out and the radioactivity counted in a γ counter in order to establish saturation and competition curves.

2.8. Chemicals

EP70905 ([Spiro(S,S)-Pro-Leu]-DMrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH₂), hexarelin (His-DTrp(2Me)-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂) were provided by Europeptides (Argenteuil, France) and dissolved with 0.9% NaCl solution. The photoactivatable derivative of hexarelin (Tyr-Bpa-Ala-His-DTrp(2Me)-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂) was obtained by solid phase synthesis according to Bodart et al (6). Carrier free 125 I Na was from Amersham Corp. (Oakville, Canada). Electrophoresis molecular weight markers were

from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Angiotensin II was prepared in Krebs-Henseleit buffer, endothelin-1 prepared in acid acetic 1N containing BSA 0.1%, nifedipine was dissolved in 95 % ethanol and diluted with H₂O. These drugs were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ont, Canada). Genistein was dissolved in propylene glycol and diluted with H₂O containing NaOH 2N (ICN Biochemical, Cleveland Ohio, USA). Chelerythrine (Research Biochemicals International) was dissolved in Krebs Henseleit buffer and LU 302 872 (Knoll, Mannheim, Germany) was dissolved in 0.1 N NaOH and diluted with H₂O. Unless otherwise specified, all the reagents and materials used were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ont, Canada).

2.9. Data analysis

Values represent the mean \pm SE. The effects of the different drugs on the maximal vasoconstriction induced by EP 70905 were tested with ALLFIT for Windows software (33). The comparison between the change in coronary perfusion pressure (delta mmHg) and the measurement of endogenous endothelin were test with a Student t-test. The radioligand competition curves were evaluated by least square, non linear regression analysis. Competition binding experiments were repeated three times with similar results.

3. Results

3.1. Competition of hexarelin and EP 70905 for the binding of [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin in rat cardiac membranes.

Covalent photolabelling of rat cardiac membranes with [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin revealed a single specific binding site at 84 kDa. Figure 1 shows competition curves of EP 70905 and hexarelin with [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin (n=3). Both EP 70905 and hexarelin displaced [¹²⁵I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin with an IC₅₀ value $1.3 \pm 0.40 \mu\text{M}$ and $1.2 \pm 0.32 \mu\text{M}$ respectively. These values are not significantly different ($p > 0.05$).

3.2. Change in coronary perfusion pressure.

The coronary perfusion pressure before EP 70905 infusion was $75 \pm 1.0 \text{ mmHg}$ for a coronary flow rate of $12 \pm 0.9 \text{ ml/min}$. EP 70905 induced a concentration-dependant increase in coronary perfusion pressure. This increase in coronary pressure was very fast and reversible during the EP 70905 perfusion. A significant change in coronary perfusion pressure to $148 \pm 5.3 \text{ mmHg}$ was observed when hearts were perfused with a concentration of $10 \mu\text{M}$ EP 70905 (n=8). At this concentration, the increase of coronary pressure was significantly more important with EP 70905 than with hexarelin (Figure. 2). The coronary perfusion pressure was similar with lower concentrations of these peptides. The left ventricular end-diastolic pressure and the heart rate were unchanged by EP 70905 even by the highest studied dose (data not shown). However, a 40% reduction was observed at the highest concentration of EP 70905 for both dP/dt max and dP/dt min (data not shown).

3.3. Signalling pathways involved in the vasoconstriction

The role of tyrosine kinases in mediating the increase in coronary perfusion pressure with EP 70905 has been evidenced using a tyrosine kinase inhibitor, genistein. Angiotensin II was used as a positive control to test the efficacy of the tyrosine kinase inhibitor. Hearts perfused with genistein at 10 μ M for 30 min showed a reduced vasoconstriction to angiotensin II (Figure 3, left panel) (n=6). In contrast, genistein at the same concentration did not affect significantly the increase in coronary perfusion pressure induced by EP 70905 (Figure 3, right panel) (n=6) *p<0.05.

The role of endothelin-1 in the vasoconstriction to EP 70905 has been evidenced using an antagonist of ET-A and ET-B receptors, LU 302 872, with endothelin-1 as a positive control. This antagonist exhibits high and balanced affinity to ETA and ETB receptors. Isolated rat hearts perfused with LU 302 872 at 1 μ M for 30 min showed, as expected, a reduced response to endothelin-1 (Figure 4, left panel) (n=6). LU 302 872 at the same concentration also reduced the increase in coronary perfusion pressure induced by EP 70905 at 1 and 3 μ M (Figure 4, right panel). At different concentrations (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M) of EP 70905, coronary effluent samples were collected for endothelin measurement. There was a significant increase in endogenous endothelin only at a concentration of 10 μ M EP 70905 (Figure 5) *p<0.05.

The role of calcium influx in the vasoconstriction induced by EP 70905 was assessed with 1 μ M nifedipine, a L-type Ca²⁺ channel blocker. Nifedipine significantly reduced the vasoconstriction produced by concentrations EP 70905 in the upper range (Figure 6) (n=6) *p<0.05.

The role of protein kinase C (PKC) in mediating the vasoconstriction has been evidenced using a selective inhibitor of PKC, chelerythrine. This compound significantly reduced the vasoconstriction induced by the two highest concentrations of EP 70905 (Figure 6) (n=6) *p<0.05.

4. Discussion

Recently, it was reported that hexarelin, a hexapeptide member of the GHRP family, has specific binding sites in the heart and exerts a strong coronary vasoconstriction in rat isolated hearts (6). In the present study, we have demonstrated that a new GHRP, EP 70905, shares similar specific binding sites in the heart and exerts similar cardiovascular effects. We attempted to clarify the mechanisms of action by which EP 70905 exerts its cardiovascular effects by investigating a possible role of tyrosine kinases, endothelin-1, calcium L-type channels and PKC. We showed that EP 70905 exerts a stronger coronary vasoconstriction than hexarelin in rat isolated hearts, and that the signaling pathway involved in the coronary vasoconstriction includes PKC, calcium L-type channels, and to a lesser extent endothelin-1. Tyrosine kinases were not involved.

4.1. Specific binding sites in the heart

There are some evidences that GHRPs can have a direct action on the heart. Berti et al. reported that hexarelin exerts a protective activity against postischemic dysfunction of the perfused hearts isolated from GH deficient rats (7) and senescent rats (8). This effect was not associated with the GH/IGF-1 axis interacting with receptors at the myocardial level (9-10). This suggested a direct action of hexarelin on cardiac functions. However, Bodart et al. (6) were the first to clearly demonstrate hexarelin binding sites in cardiac membranes and to characterize its cardiovascular effects. However, it was not known if the effects observed with hexarelin were only specific to this GHRP. Therefore, we selected a new GHRP analogue, the EP 70905. EP 70905 is an hexarelin analogue. The histidine at the N-terminal of hexarelin is replaced by Spiro-Leu-Pro. Using a photolabelling approach, we demonstrated that EP 70905 competes with hexarelin for the same specific binding sites in the heart. The capacity of EP

70905 to displace [125 I]-Tyr-Bpa-Ala-hexarelin (express in IC_{50}), was not significantly different than hexarelin.

4.2. Cardiovascular effect of EP 70905 in comparison with hexarelin

Since EP 70905 binds to cardiac membranes with an affinity similar to hexarelin, we compared the cardiovascular effects of these peptides in rat isolated hearts. The increase in coronary perfusion pressure was higher with EP 70905, compared with hexarelin (at 10 μ M). The upper limit of the concentration range was fixed at 10 μ M because at 30 μ M non specific effects was observed. Therefore, this difference in vasoconstriction between EP 70905 and hexarelin can be explained by the fact that the activation by EP 70905 acts through a different pathway than hexarelin. It is possible that the signalling pathway activated by the interaction of EP 70905 with its specific receptor results in stronger intracellular calcium release than the interaction of hexarelin with its receptor. This increase in intracellular calcium could explain the stronger vasoconstriction induced by EP 70905. It would be interesting to see whether the receptor for EP 70905 is coupled to a calcium channel that is specifically activated by EP 70905.

4.3. Implication of endothelin in the vasoconstriction induced by EP 70905

It has been clearly demonstrated that endothelin-1, a natural vasoconstrictor peptide, can produce constriction of vascular smooth muscles through stimulation of specific receptors. (11) It was reported that endothelin-1 synthesis and release can be modulated by different mediators including angiotensin II, vasopressin and others (12, 13). We verified whether endothelin-1 can be released by EP 70905 and be responsible for the

observed vasoconstriction. Using a non selective ET-A and ET-B receptor antagonist, LU 302 807 (14) during an EP 70905 dose-response curve, our results suggest a minor contribution of endothelin-1 at intermediate concentrations of EP 70905. We observed a change in the EP 70905 vasoconstriction only at the intermediate concentrations probably because the effect of endothelin is very weak and can be seen only when the vasoconstriction is not too high. In order to insure that endothelin is released by EP 70905, we measured endogenous endothelin in the coronary effluent during EP 70905 infusions. This confirmed a significant increase in endothelin, but only at the highest dose of EP 70905. However, the endogenous endothelin released in the coronary effluent of isolated rat hearts was in the fM range. This quantity detected would be, theoretically not high enough to increase the coronary perfusion pressure if we compare it with the concentration of exogenous endothelin necessary to produce a measurable vasoconstriction. This cannot be due to the methodology used in the present study, since the basal endothelin values measured were comparable to what has been previously reported in a similar model (15). This can be explained by the fact that endothelin produced in endothelial cells is not released at the luminal side, but mainly at the basal side (16). Therefore, the concentration of endothelin detected in the coronary effluents is most probably a small fraction of the concentration at the vicinity of the receptors. Another hypothesis can be proposed regarding the implication of endothelin in the EP 70905 vasoconstriction. It has been reported that threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to some vasoconstrictors (17-18). Contractions to norepinephrine (3×10^{-8}) were potentiated by threshold (3×10^{-10} M) and low concentrations (10^{-9} M) of ET-1 ($96 \pm 35\%$ and $149 \pm 58\%$) increase from control (17). It is therefore possible that endothelin can act in synergy and increase the vasoconstriction to EP 70905. Although the implication of endothelin cannot be ignored, its contribution in the EP 70905 vasoconstriction remains minor. The basal

measurement was compared with the Opie group that used the same model than us and the ET-1 concentrations obtained by this group are similar (15).

4.4. Role of tyrosine kinases in the vasoconstriction induced by EP 70905

Strong evidences for the implication of tyrosines kinase in vascular constriction have been frequently reported in the past few years. Studies performed with cells in culture suggested that vasoconstrictors like endothelin-1 and angiotensin II can stimulate tyrosine phosphorylation (19-20). Another group showed that tyrosine phosphorylation can modulate calcium as well as other ion movements in vascular smooth muscles. Our results did not reveal tyrosine kinases implication in the vasoconstriction observed with EP 70905, using 10 μ M of the tyrosine kinases inhibitor, genistein. This concentration is known to specifically inhibit tyrosine phosphorylation by a broad spectrum of tyrosine kinases (20, 23), and it effectively reduced the vasoconstriction induced by angiotensin II in the present study.

