

Université de Montréal

**Peptides vasoactifs endogènes dans la prolifération accrue
des cellules musculaires lisses vasculaires de rats
spontanément hypertendus : rôle des facteurs de
croissance.**

Par
Louis-Olivier Lévesque

Département de physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès Science (M. Sc.)
en physiologie

Janvier 2009
© Louis-Olivier Lévesque

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Peptides vasoactifs endogènes dans la prolifération accrue des cellules
musculaires lisses vasculaires de rats spontanément hypertendus : rôle des
facteurs de croissance.

Présenté par :
Louis-Olivier Lévesque

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Réjean Couture
Madhu Anand-Srivastava
Rémy Sauvé

président rapporteur
directrice de recherche
membre du Jury

Dédicace

À ma famille, pour son support inestimable et
à Eli pour avoir supporté toutes les difficultés qu'impose la
rédaction d'un mémoire de maîtrise.

Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dr Madhu Anand-Srivastava, de m'avoir offert l'opportunité d'entreprendre ces études de maîtrise et aussi pour m'avoir demandé le meilleur de moi-même, seule manière d'apprendre à se dépasser.

Je tiens aussi à remercier notre assistante de recherche, Yuan Li, et tous ceux qui ont été mes collègues de laboratoire pour leur aide précieuse et le support qu'ils m'ont toujours manifesté.

Je remercie aussi les membres de mon jury pour le temps qu'ils ont consacré à mon évaluation.

Résumé

Contribuant à la pathophysiologie des maladies vasculaires comme dans le cas de l'hypertension, le remodelage vasculaire est associé à une altération de la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (prolifération, taille, etc.). Or la prolifération des CMLV est augmentée par les peptides vasoactifs tels que l'angiotensine II (AngII) et l'endothéline-1 (ET-1). Ces peptides étant surexprimés lors de l'hypertension, cette étude fut entreprise pour déterminer leur contribution endogène ainsi que celles du facteur de croissance épidermique (EGF), du facteur de croissance insulinique (IGF-1) et du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) à la prolifération accrue des CMLV et aux mécanismes sous-jacents. Des CMLV A-10 et des CMLV de rats WKY et SHR âgés de 12 semaines ont été utilisées pour cette étude. La prolifération cellulaire fut déterminée par incorporation de [³H]thymidine. La phosphorylation de ERK 1/2 et du récepteur de EGF fut déterminée par immunobuvardage. Les CMLV de SHR, comparées à celles de WKY, ont montré une prolifération accrue qui fut atténuée par le losartan, un antagoniste du récepteur AT₁ de l'AngII et par le BQ-123 et le BQ-788, antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B de l'ET-1. La prolifération accrue des CMLV de SHR fut ramenée à celle des WKY par les inhibiteurs des récepteurs au PDGF (AG-1295), au IGF-1 (AG-1024) et au EGF (AG-1478). La phosphorylation du récepteur au EGF, accrue dans les CMLV de rats SHR comparée à celle des WKY, fut atténuée par le losartan, le BQ-123, le BQ-788

et l'AG-1478, mais ne fut pas atténuée par l'AG-1295 et l'AG-1024. De plus, la phosphorylation accrue de ERK 1/2 dans les CMLV de rats SHR fut atténuée par le losartan, le BQ-123, le BQ-788 et les inhibiteurs des récepteurs aux facteurs de croissance. Parallèlement, le rôle de la transactivation de EGF-R dans la prolifération accrue induite par AngII et ET-1 fut aussi examiné dans les CMLV A-10. L'augmentation, induite par AngII et ET-1, de la prolifération et de la phosphorylation de ERK 1/2 dans les CMLV A-10 fut ramenée au niveau contrôle par AG-1478. Ces données suggèrent que les peptides vasoactifs endogènes induisent la prolifération accrue des CMLV par la signalisation des MAP kinases résultant de la transactivation de EGF-R.

Mots clés : hypertension, AngII, ET-1, EGF-R, transactivation, VSMC, SHR

Summary

Vascular remodelling that contributes to the pathophysiology of vascular diseases, including hypertension, is associated with alteration in vascular smooth muscle cell (VSMC) growth, hypertrophy, etc. We have recently shown that vasoactive peptides such as angiotensin II (AngII) and endothelin-1 (ET-1) increased the proliferation of VSMC. Since the levels of AngII, ET-1 and growth factors are increased in hypertension, the present studies were undertaken to examine if these endogenous vasoactive peptides and growth factors contribute to the enhanced proliferation of VSMC in spontaneously hypertensive rats (SHR) and to further investigate the underlying mechanisms responsible for enhanced proliferation. A10 VSMC and aortic VSMC from 12 week old SHR and age-matched WKY rats were used for these studies. Cell proliferation was determined by [³H]thymidine incorporation and ERK ½ and growth factor receptor phosphorylation was determined by Western blotting. VSMC from SHR exhibited enhanced cell proliferation as compared to WKY as determined by enhanced [³H]thymidine incorporation which was attenuated by AngII AT₁ receptor antagonist losartan, as well as by endothelin receptor ET_A and ET_B antagonists BQ-123 and BQ-788, respectively. The inhibitors of platelet derived growth factor receptor (PDGF-R); AG-1295, epidermal growth factor receptor (EGF-R); AG-1478, and insulin-like growth factor receptor (IGF-R); AG-1024 also attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR to WKY control

levels. In addition, VSMC from SHR exhibited enhanced phosphorylation of EGF-R as compared to WKY, which was attenuated by losartan, BQ-123, BQ-788 and AG-1478, and not by AG-1295 and AG-1024. Furthermore, the enhanced phosphorylation of ERK $\frac{1}{2}$