4.5. Role of calcium in the vasoconstriction induced by EP 70905

Calcium influx has been also shown to play an important role in the vasoconstriction induced by numerous vasoconstrictive agents. (24, 25, 26). The increase in free calcium required for agonist-induced vasoconstriction can come from the extracellular source through voltage-dependent calcium channels or from intracellular sources (sarcoplasmic reticulum) that release calcium through activation of IP₃-sensitive and insensitive channels. Most of the extracellular influx is believed to occur through L-type calcium channels in vascular smooth muscle. (27). In the present study, inhibition of L-type calcium channels with a specific inhibitor, nifedipine (28-30), significantly reduced the

vasoconstriction induced by EP 70905. This strongly suggests that the coronary vasoconstriction induced by EP 70905 involves L-type calcium channels. This implication is far from being marginal since the vasoconstriction induced by EP 70905 was practically abolished by nifedipine.

4.6. Role of PKC in the vasoconstriction induced by EP 70905

Activation of protein kinase C is a crucial step in the vasoconstriction induced by several vasoconstrictor acting on G-protein coupled receptors (31). This enzyme can phosphorylate, among others, L-type calcium channels and increase their activity. This increased activity will result in an increase of intracellular free Ca^{2+} which will enhance the contractile response. In the presence of chelerythrine, a PKC inhibitor, we observed a marked reduction in EP 70905-induced vasoconstriction. This strong reduction in the EP 70905 induced vasoconstriction suggests an important implication of PKC.

In conclusion, the results of the present study confirm, that another GHRP, EP 70905, binds with an affinity similar in hexarelin to rat cardiac membranes and exerts an increase in coronary vasoconstriction. Furthermore, our results suggest that the signaling pathways involved in this coronary vasoconstriction include L-type calcium channels and PKC. Endothelin-1 may play a facilitating role. Finally, tyrosine kinases are not implicated.

REFERENCES

1. Locatelli V and Torsello A. Growth hormone secretagogues: focus on the growth hormone-releasing peptides. *Pharmacol. Research.* 1997;36, 415-23.
2. Howard A.D, Feighner S.D, Cully D.F, Arena J.P, Liberato P.A, Rosenblum C.I, Hamelin M, Hreniuk D.L, Palyha O. C, Anderson J, Paress P.S, Diaz C, Chou M, Liu K. K, McKee K.K, Pong S.S, Chaung L.Y, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji D.J.S, Dean D. C, Melillo D.G, Van der Ploeg L.H, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273(5277) :974-977.
3. McKee K.K, Palyha O.C, Feighner S.D, Hreniuk D.L, Tan C.P, Phillips M.S, Smith R.G, Van der Ploeg L.H, Howard A.D. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol. Endocrinol.* 1997 ;1(4):415-423.
4. Hreniuk D.L, Nargund R, Underwood D, Tata J.R, Dean D.C, Tan C.P, Mcknee K.K, Woods J.W, Patchett A.A, Smith R.G, Van der Ploeg L.H. Structural requirements for the activation of the human growth hormone secretagogue receptor by peptide and non peptide secretagogues. *Molec. Endocrinol.* 1998;12:137-145.
5. Ong H, McNicoll N, Escher E, Collu R, Deghenghi R, Locatelli V, Ghigo E, Muccioli G, Boghen M, Nilsson M. Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology* 1998;139(1):432-435.

6. Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N, Escher E, Carriere P, Ghigo E, Sejlitz T, Sirois MG, Lamontagne D, Ong H. Identification and characterization of a new growth hormone –releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res.* 1999 Oct 29 ;85(9):796-802.
7. De Gennaro Colonna V, Rossini G, Bernareggi M, Muller E, Berti F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone deficient rats: Protection by Hexarelin. *Eur.J. Pharmacol* 1997; 334:201-207.
8. Rossoni G, De Gennaro Collona V, Bernareggi M, Polvani G.L, Müller E.E, Berti F. Protectant activity of Hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1998;32(2):260-265.
9. Mathews L.S, Enberg B, Norstedt G. Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 1989;264(17): 9905-9910.
10. Guse A.H, Kiess W, Funk B, Kessler U, Berg I, Gercken G. Identification and characterization of insulin-like growth factor receptors on adult rat cardiac myocytes: linkage to inositol 1, 4, 5-trisphosphate formation. *Endocrinology* 1992;130(1):145-151.
11. Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br.J.Pharmacol.* 1993;110:777-82.

12. Hahn Aw, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul.* 1990;1:649-59.
13. Yanagisawa 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;332:411-5.
14. Raschack M, Göck S, Unger L, Hahn A, Amberg W, Jansen R, Alken P, Weber A, Hergenröder S. LU 302 872 and Its Racemate (LU 224 332) Show Balanced Endothelin-A/B Receptor Affinity, High Oral Activity, and Inhibit Human Prostate Tissue Contractions. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1998;31(suppl.1):S241-S244.
15. Brunner F, du Toit EF, Opie LH. Endothelin release during ischaemia and reperfusion of isolated perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1992 Nov;24(11):1291-1305.
16. Friedrich Brunner. Tissue endothelin-1 levels in perfused rat heart following stimulation with agonist and in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell.Cardiol.* 1995;27:1953-1963.
17. Yang Z, Richard V, Von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Lüscher T.S.F. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. *Circulation.* 1990;82(1): 188-195.

18. Dohi Y, Hahn A.W.A, Boulanger CM, Bühler F.R, Lüscher T.F. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension*. 1992;19(2): 131-137.
19. Force T, Kyriafis JM, Avruch J, Bonventre JV. Endothelin, vasopressin, and angiotensin II enhance tyrosine phosphorylation by protein kinase C-dependent and-independent pathways in glomerular mesangial cells. *J.Biol.Chem*. 1991;266:6650-6.
21. Hollenberg MD. Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol. Sci*. 1994;15:108-114.
22. Klohs WD, Fry DW, Kraker AJ. Inhibitors of tyrosine kinase. *Curr. Opin. Oncol*. 1997;9:567-568.
23. Lewitzki A, Gazut A. Tyrosine kinase inhibitor an approach to drug development. *Science* . 1995;267:1782-1788.
24. Bkaily G, Peyrow M, Sculporeanu A, Jacques D, Chahine M, Regoli D, Sperelakis N. Angiotensin II increase I_{S1} and blocks I_K in single aortic cell of rabbit. *Pflugers Arch*. 1988;412:448-
25. Ohya Y, Sperelakis N. Involvement of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res*. 1991;68:763-771.

26. Worley JF, Quayle JM, Stander NB, Nelaon MT. Regulation of single calcium channels in cerebral arteries by voltage, serotonin and dihydropyridines. *Am. J. Physiol.* 1991;261:H1951-H1960.
27. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependant Ca²⁺ channels. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1991;12:349-354.
28. McCarthy RT, Cohen CJ. Nimodipine block of calcium channels in rat vascular smooth muscle cell lines. Exceptionally high-affinity binding in A7r5 and A10 cells. *J.Gen.Physiol* 1989;94:669-92.
29. Bean BP, Sturek M, Puga A, Hermsmeyer K. Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs. *Circ.Res.* 1986;59:229-35.
30. Yatani A, S Ceidel CL, Allen J, Brown AM. Whole-cell and single-channel calcium currents of isolated smooth muscle cells from saphenous vein. *Circ.Res.* 1987;60:523-33.
31. Walsh MP, Andrea JE, Allen BG, Clément-Chomienne O, Collins EM, Morgan KG. Smooth muscle protein kinase C. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1994;72:1392-9.
32. Harigaya S, Schwartz A. Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle. *Circ Res.* 1969 ;25 :781-794.

33. De Léan A, Hancock AA, Lefkowitz RJ. Validation and statistical analysis of a computer modeling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol Pharmacol.* 1982 ;21 :5-16.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Competition curves of Hexarelin and EP 70905 (○) with [¹²⁵I] Tyr-Bpa-Ala-Hexarelin (●) in rat cardiac membranes. [¹²⁵I] Tyr-Bpa-Ala-Hexarelin (0.33 nM, 106 cpm) was incubated with rat cardiac membranes in the presence of increasing concentrations of competitor (from 10 nM to 30 μM). Analysis of the competition curves gave IC₅₀ values of 1.2 ± 0.32 μM and 1.3 ± 0.40 μM for Hexarelin and EP 70905, respectively (n=3). *p> 0.05

Figure 2. Comparison between the change in coronary perfusion pressure (CPP in mmHg) induced by 10μM of EP 70905 (n=17) and Hexarelin (n=29). *p< 0.015

Figure 3. Dose-response curves to angiotensin II (AII, left panel) (n=6) and to EP 70905 (right panel) (n=6) in the absence (closed circle) and presence (closed triangles) of 10 μM genistein. *p< 0.05

* Represents a significantly different fitted plateau.

Figure 4. Dose response curves to endothelin-1 (ET-1, left panel) (n=6) and to EP 70905 (right panel) (n=6) in the absence (closed circle) and presence (closed triangles) of 1μM LU 302 872. *p< 0.05

Figure 5. Immunoreactive endothelin (in fM) in the coronary effluent during infusion of increasing concentrations of EP 70905 (n=6). *P<0.05 compared with baseline value.

Figure 6. Dose-response curves to EP 70905 in the absence (closed circle) (n=17) and presence (closed triangles) (n=7) of 1μM nifedipine and (opened triangles) 1μM chelerythrine (n=5). *p< 0.05

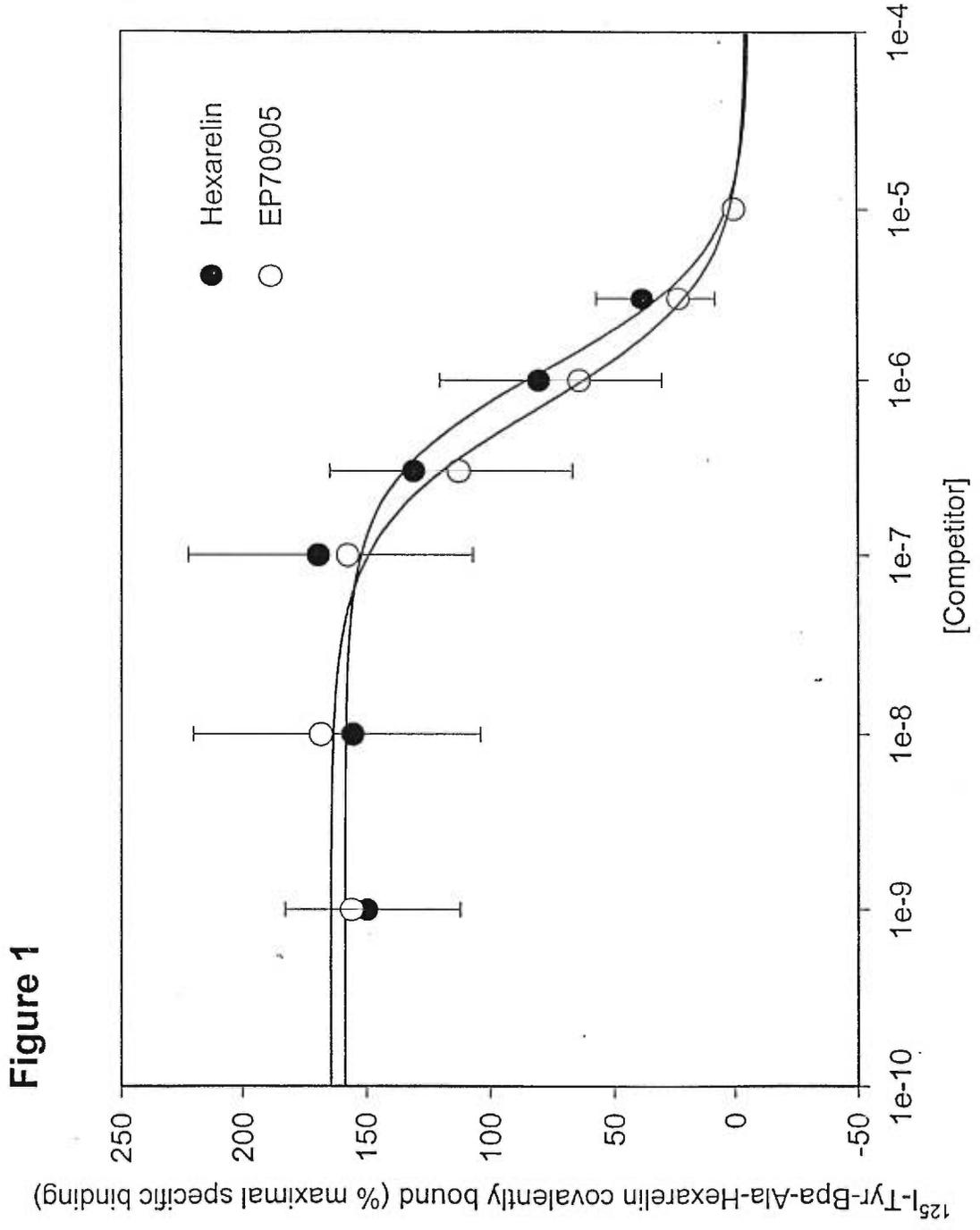
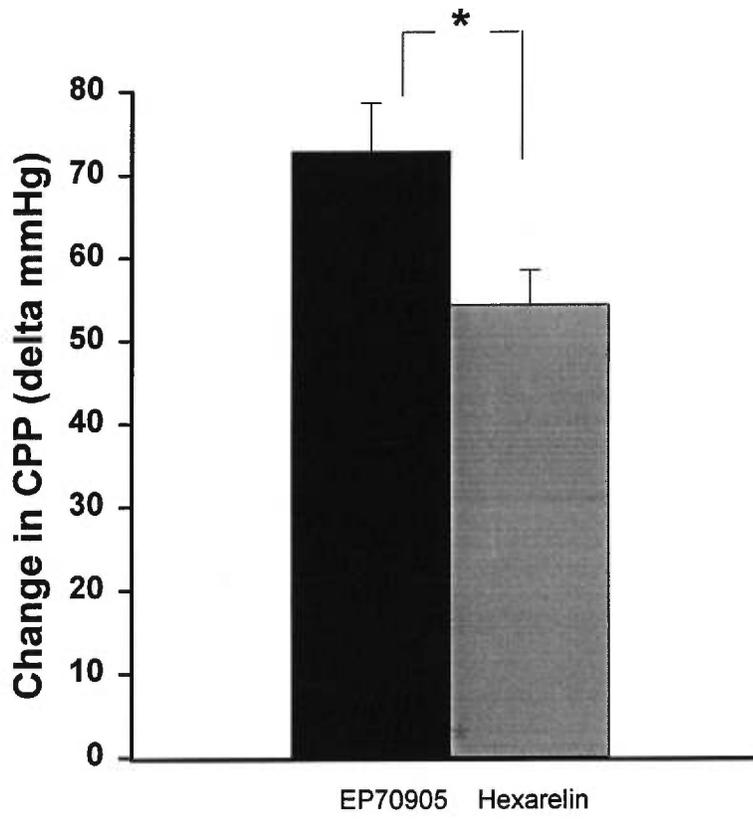


Figure 1

Figure 2



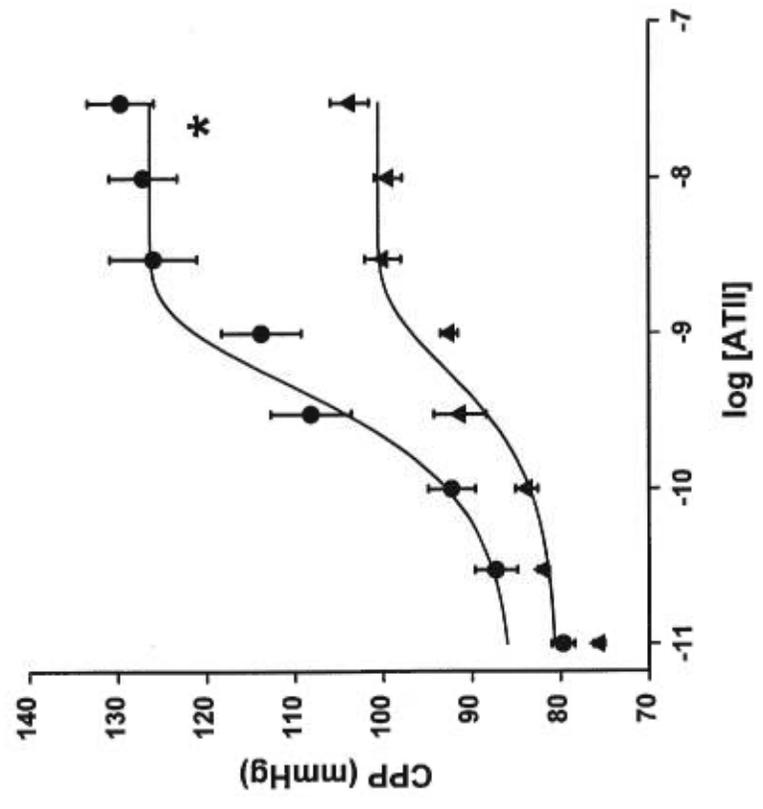
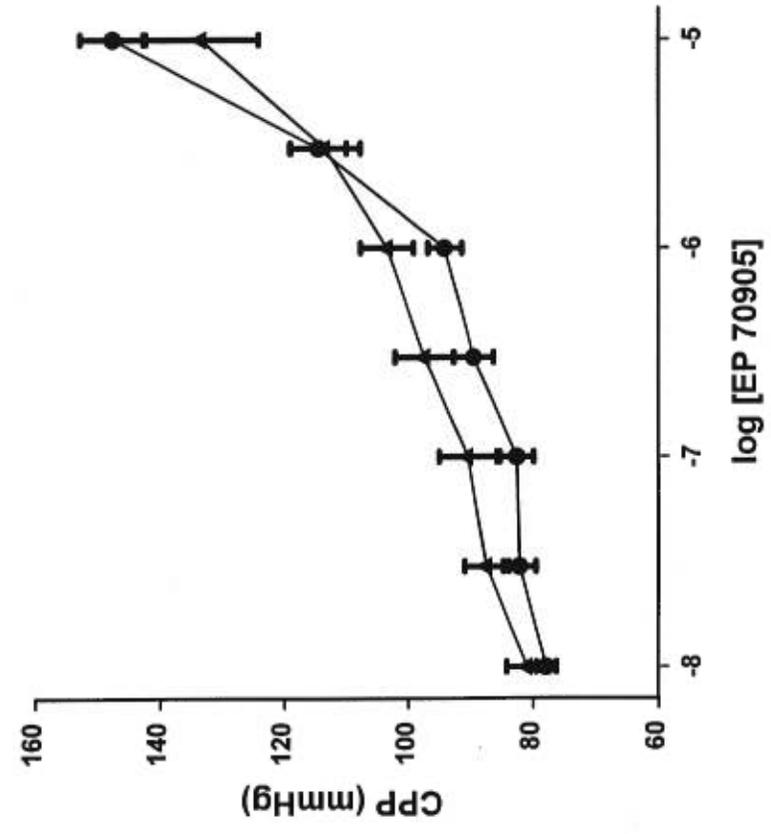


Figure 3

Figure 4

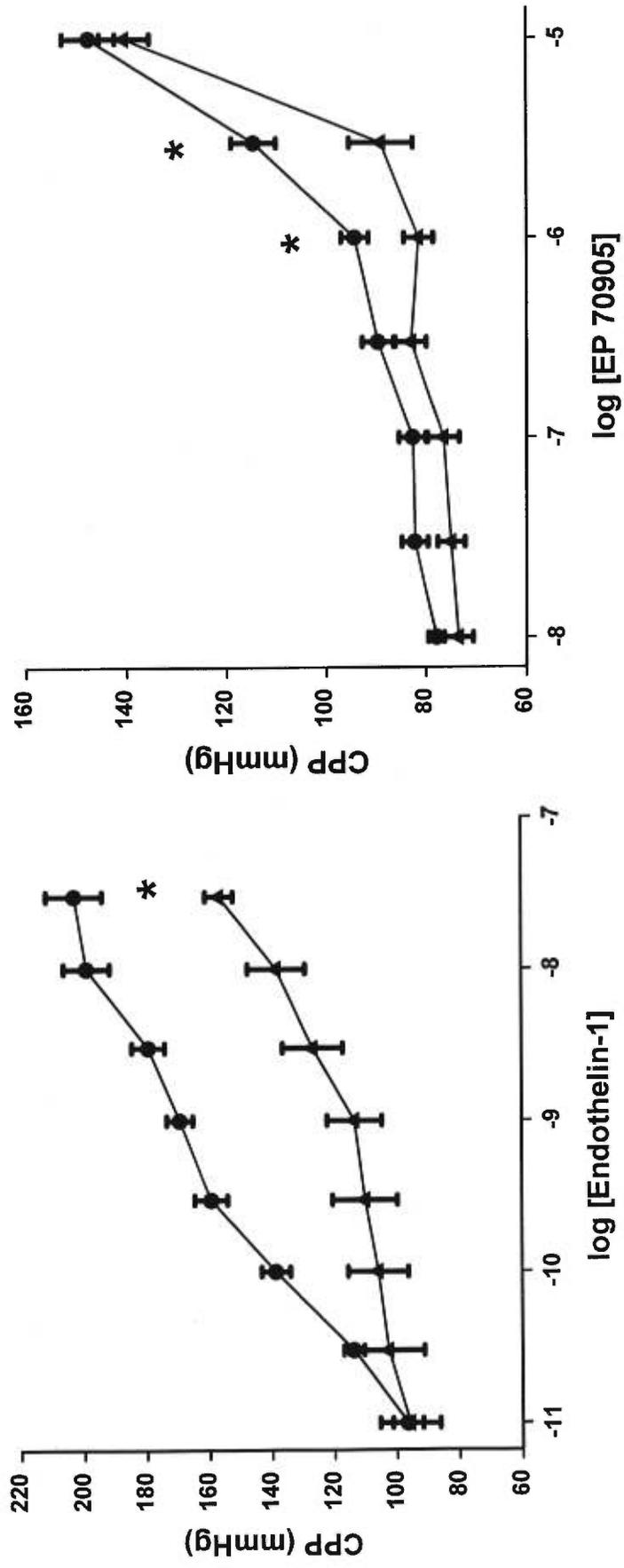


Figure 5

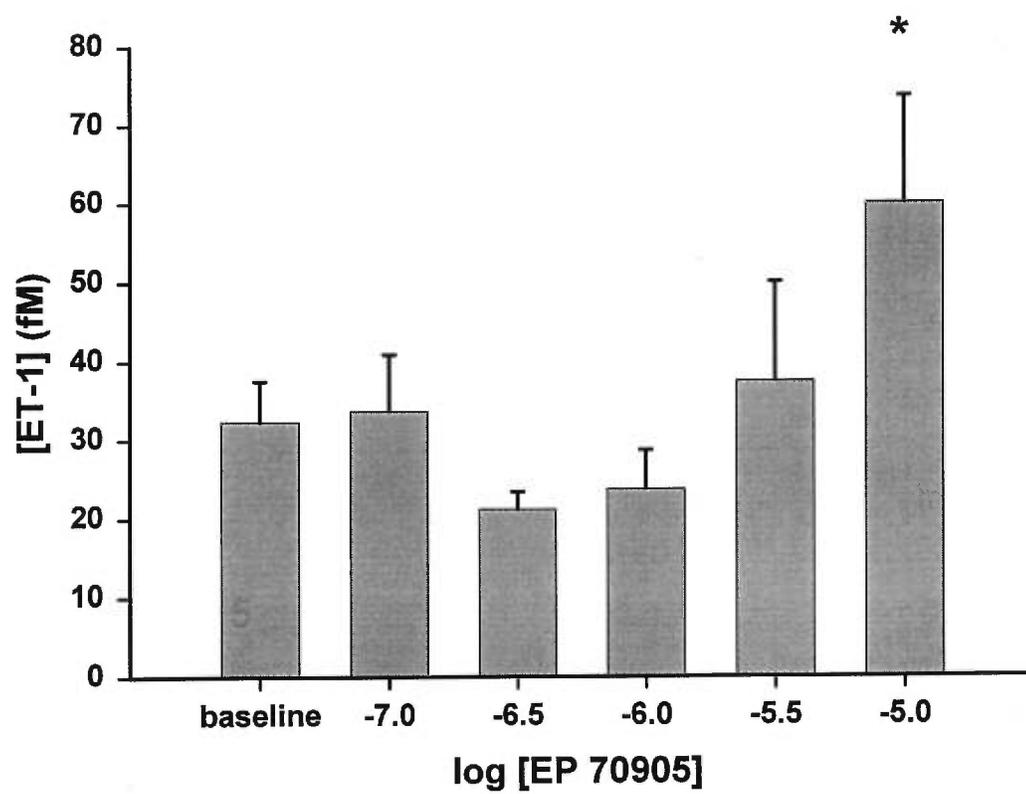
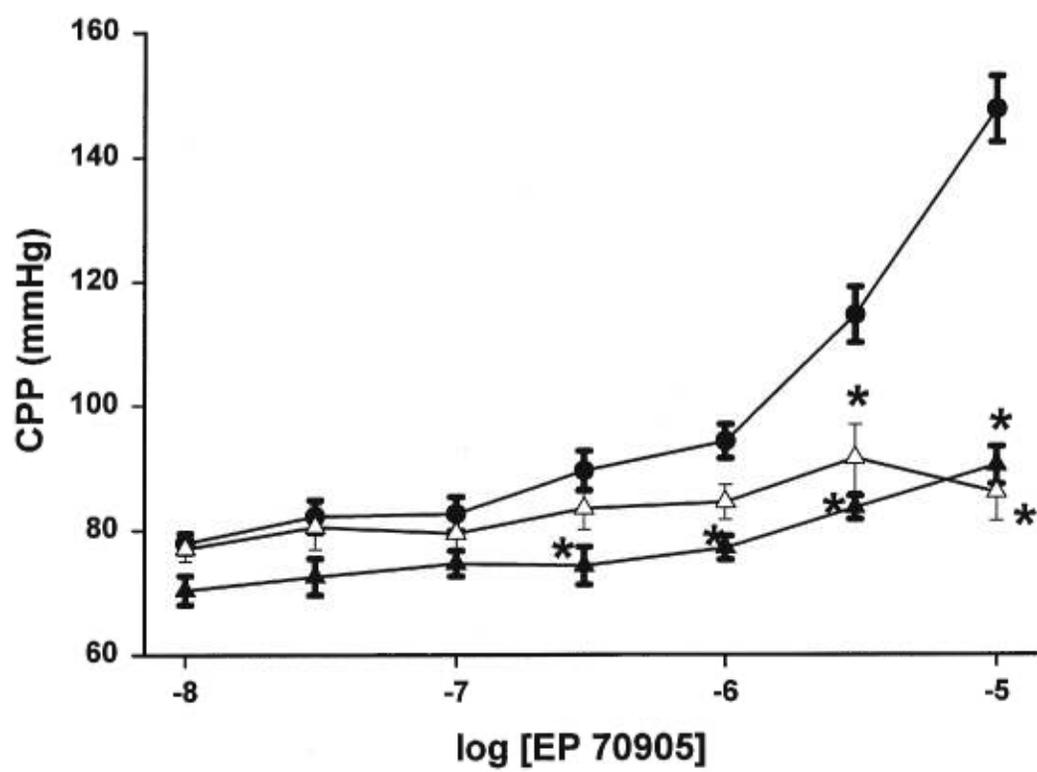


Figure 6



CHAPITRE 4
DISCUSSION

DISCUSSION

Les GHRPs et les composés peptidomimétiques sont des molécules synthétiques sécrétagogues de l'hormone de croissance qui ont permis de démontrer l'existence de nouveaux récepteurs distincts de ceux du GH. Notamment, le MK 0677 a permis l'identification et le clonage d'un récepteur de 41 kDa dont l'expression se concentre au niveau du système nerveux central, de l'hypothalamus, de l'hypophyse et du cortex cérébrale (35). De plus, l'expression de l'ARNm de ce récepteur semble avoir été démontrée au niveau du rein en utilisant des techniques très sensibles (RT-PCR) (191). Ce récepteur lie la grande majorité des GHRPs, et récemment, des études de criblage de bibliothèques génomiques humaines provenant de tissus périphériques ont permis l'identification de nouveaux membres de la famille du récepteur de 41 kDa (GHS-R). Trois homologues du GHS-R ont été identifiés chez l'humain, soit le GPR38, le GPR39 et le FM3 (46). Outre cette famille de récepteurs, l'hexarelin, un membre de la famille GHRP, a permis d'identifier un nouveau récepteur cardiaque de 84 kDa. Des études de compétition avec différents analogues GHRPs et peptidomimétiques au niveau cardiaque, ont démontré que le récepteur cardiaque liant l'hexarelin est différent de celui du GHS-R (41 kDa) (45).

Afin de déterminer si ce nouveau site de liaison était seulement spécifique à l'hexarelin, nous avons entrepris des études de liaison avec différents analogues hexapeptidiques. Ces études ont démontré que le EP 70905, un analogue de l'hexarelin, se lie au même récepteur cardiaque que l'hexarelin. Le EP 70905 est un composé peptidique dans lequel l'acide aminé histidine, situé à l'extrémité N-terminale de l'hexarelin, est remplacée par les résidus Spiro-Leu-Pro. Nos résultats ont démontré que cette modification engendrait une vasoconstriction plus importante que celle observée en présence d'hexarelin au niveau du modèle de coeur isolé de rat. Afin de mieux caractériser et comprendre le fonctionnement

de ce nouveau récepteur cardiaque, nous avons entrepris d'étudier quelques voies de signalisation susceptibles d'être responsables de la vasoconstriction induite par le EP 70905.

Voies de signalisation

Tyrosine kinases

Les tyrosine kinases sont impliquées dans la contraction musculaire lisse occasionnée par plusieurs agents pharmacologiques tels la vasopressine, l'AII et l'ET-1 (168,192). Il était donc important de vérifier si cette voie de signalisation était impliquée avec le EP 70905. La génistéine est un inhibiteur qui est spécifique aux tyrosine kinases. Cependant, il est non sélectif pour une classe particulière (34). Il nous semblait donc opportun, comme approche initiale, d'utiliser un inhibiteur affectant l'ensemble des tyrosine kinases. Dans la littérature, il est bien établi que la génistéine est un inhibiteur non-spécifique des tyrosine kinases. Afin de vérifier l'efficacité de cet inhibiteur, nous avons en premier lieu observé son effet sur la vasoconstriction à l'ATII. Il est bien établi que l'effet vasoconstricteur engendré par l'ATII nécessite l'action des tyrosine kinases (168,170). La perfusion simultanée d'ATII et de génistéine a causé une diminution de la vasoconstriction associée à l'ATII, démontrant l'efficacité de la génistéine comme inhibiteur des tyrosine kinases. La vasoconstriction induite par le EP 70905 est puissante, réversible et ne semble pas être due à l'activation des tyrosine kinases puisque la génistéine n'a eu aucun effet sur l'augmentation de la pression de perfusion occasionnée par ce peptide.

L'endothéline-1

La seconde voie de signalisation à laquelle nous nous sommes intéressée est celle de l'ET-1. L'ET-1 est une substance fortement vasoactive qui agit en se fixant à des récepteurs membranaires (ETA et ETB) au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. Puisque la relâche d'ET-1 par les cellules endothéliales est parfois activée par des

agonistes comme l'ATII, la vasopressine, la bradykinine, l'endotoxine et le PAK, nous avons vérifié la possibilité d'une implication de ce médiateur dans la vasoconstriction induite par le EP 70905 (186). Comme mentionné auparavant, nous avons tout d'abord utilisé un inhibiteur spécifique des récepteurs de l'endothéline, le LU 302 807, qui inhibe les récepteurs ETA et ETB (193). Deuxièmement nous avons mesuré la quantité d'endothéline endogène relâchée dans le perfusat coronarien durant la perfusion des coeurs de rat en présence de EP 70905.

La vasoconstriction occasionnée par le EP 70905 a faiblement été diminuée en présence du LU 302 807 dans la partie centrale de la gamme de concentrations utilisée pour le EP 70905, suggérant ainsi un rôle mineur de l'ET-1. Les mesures d'endothéline-1 endogène relâchée à la sortie de coeurs de rats en présence/absence de EP 70905 ont démontré une faible augmentation d'endothéline, quoique significative, par rapport au taux basal. Cette augmentation fut observée en utilisant la plus forte concentration de EP 70905. La quantité d'ET-1 mesurée lors de la perfusion en présence de EP 70905 fut d'environ 60 fM, ce qui est environ deux fois plus élevée que le taux de relâche basale. Cependant, il est important de mentionner que la quantité d'endothéline-1 exogène nécessaire pour causer une vasoconstriction se situe dans l'ordre des pM. Si nous nous référons à la figure 4 de l'article, c'est seulement à cette concentration d'ET-1 qu'il y a vasoconstriction. Il semble donc peu probable que cette faible augmentation d'ET-1 ait pu influencer la vasoconstriction occasionnée par le EP 70905. Le taux basal de relâche d'ET-1 cardiaque est comparable à celui obtenu par un autre groupe utilisant un modèle de coeur isolé similaire, suggérant ainsi que la technique utilisée pour notre étude était suffisamment sensible pour la détection de relâche d'ET-1 endogène (194).

Nos résultats semblent donc suggérer que l'ET-1 ne contribue que de façon marginale à la vasoconstriction induite par le EP 70905. Premièrement, le caractère réversible et rapide

de la vasoconstriction induite par le EP 70905 ne correspond pas au profil de vasoconstriction de l'ET-1 qui est plus prolongé. Deuxièmement, le faible taux d'endothéline-1 endogène retrouvé dans le perfusat au cours de la perfusion du EP 70905 conjugué à l'atténuation mineure de la vasoconstriction par le LU 302 807 confirme sa faible implication.

Les canaux calciques de type L

Nous nous sommes ensuite intéressés à savoir si les canaux calciques de type L, souvent modulés par des agents vasoactifs tels que l'ATII, l'histamine et la sérotonine, pouvaient être impliqués dans la vasoconstriction occasionnée par le EP 70905 (147-149). La nifédipine fut utilisée comme bloqueur des canaux calciques de type L puisqu'il a été démontré que les cellules musculaires lisses seraient plus sensibles aux dihydropyridines que les autres bloqueurs des canaux calciques (157). Il est important de mentionner que lors de l'utilisation de cet inhibiteur, nous avons considéré sa sensibilité à la lumière. Pour se faire, nous avons préparé la nifédipine immédiatement avant chaque expérience et au cours de celle-ci nous avons protégé la nifédipine des rayons lumineux. Le rôle des canaux calciques de type L dans la vasoconstriction induite par le EP 70905 est mis en évidence par l'inhibition significative de la vasoconstriction induite par le EP 70905.

Les PKCs

Les protéines kinases C (PKCs) furent étudiées puisqu'elles sont aussi impliquées dans le mécanisme d'action de plusieurs agents vasoconstricteurs (162,163). Nous avons utilisé la chélérythrine comme inhibiteur des PKCs. Cet inhibiteur est couramment utilisé comme bloqueur des PKCs et démontre une bonne spécificité (195). La perfusion simultanée du EP 70905 et de chélérythrine dans les coeurs de rat révèle une forte diminution de la vasoconstriction par rapport à la perfusion du EP 70905 seul. Ceci suggère un rôle pour les PKCs dans la vasoconstriction engendrée par le EP 70905. Le

modèle de coeur isolé nous a permis de démontrer en partie comment le EP 70905 agit via son récepteur cardiaque. Cependant, la caractérisation du fonctionnement de ce récepteur en utilisant ce modèle présente des limitations.

Les avantages et limites du modèle de coeur isolé

Le modèle de coeur isolé présente des limites qui ne permettent pas toujours d'obtenir la précision désirée. Dans cette étude, il aurait été intéressant de savoir plus précisément à quel niveau cette vasoconstriction est causée. Ce modèle a permis de démontrer qu'une augmentation de la pression dans le lit coronaire était occasionnée en présence de EP 70905. Cependant, le modèle de Langendorff ne permet pas de distinguer si cette augmentation de la pression de perfusion est due à une vasoconstriction des artérioles, des artères moyennes ou des artères de conductance. Il serait important de savoir si ces différents vaisseaux sont aussi soumis au processus de vasoconstriction engendré par le EP 70905. Malgré leurs différences au niveau rôles, les différentes artères possèdent toutes une couche de cellules musculaires lisses et pourraient elles aussi subir une vasoconstriction. Par notre modèle nous pouvons seulement savoir ce qui se passe au niveau coronarien. Si notre peptide a un rôle sur d'autres vaisseaux, il serait intéressant de savoir quel est son influence sur ceux-ci. Les grandes artères de conductance (aorte, carotide commune) sont reconnues pour leur élasticité et leur capacité à absorber les fluctuations de débit occasionnées par la propulsion cyclique du sang par le cœur permettant une circulation constante du sang dans le réseau vasculaire. Il serait donc intéressant de voir si le EP 70905 aurait une influence sur le rôle de ces artères pouvant ainsi influencer les artères coronaires. Les artères moyennes comme les coronaires sont des artères de distribution dont la paroi musculaire est importante. Ces artères deviennent des artérioles qui compose le réseau de résistance et impose la pression sanguine. Chaque vaisseau a un rôle qui lui est propre et peut influencer d'autres vaisseaux du cœur s'il y a un changement dans sa fonction. De plus, aucun inhibiteur ne permet de déterminer la

localisation précise de ces vasoconstrictions. Dans cette étude, nous avons utilisé des inhibiteurs couramment utilisés dans le modèle de coeur isolé et pour lesquels des études antérieures avaient démontré leur efficacité pour identifier les voies de signalisation de certains agents vasoconstricteurs. L'utilisation de nouveaux inhibiteurs n'ayant pas encore été évalués, ceci engendre des résultats parfois difficile à interpréter.

Par exemple, lors de cette étude, un nouvel inhibiteur spécifique aux tyrosine kinases de la famille Fynt appelé PP1, fut aussi utilisé. Plusieurs doses ont été essayées et aucun effet n'est apparu au niveau de la vasoconstriction occasionnée par le EP 70905. Dans ce cas, il était difficile de déterminer si cet inhibiteur démontrait réellement aucun rôle des tyrosine kinases Fynt ou bien s'il n'était pas assimilé ou pas actif au niveau du coeur isolé. L'efficacité de cet inhibiteur avait été évalué antérieurement sur des lymphocytes T en culture et non au niveau d'un modèle de coeur isolé (196). En fait, plusieurs facteurs ont pu faire en sorte que l'inhibiteur ne se soit jamais rendu dans le coeur perfusé. Par exemple, il est possible qu'il adhère au paroi du modèle le rendant ainsi non-disponible au niveau du coeur. Une autre limite que nous avons rencontrée est qu'il est très difficile d'évaluer l'implication de l'endothélium puisqu'il est difficile de le détruire physiquement sans affecter le muscle lisse vasculaire. En effet, plusieurs facteurs influençant la vasoconstriction peuvent provenir de l'endothélium rendant parfois les résultats difficiles à interpréter.

Malgré les quelques limites décrites pour ce modèle, nos résultats ont contribué à l'avancement de nos connaissances en ce qui concerne ces nouveaux sites cardiaques pour les GHRPs. Ces travaux sont les premières études qui analysent l'effet pharmacologique des GHRPs au niveau du coeur. La caractérisation des mécanismes d'action des GHRPs au niveau cardiaque permettra une meilleure compréhension de leur rôle qui restent encore inconnu. Les résultats présentés dans ce travail ouvrent la voie à plusieurs champs

d'étude. Une étude a récemment permis l'identification d'un ligand endogène qui pourrait être responsable des effets physiologiques causés par les GHRPs (41). Puisque nos études semblent indiquer la présence de récepteurs pour les GHRPs au niveau cardiaque, il serait intéressant d'analyser les effets de ce ligand endogène sur le coeur. Ces études permettraient de vérifier si cette molécule endogène agit aux mêmes sites de liaison et si elle démontre les mêmes effets pharmacologiques au niveau du coeur que les GHRPs utilisés dans notre travail.

Avant de conclure cette discussion, il est important de clarifier la contradiction qui existe entre la vasoconstriction observée avec l'hexarelin ainsi que le EP 70905 et les résultats d'un autre groupe sur l'effet cardioprotecteur de l'hexarelin chez le rat déficient en GH et âgé (43,44). Tout d'abord, ces différences peuvent être expliquées du fait que des modèles différents aient été employés. Les concentrations utilisées afin d'observer une vasoconstriction dans le coeur isolé sont de l'ordre du μM . Ces concentrations sont plus élevées par rapport aux concentrations administrées *in vivo*. En fait, l'effet cardioprotecteur de l'hexarelin fut observé à plus faibles doses (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ce qui correspond à une concentration de 0.64 μM chez un rat possédant un volume de distribution de 25 mL. Malgré ces petites différences de concentrations, il est difficile de comparer ces deux études étant donné que les modèles utilisés sont différents puisqu'un modèle est chronique et l'autre pas. Cependant, il est possible que la vasoconstriction que nous avons observée puisse avoir un lien avec le pré-conditionnement ischémique. En effet, des études utilisant le modèle d'ischémie cardiaque ont récemment été entreprises dans notre laboratoire afin de déterminer si un effet cardioprotecteur pouvait être observé aux concentrations utilisées pour l'obtention d'une vasoconstriction. Il a été observé que la perfusion d'hexarelin (10 μM) pour une période d'environ cinq minutes avant l'induction d'une ischémie protégeait les fonctions endothéliales contre les effets délétères de l'ischémie et de la reperfusion (résultats qui ne sont pas présentés). Donc, il est

possible que la vasoconstriction observée dans notre étude puisse avoir un certain lien avec le pré-conditionnement ischémique.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

CONCLUSION

Les travaux décrits dans ce mémoire ont permis de confirmer l'existence de sites de liaison cardiaque avec un deuxième analogue GHRP, le EP 70905. De plus, ces travaux ont permis d'observer l'effet vasoconstricteur de ce peptide au niveau des coronaires et d'éclaircir les mécanismes d'action impliqués dans cette vasoconstriction. L'effet vasoconstricteur du EP 70905 est significativement plus élevé que celui de l'hexarelin. Ceci nous permet donc de conclure que l'EP 70905 est plus puissant au niveau vasoconstricteur que l'hexarelin. Les voies de signalisation impliquées dans la vasoconstriction du EP 70905 incluent les canaux calciques de type L, les PKCs et faiblement l'endothéline. Les tyrosine kinases ne sont par contre pas impliquées. Finalement, les résultats présentés dans ce mémoire ont permis l'identification d'un nouveau dérivé GHRP avec des propriétés cardio-vasculaires. Ces études contribueront à éclaircir l'implication des GHRPs dans le coeur ainsi que les voies de signalisation par lesquelles ils agissent.

CHAPITRE 6
REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes deux directeurs de recherche soit le Dr Huy Ong et le Dr Daniel Lamontagne pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans leurs laboratoires. Je les remercie aussi pour le support financier qu'ils m'ont apporté tout au long de ma maîtrise au niveau personnel ainsi qu'au niveau de l'équipement et du matériel de laboratoire. De plus, j'aimerais aussi les remercier car grâce à eux j'ai acquis de nombreuses connaissances mais ce que je retiens par dessus tout c'est que j'ai pu développer une qualité, qui je crois va m'aider tout au long de ma carrière, la patience!

Je voudrais aussi remercier la compagnie pharmaceutique Europeptides pour avoir fourni les peptides nécessaires à ce projet.

Je me dois de remercier le Dr Véronique Bodart pour m'avoir appris des techniques biochimiques ainsi que d'avoir pris le temps pour me donner de nombreuses explications et conseils. J'aimerais aussi la remercier pour être resté très tard le soir de sa fête afin que je puisse envoyer mon résumé avant minuit.

Je voudrais aussi remercier Jean-François Bouchard pour m'avoir montré les techniques de cœur isolé ainsi que pour sa grande disponibilité en tout temps. J'ai apprécié la patience qu'il a eu puisque je lui ai souvent demandé de me réexpliquer certaines choses dont les programmes informatiques.

Je remercie Marie Roumi pour ses conseils ainsi que pour sa patience lorsque que je la dérangeais en pleine expérimentation. J'ai beaucoup apprécié les nombreuses discussions de tout genre que j'ai pu aborder avec elle!!!!

Je remercie aussi Esther Millette pour ces conseils (surtout lorsque le coeur de mes rats étaient en "souffrance") et d'avoir pris le temps de lire et corriger mon travail de physiologie cardio-vasculaire.

Je voudrais aussi souligner la participation de certaines personnes au cours de ce projet de maîtrise:

Anne-Julie Archambault pour m'avoir aidé à piquer mes rats chaque jour durant trois semaines. Lise Lévesques pour avoir pris le temps de lire mon introduction de mémoire. Luc Bernier pour son aide en informatique.

J'aimerais dire un merci particulier à mes parents qui ont toujours été là pour m'écouter et m'encourager tout au long de mes études. J'apprécie la confiance qu'ils ont mis en moi. Ils ont su me transmettre une très grande valeur, la persévérance. Je pourrai jamais leur dire assez souvent comment je suis reconnaissante pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Ils me disent toujours de faire confiance en la vie et je crois qu'ils ont raison!!!!

Pour terminer je veux remercier celui qui a permis à ce travail de voir le jour. Merci François pour avoir supporté mes nombreux moments de stress. Sans tes encouragements, tes conseils et ta présence, l'écriture de ce mémoire aurait été difficile. Tu as su me faire rire dans les moments les plus difficiles et mettre du positif dans chacune de mes journées. Ta présence est indispensable dans ma vie puisque tu es celui qui permet à mon bonheur d'être très grand. Je remercie le seigneur de t'avoir rencontré.

CHAPITRE 7
BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Becker LK. Principles and practices of endocrinology and metabolism.
Philadelphia:J.B. Lippincott Companie ed. 1990.
2. Green JD and Harris GW. The neurovascular link between the neurohypophysis and
adenohypophysis. *J.Endocrinol* 1947; 5: 136-46.
3. Greenspan FS, Forsham PH. Basic and clinical endocrinology. 2 nd ed. Connecticut:
Appleton-Century-Crofts; 1986.
4. Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB. Growth
hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly.
Science 1982;218(4572):585-7.
5. Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W. Characterization of a growth hormone-
releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 1982;300(5889):276-8.
6. Bohlen P, Brazeau P, Bloch B, Ling N, Gaillard R, Guillemin R. Human hypothalamic
growth hormone releasing factor (GRF): evidence for two forms identical to tumor
derived GRF-44-NH₂ and GRF-40. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*
1983;114(3):930-6.
7. Gubler U, Monahan JJ, Lomedico PT, Bhatt RS, Collier KJ, Hoffman BJ, Bohlen P,
Esch F, Ling N, Zeytin F, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the
precursor of human growth hormone-releasing factor, somatocrinin.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1983;80(14):4311-4.

8. Mayo KE, Vale W, Rivier J, Rosenfeld MG, Evans RM. Expression-cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone-releasing factor. *Nature* 1983;306(5938):86-8.
9. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM. Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 1985;314(6008):279-81.
10. Seifert H, Perrin M, Rivier J, Vale W. Growth hormone-releasing factor binding sites in rat anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 1985;117(1):424-6.
11. Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol.Endocrinol.* 1993;7(1):77-84.
12. Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE. GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat.Genet.* 1993;4(3):227-32.
13. Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, Chua SCJ, Leibel RL. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat.Genet.* 1996;12(1):88-90.

14. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R.
Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973;179(68):77-9.
15. Voltz DM, Giustina A, Gaillard RC, et al. *endocrinol j.* 1993;The biological potency of equimolar amounts of somatostatin-14 and somatin-28 in rats. p. 235-9.
16. Law SF, Woulfe D, Reisine T. Somatostatin receptor activation of cellular effector systems. *Cell Signal.* 1995;7(1):1-8.
17. Dutta AS. *Small peptides: Chemistry, biology and clinical studies.* Vol. 19. Elsevier New-York ed. 1993.
18. Nakamoto JM, Gertner JM, Press CM, Hintz RL, Rosenfeld RG, Genel M.
Suppression of the growth hormone (GH) response to clonidine and GH- releasing hormone by exogenous GH. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1986;62(5):822-6.
19. Rosenthal SM, Hulse JA, Kaplan SL, Grumbach MM. Exogenous growth hormone inhibits growth hormone-releasing factor- induced growth hormone secretion in normal men. *J.Clin.Invest.* 1986;77(1):176-80.
20. Pellegrini E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Bennett P, Kordon C, Epelbaum J. Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. *J.Neurosci.* 1996;16(24):8140-8.

21. Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 1981;212(4500):1279-81.
22. Delitala G, Grossman A, Besser GM. Opiate peptides control growth hormone through a cholinergic mechanism in man. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* 1983;18(4):401-5.
23. Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 1984;114(5):1537-45.
24. Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K, Momany F. A study on the regulation of growth hormone release from the pituitaries of rats in vitro. *Endocrinology* 1981;108(3):1071-80.
25. Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1980;106(3):663-7.
26. Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1981;108(1):31-9.
27. Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K. Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology* 1984;114(5):1531-6.

28. Deghenghi R. The development of 'impervious peptides' as growth hormone secretagogues. *Acta Paediatr.Suppl.* 1997;423:85-7:85-7.
29. McDowell RS, Elias KA, Stanley MS, Burdick DJ, Burnier JP, Chan KS, Fairbrother WJ, Hammonds RG, Ingle GS, Jacobsen NE. Growth hormone secretagogues: characterization, efficacy, and minimal bioactive conformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995;92(24):11165-9.
30. Elias KA, Ingle GS, Burnier JP, Hammonds RG, McDowell RS, Rawson TE, Somers TC, Stanley MS, Cronin MJ. In vitro characterization of four novel classes of growth hormone- releasing peptide. *Endocrinology* 1995;136(12):5694-9.
31. Smith RG, Cheng K, Schoen WR, Pong SS, Hickey G, Jacks T, Butler B, Chan WW, Chung LY, Judith F. A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science* 1993;260(5114):1640-3.
32. Patchett AA, Nargund RP, Tata JR, Chen MH, Barakat KJ, Johnston DB, Cheng K, Chan WW, Butler B, Hickey G. Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995;92(15):7001-5.
33. Leung KH, Cohn DA, Miller RR, Doss GA, Stearns RA, Simpson RE, Feeney WP, Chiu SH. Pharmacokinetics and disposition of L-692,429. A novel nonpeptidyl growth hormone secretagogue in preclinical species. *Drug Metab.Dispos.* 1996;24(7):753-60.

34. Féger J, Féger Jeanne. Pharmacologie moléculaire. Yves Landry et Jean- Pierre Gies
2^e ed. 1993:173-203.
35. Smith RG, Pong SS, Hickey G, Jacks T, Cheng K, Leonard R, Cohen CJ, Arena JP,
Chang CH, Drisko J, et al. Modulation of pulsatile GH release through a novel
receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent.Prog.Horm.Res.* 1996;51:261-
85; discussion 285-6:261-85.
36. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI,
Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, et al. A receptor in pituitary and
hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*
1996;273(5277):974-7.
37. Codd EE, Shu AY, Walker RF. Binding of a growth hormone releasing hexapeptide
to specific hypothalamic and pituitary binding sites. *Neuropharmacology*
1989;28(10):1139-44.
38. Shimon I, Yan X, Melmed S. Human fetal pituitary expresses functional growth
hormone-releasing peptide receptors. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1998;83(1):174-8.
39. Sethumadhavan K, Veeraragavan K, Bowers CY. Demonstration and characterization
of the specific binding of growth hormone-releasing peptide to rat anterior pituitary
and hypothalamic membranes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991;178(1):31-7.
40. Adams EF, Huang B, Buchfelder M, Howard A, Smith RG, Feighner SD, Van der
Ploeg LH, Bowers CY, Fahlbusch R. Presence of growth hormone secretagogue

receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells.

J.Clin.Endocrinol.Metab. 1998;83(2):638-42.

41. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402(6762):656-60.
42. Bresciani E, Torsello A et al. Tissue-specific expression of GHS receptor mRNA in the CNS and peripheral organs of the male rats (abstract). 79th Annual Meeting of Endocrine society, Minneapolis: 1997;
43. De Gennaro C, Rossoni G, Bernareggi M, Muller EE, Berti F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur.J.Pharmacol.* 1997;334(2-3):201-7.
44. Rossoni G, De Gennaro C, Bernareggi M, Polvani GL, Muller EE, Berti F. Protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1998;32(2):260-5.
45. Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N, Escher E, Carriere P, Ghigo E, Sejlitz T, Sirois MG, Lamontagne D, Ong H. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ.Res.* 1999;85(9):796-802.
46. Smith RG, Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, Yang L, Morriello G, Nargund R, Patchett AA, et al. Growth hormone releasing substances: types and their receptors. *Horm.Res.* 1999;51 Suppl 3:1-8:1-8.

47. Pong SS, Chaung LY, Dean DC, Nargund RP, Patchett AA, Smith RG. Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol.Endocrinol.* 1996;10(1):57-61.
48. Mau SE, Witt MR, Bjerrum OJ, Saermark T, Vilhardt H. Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1,4,5)-trisphosphate/diacylglycerol pathway in rat anterior pituitary cells. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* 1995;15(1-4):311-23.
49. Herrington J, Hille B. Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* 1994;135(3):1100-8.
50. Bresson-Bepoldin L, Dufy-Barbe L. GHRP-6 induces a biphasic calcium response in rat pituitary somatotrophs. *Cell Calcium* 1994;15(3):247-58.
51. Adams EF, Petersen B, Lei T, Buchfelder M, Fahlbusch R. The growth hormone secretagogue, L-692,429, induces phosphatidylinositol hydrolysis and hormone secretion by human pituitary tumors. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;208(2):555-61.
52. Cheng K, Chan WW, Butler B, Barreto AJ, Smith RG. Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys- NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 1991;129(6):3337-42.
53. Adams ME, Olivera BM. Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *Trends.Neurosci.* 1994;17(4):151-5.

54. Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu.Rev.Biochem.* 1994;63:823-67:823-67.
55. Neill JD, Frawley LS. Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 1983;112(3):1135-7.
56. Blondel O, Bell GI, Seino S. ++Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, secretory granules and secretion in endocrine and neuroendocrine cells. *Trends.Neurosci.* 1995;18(4):157-61.
57. Littleton JT, Bellen HJ. Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca(2+)-dependent manner. *Trends.Neurosci.* 1995;18(4):177-83.
58. Bowers CY, Reynolds GA, Durham D, Barrera CM, Pezzoli SS, Thorner MO. Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1990;70(4):975-82.
59. Giustina A, Bussi AR, Deghenghi R, Imbimbo B, Licini M, Poesi C, Wehrenberg WB. Comparison of the effects of growth hormone-releasing hormone and hexarelin, a novel growth hormone-releasing peptide-6 analog, on growth hormone secretion in humans with or without glucocorticoid excess. *J.Endocrinol.* 1995;146(2):227-32.

60. Barinaga M, Yamamoto G, Rivier C, Vale W, Evans R, Rosenfeld MG.
Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. *Nature* 1983;306(5938):84-5.
61. Tang WJ, Gilman AG. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 1991;254(5037):1500-3.
62. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol.Endocrinol* 1997;11(4):415-23.
63. Koch BD, Blalock JB, Schonbrunn A. Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells. I. An increase in potassium conductance is responsible for both the hyperpolarization and the decrease in intracellular free calcium produced by somatostatin. *J.Biol.Chem.* 1988;263(1):216-25.
64. Bowers CY, Reynolds GA, Durham D, Barrera CM, Pezzoli SS, Thorner MO.
Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1990;70(4):975-82.
65. Bowers CY. GH releasing peptides--structure and kinetics. *J.Pediatr.Endocrinol.* 1993;6(1):21-31.

66. Penalva A, Carballo A, Pombo M, Casanueva FF, Dieguez C. Effect of growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH), atropine, pyridostigmine, or hypoglycemia on GHRP-6-induced GH secretion in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1993;76(1):168-71.
67. Ghigo E, Arvat E, Gianotti L, Imbimbo BP, Lenaerts V, Deghenghi R, Camanni F. Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1994;78(3):693-8.
68. Robinson BM, Friberg RD, Bowers CY, Barkan AL. Acute growth hormone (GH) response to GH-releasing hexapeptide in humans is independent of endogenous GH-releasing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1992;75(4):1121-4.
69. Badger TM, Millard WJ, McCormick GF, Bowers CY, Martin JB. The effects of growth hormone (GH)-releasing peptides on GH secretion in perfused pituitary cells of adult male rats. *Endocrinology* 1984;115(4):1432-8.
70. Penalva A, Pombo M, Carballo A, Barreiro J, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of sex, age and adrenergic pathways on the growth hormone response to GHRP-6. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* 1993;38(1):87-91.
71. Aloji JA, Gertz BJ, Hartman ML, Huhn WC, Pezzoli SS, Wittreich JM, Krupa DA, Thorner MO. Neuroendocrine responses to a novel growth hormone secretagogue, L-692,429, in healthy older subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1994;79(4):943-9.

72. Ghigo E, Arvat E, Rizzi G, Bellone J, Nicolosi M, Boffano GM, Mucci M, Boghen MF, Camanni F. Arginine enhances the growth hormone-releasing activity of a synthetic hexapeptide (GHRP-6) in elderly but not in young subjects after oral administration. *J.Endocrinol.Invest.* 1994;17(3):157-62.
73. Micic D, Popovic V, Kendereski A, Macut D, Casanueva FF, Dieguez C. Growth hormone secretion after the administration of GHRP-6 or GHRH combined with GHRP-6 does not decline in late adulthood. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* 1995;42(2):191-4.
74. Bellone J, Aimaretti G, Bartolotta E, Benso L, Imbimbo BP, Lenhaerts V, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E. Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, before and during puberty. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1995;80(4):1090-4.
75. Arvat E, Gianotti L, Broglio F, Maccagno B, Bertagna A, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E. Oestrogen replacement does not restore the reduced GH-releasing activity of Hexarelin, a synthetic hexapeptide, in post-menopausal women. *Eur.J.Endocrinol.* 1997;136(5):483-7.
76. Copinschi G, Van Onderbergen A, L'Hermite-Baleriaux M, Mendel CM, Caufriez A, Leproult R, Bolognese JA, De Smet M, Thorner MO, Van Cauter E. Effects of a 7-day treatment with a novel, orally active, growth hormone (GH) secretagogue, MK-677, on 24-hour GH profiles, insulin-like growth factor I, and adrenocortical function in normal young men. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1996;81(8):2776-82.

77. Ghigo E, Arvat E, Gianotti L, Grottoli S, Rizzi G, Ceda GP, Boghen MF, Deghenghi R, Camanni F. Short-term administration of intranasal or oral Hexarelin, a synthetic hexapeptide, does not desensitize the growth hormone responsiveness in human aging. *Eur.J.Endocrinol.* 1996;135(4):407-12.
78. Laron Z, Frenkel J, Deghenghi R, Anin S, Klinger B, Silbergeld A. Intranasal administration of the GHRP hexarelin accelerates growth in short children. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* 1995;43(5):631-5.
79. Arvat E, Ramunni J, Bellone J, Di Vito L, Baffoni C, Broglio F, Deghenghi R, Bartolotta E, Ghigo E. The GH, prolactin, ACTH and cortisol responses to Hexarelin, a synthetic hexapeptide, undergo different age-related variations. *Eur.J.Endocrinol* 1997;137(6):635-42.
80. Popovic V, Damjanovic S, Micic D, Djurovic M, Dieguez C, Casanueva FF. Blocked growth hormone-releasing peptide (GHRP-6)-induced GH secretion and absence of the synergic action of GHRP-6 plus GH-releasing hormone in patients with hypothalamopituitary disconnection: evidence that GHRP- 6 main action is exerted at the hypothalamic level. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1995;80(3):942-7.
81. Loche S, Cambiaso P, Merola B, Colao A, Faedda A, Imbimbo BP, Deghenghi R, Lombardi G, Cappa M. The effect of hexarelin on growth hormone (GH) secretion in patients with GH deficiency. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1995;80(9):2692-6.

82. Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1980;106(3):663-7.
83. Giustina A, Bonfanti C, Licini M, Ragni G, Stefana B. Hexarelin, a novel GHRP-6 analog, stimulates growth hormone (GH) release in a GH-secreting rat cell line (GH1) insensitive to GH-releasing hormone. *Regul.Pept.* 1997;70(1):49-54.
84. Fletcher TP, Thomas GB, Willoughby JO, Clarke IJ. Constitutive growth hormone secretion in sheep after hypothalamopituitary disconnection and the direct in vivo pituitary effect of growth hormone releasing peptide 6. *Neuroendocrinology.* 1994;60(1):76-86.
85. Fletcher TP, Thomas GB, Clarke IJ. Growth hormone-releasing hormone and somatostatin concentrations in the hypophysial portal blood of conscious sheep during the infusion of growth hormone-releasing peptide-6. *Domest.Anim.Endocrinol.* 1996;13(3):251-8.
86. Guillaume V, Magnan E, Cataldi M, Dutour A, Sauze N, Renard M, Razafindraibe H, Conte-Devolx B, Deghenghi R, Lenaerts V. Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep. *Endocrinology* 1994;135(3):1073-6.

87. Conley LK, Teik JA, Deghenghi R, Imbimbo BP, Giustina A, Locatelli V, Wehrenberg WB. Mechanism of action of hexarelin and GHRP-6: analysis of the involvement of GHRH and somatostatin in the rat. *Neuroendocrinology*. 1995;61(1):44-50.
88. Ghigo E, Arvat E, Muccioli G, Camanni F. Growth hormone-releasing peptides. *Eur.J.Endocrinol*. 1997;136(5):445-60.
89. Bertherat J, Dournaud P, Berod A, Normand E, Bloch B, Rostene W, Kordon C, Epelbaum J. Growth hormone-releasing hormone-synthesizing neurons are a subpopulation of somatostatin receptor-labelled cells in the rat arcuate nucleus: a combined in situ hybridization and receptor light- microscopic radioautographic study. *Neuroendocrinology*. 1992;56(1):25-31.
90. Robinson BM, Friberg RD, Bowers CY, Barkan AL. Acute growth hormone (GH) response to GH-releasing hexapeptide in humans is independent of endogenous GH-releasing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 1992;75(4):1121-4.
91. Bowers CY, Sartor AO, Reynolds GA, Badger TM. On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology* 1991;128(4):2027-35.
92. Gertner JM, Wajnrajch MP, Leibel RL. Genetic defect in the control of growth hormone secretion. *Horm Res* 1998;49 Suppl 1:9-14.
93. Rudman D. Growth hormone, body composition, and aging. *J.Am.Geriatr.Soc*. 1985;33(11):800-7.

94. de Boer H, Blok GJ, Voerman HJ, Phillips M, Schouten JA. Serum lipid levels in growth hormone-deficient men. *Metabolism* 1994;43(2):199-203.
95. Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sonksen PH. The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N.Engl.J.Med.* 1989;321(26):1797-803.
96. Russell-Jones DL, Watts GF, Weissberger A, Naoumova R, Myers J, Thompson GR, Sonksen PH. The effect of growth hormone replacement on serum lipids, lipoproteins, apolipoproteins and cholesterol precursors in adult growth hormone deficient patients. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* 1994;41(3):345-50.
97. Rosen T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 1990;336(8710):285-8.
98. Fiasche R, Fideleff HL, Moisezowicz J, Frieder P, Pagano SM, Holland M. Growth hormone neurosecretory dysfunction in major depressive illness. *Psychoneuroendocrinology.* 1995;20(7):727-33.
99. Raben MS. Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J.Clin.Endocrinol.* 1958;18:901-3.
100. Preece M. Human pituitary growth hormone and Creutzfeldt-Jakob disease. *Horm.Res.* 1993;39(3-4):95-8.
101. Ritzen EM, Czernichow P, Preece M, Ranke M, Wit JM. Safety of human growth hormone therapy. *Horm.Res.* 1993;39(3-4):92-3.

102. Frasier SD. Human pituitary growth hormone (hGH) therapy in growth hormone deficiency. *Endocrine Rev* 1983;4:155-169.
103. Takano K, Hizuka N, Asakawa K, Sukegawa I, Horikawa R, Shizume K. Effects of short-term growth hormone therapy in short children without growth hormone deficiency. *Acta Paediatr.Scand.Suppl.* 1990;366:14-22; discussion 23:14-22.
104. Ritzen EM. Does growth hormone increase the risk of malignancies? *Horm.Res.* 1993;39(3-4):99-101.
105. Crist DM, Kraner JC. Supplemental growth hormone increases the tumor cytotoxic activity of natural killer cells in healthy adults with normal growth hormone secretion. *Metabolism* 1990;39(12):1320-4.
106. Haffner D, Schaefer F, Girard J, Ritz E, Mehls O. Metabolic clearance of recombinant human growth hormone in health and chronic renal failure. *J.Clin.Invest.* 1994;93(3):1163-71.
107. Owens D, Srivastava MC, Tompkins CV, Nabarro JD, Sonksen PH. Studies on the metabolic clearance rate, apparent distribution space and plasma half-disappearance time of unlabelled human growth hormone in normal subjects and in patients with liver disease, renal disease, thyroid disease and diabetes mellitus. *Eur.J.Clin.Invest.* 1973;3(4):284-94.

108. Ghigo E, Arvat E, Rizzi G, Goffi S, Grottoli S, Mucci M, Boghen MF, Camanni F.
Growth hormone-releasing activity of growth hormone-releasing peptide-6 is
maintained after short-term oral pretreatment with the hexapeptide in normal aging.
Eur.J.Endocrinol. 1994;131(5):499-503.
109. Tiulpakov AN, Brook CG, Pringle PJ, Peterkova VA, Volevodz NN, Bowers CY.
GH responses to intravenous bolus infusions of GH releasing hormone and GH
releasing peptide 2 separately and in combination in adult volunteers.
Clin.Endocrinol.(Oxf.) 1995;43(3):347-50.
110. Massoud AF, Hindmarsh PC, Brook CG. Hexarelin-induced growth hormone,
cortisol, and prolactin release: a dose-response study. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*
1996;81(12):4338-41.
111. Pombo M, Barreiro J, Penalva A, Mallo F, Casanueva FF, Dieguez C. Plasma
growth hormone response to growth hormone-releasing hexapeptide (GH-RP-6) in
children with short stature. *Acta Paediatr.* 1995;84(8):904-8.
112. Leal-Cerro A, Garcia E, Astorga R, Casanueva FF, Dieguez C. Growth hormone
(GH) responses to the combined administration of GH- releasing hormone plus GH-
releasing peptide 6 in adults with GH deficiency. *Eur.J.Endocrinol.*
1995;132(6):712-

113. Chapman IM, Pescovitz OH, Murphy G, Treep T, Cerchio KA, Krupa D, Gertz B, Polvino WJ, Skiles EH, Pezzoli SS, et al. Oral administration of growth hormone (GH) releasing peptide-mimetic MK- 677 stimulates the GH/insulin-like growth factor-I axis in selected GH- deficient adults. *J.Clin.Endocrinol Metab.* 1997;82(10):3455-63.
114. Laron Z. Growth hormone secretagogues. Clinical experience and therapeutic potential. *Drugs* 1995;50(4):595-601.
115. Pihoker C, Middleton R, Reynolds GA, Bowers CY, Badger TM. Diagnostic studies with intravenous and intranasal growth hormone- releasing peptide-2 in children of short stature. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1995;80(10):2987-92.
116. De Gennaro C, Rossoni G, Bonacci D, Ciceri S, Cattaneo L, Muller E, Berti F. Worsening of ischemic damage in hearts from rats with selective growth hormone deficiency. *Eur.J.Pharmacol.* 1996;314(3):333-8.
117. Robishaw JD, Russell DW, Harris BA, Smigel MD, Gilman AG. Deduced primary structure of the alpha subunit of the GTP-binding stimulatory protein of adenylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986;83(5):1251-5.
118. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 1987;325(6102):321-6.

119. Helms JB. Role of heterotrimeric GTP binding proteins in vesicular protein transport: indications for both classical and alternative G protein cycles. *FEBS Lett.* 1995;369(1):84-8.
120. Gudermann T, Nurnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J.Mol.Med.* 1995;73(2):51-63.
121. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995;80(2):249-57.
122. Ohya Y, Sperelakis N. Involvement of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 1991;68(3):763-71.
123. Thibonnier M, Bayer AL, Simonson MS, Kester M. Multiple signaling pathways of V1-vascular vasopressin receptors of A7r5 cells. *Endocrinology* 1991;129(6):2845-56.
124. Resink TJ, Scott-Burden T, Buhler FR. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988;157(3):1360-8.
125. Satoh S, Itoh T, Kuriyama H. Actions of angiotensin II and noradrenaline on smooth muscle cells of the canine mesenteric artery. *Pflugers Arch.* 1987;410(1-2):132-8.

126. Doyle VM, Ruegg UT. Vasopressin induced production of inositol trisphosphate and calcium efflux in a smooth muscle cell line. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1985;131(1):469-76.
127. Lee MW, Severson DL. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am.J.Physiol.* 1994;267(3 Pt 1):C659-C678
128. Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J.Biol.Chem.* 1992;267(18):12393-6.
129. Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 1992;71(7):1069-72.
130. Sternweis PC, Smrcka AV. Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends.Biochem.Sci.* 1992;17(12):502-6.
131. Gaffney JK, Schodorf L, Jones G. DMATs (Disaster Medical Assistance Teams) respond to Andrew and Iniki. *J.Emerg.Med.Serv.JEMS.* 1992;17(11):76-9.
132. Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S, Snyder SH. Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature* 1989;342(6245):87-9.
133. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312(5992):315-21.

134. Huckle WR, Prokop CA, Dy RC, Herman B, Earp S. Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium- dependent manner. *Mol.Cell Biol.* 1990;10(12):6290-8.
135. Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J.Physiol.(Lond.)* 1997;499(Pt 2):291-306.
136. Taylor CW, Broad LM. Pharmacological analysis of intracellular Ca²⁺ signalling: problems and pitfalls. *Trends.Pharmacol.Sci.* 1998;19(9):370-5.
137. Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;316(6027):443-6.
138. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends.Pharmacol.Sci.* 1991;12(9):349-54.
139. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985;316(6027):440-3.
140. Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 1993;32(11):1075-88.
141. Friedman ME, Suarez-Kurtz G, Kaczorowski GJ, Katz GM, Reuben JP. Two calcium currents in a smooth muscle cell line. *Am.J.Physiol.* 1986;250(4 Pt 2):H699-H703

142. Satin J, Cribbs LL. Identification of a T-type Ca(2+) channel isoform in murine atrial myocytes (AT-1 cells). *Circ. Res.* 2000; 86(6):636-42.
143. Ganitkevich VY, Isenberg G. Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance of single myocytes from guinea-pig coronary artery. *J.Physiol.(Lond.)* 1990;426:19-42:19-42.
144. McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol.Rev.* 1994;74(2):365-507.
145. Bkaily G, Peyrow M, Sculptoreanu A, Jacques D, Chahine M, Regoli D, Sperelakis N. Angiotensin II increases I_{si} and blocks I_K in single aortic cell of rabbit. *Pflugers Arch.* 1988;412(4):448-50.
146. Ohya Y, Sperelakis N. Involvement of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 1991;68(3):763-71.
147. Worley JF, Quayle JM, Standen NB, Nelson MT. Regulation of single calcium channels in cerebral arteries by voltage, serotonin, and dihydropyridines. *Am.J.Physiol.* 1991;261(6 Pt 2):H1951-H1960
148. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, Kimura S, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-

- dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86(10):3915-8.
149. Silberberg SD, Poder TC, Lacerda AE. Endothelin increases single-channel calcium currents in coronary arterial smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1989;247(1):68-72.
150. Klockner U, Isenberg G. Intracellular pH modulates the availability of vascular L-type Ca²⁺ channels. *J.Gen.Physiol.* 1994;103(4):647-63.
151. West GA, Leppla DC, Simard JM. Effects of external pH on ionic currents in smooth muscle cells from the basilar artery of the guinea pig. *Circ.Res.* 1992;71(1):201-9.
152. Schuhmann K, Groschner K. Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type Ca²⁺ channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett.* 1994;341(2-3):208-12.
153. Xuan YT, Wang OL, Whorton AR. Role of protein kinase C (PKC) in mediating Ca²⁺ entry in vascular smooth muscle cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1992;311:427-8:427-8.
154. Zhang C, Paul RJ, Kranias EG. Calmodulin stimulation of smooth muscle plasmalemmal vesicle Ca²⁺ uptake: direct or indirect effect? *Am.J.Physiol.* 1992;263(2 Pt 2):H366-H371
155. Kuga T, Sadoshima J, Tomoike H, Kanaide H, Akaike N, Nakamura M. Actions of Ca²⁺ antagonists on two types of Ca²⁺ channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *Circ.Res.* 1990;67(2):469-80.

156. Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol.Rev.* 1995;47(3):387-573.
157. Bean BP, Sturek M, Puga A, Hermsmeyer K. Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs. *Circ.Res.* 1986;59(2):229-35.
158. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem.J.* 1993;291(Pt 2):329-43.
159. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988;334(6184):661-5.
160. Khalil RA, Lajoie C, Resnick MS, Morgan KG. Ca(2+)-independent isoforms of protein kinase C differentially translocate in smooth muscle. *Am.J.Physiol.* 1992;263(3 Pt 1):C714-C719
161. Liou YM, Morgan KG. Redistribution of protein kinase C isoforms in association with vascular hypertrophy of rat aorta. *Am.J.Physiol.* 1994;267(4 Pt 1):C980-C989
162. Walsh MP, Andrea JE, Allen BG, Clement-Chomienne O, Collins EM, Morgan KG. Smooth muscle protein kinase C. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1994;72(11):1392-9.

163. Galizzi JP, Qar J, Fosset M, Van Renterghem C, Lazdunski M. Regulation of calcium channels in aortic muscle cells by protein kinase C activators (diacylglycerol and phorbol esters) and by peptides (vasopressin and bombesin) that stimulate phosphoinositide breakdown. *J.Biol.Chem.* 1987;262(15):6947-50.
164. Walsh MP. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol.Cell Biochem.* 1994;135(1):21-41.
165. Pearson RB, Wettenhall RE, Means AR, Hartshorne DJ, Kemp BE. Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase. *Science* 1988;241(4868):970-3.
166. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol.Rev.* 1996;76(4):967-1003.
167. Bolen JB, Rowley RB, Spana C, Tsygankov AY. The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB J.* 1992;6(15):3403-9.
168. Force T, Kyriakis JM, Avruch J, Bonventre JV. Endothelin, vasopressin, and angiotensin II enhance tyrosine phosphorylation by protein kinase C-dependent and -independent pathways in glomerular mesangial cells. *J.Biol.Chem.* 1991;266(10):6650-6.
169. Zachary I, Gil J, Lehmann W, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A.* 1991;88(11):4577-81.

170. Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ.Res.* 1997;80(5):607-16.
171. Klohs WD, Fry DW, Kraker AJ. Inhibitors of tyrosine kinase. *Curr.Opin.Oncol.* 1997;9(6):562-8.
172. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995;267(5205):1782-8.
173. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J.Biol.Chem.* 1987;262(12):5592-5.
174. Beretz A, Anton R, Stoclet JC. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia* 1978;34(8):1054-5.
175. Stull JT, Gallagher PJ, Herring BP, Kamm KE. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension* 1991;17(6 Pt 1):723-32.
176. Kilhoffer MC, Roberts DM, Adibi AO, Watterson DM, Haiech J. Investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. Use of an isofunctional mutant with a tryptophan introduced by site-directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.* 1988;263(32):17023-9.
177. Kamm KE, Stull JT. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu.Rev.Physiol.* 1989;51:299-313:299-313.

178. Ikebe M, Reardon S. Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of the phosphorylation sites. *J.Biol.Chem.* 1990;265(29):17607-12.
179. Childs TJ, Watson MH, Sanghera JS, Campbell DL, Pelech SL, Mak AS. Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by mitogen-activated protein (MAP) kinase and expression of MAP kinase in differentiated smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1992;267(32):22853-9.
180. Wawrzynow A, Collins JH, Bogatcheva NV, Vorotnikov AV, Gusev NB. Identification of the site phosphorylated by casein kinase II in smooth muscle caldesmon. *FEBS Lett.* 1991;289(2):213-6.
181. Tanaka T, Ohta H, Kanda K, Hidaka H, Sobue K. Phosphorylation of high-Mr caldesmon by protein kinase C modulates the regulatory function of this protein on the interaction between actin and myosin. *Eur.J.Biochem.* 1990;188(3):495-500.
182. Gimona M, Herzog M, Vandekerckhove J, Small JV. Smooth muscle specific expression of calponin. *FEBS Lett.* 1990;274(1-2):159-62.
183. Yanagisawa 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 [see comments]. *Nature* 1988;332(6163):411-5.
184. Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: roles in cardiovascular health and disease. *Am.Heart J.* 1995;130(3 Pt 1):601-10.

185. Cesari M, Pavan E, Sacchetto A, Rossi GP. Endothelin-1: a scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease? *Am.Heart J.* 1996;132(6):1236-43.
186. Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Vanhoutte PM. Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1991;17 Suppl 7:S96-100:S96-100.
187. Levin ER. Endothelins as cardiovascular peptides. *Am.J.Nephrol.* 1996;16(3):246-51.
188. D'orléans-Juste P, Gratton JP, Leduc R, Bkarly G, and Claing A.
L'endothéline:Pharmacologie cardiovasculaire et considérations physiopathologiques.
M/S 1996;12563-74.
189. Kelly RA, Eid H, Kramer BK, O'Neill M, Liang BT, Reers M, Smith TW.
Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway [published erratum appears in *J Clin Invest* 1991 Apr;87(4):following 1477]. *J.Clin.Invest.* 1990;86(4):1164-71.
190. Brown KD, Littlewood CJ. Endothelin stimulates DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. Synergy with polypeptide growth factors. *Biochem.J.* 1989;263(3):977-80.
191. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J. Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 1995;136(9):4147-50.
192. Zachary I. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988;884577-81.

193. Raschack M, Gock S, Unger L, Hahn A, Amberg W, Jansen R, Alken P, Weber A, Hergenroder S. LU 302 872 and its racemate (LU 224 332) show balanced endothelin-A/B receptor affinity, high oral activity, and inhibit human prostate tissue contractions. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S241-4:S241-S244
194. Brunner F, du TE, Opie LH. Endothelin release during ischaemia and reperfusion of isolated perfused rat hearts. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1992;24(11):1291-305.
195. Liu Y, Cohen MV, Downey JM. Chelerythrine, a highly selective protein kinase C inhibitor, blocks the anti-infarct effect of ischemic preconditioning in rabbit hearts [letter]. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 1994;8(6):881-2.
196. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J.Biol.Chem.* 1996;271(2):695-701.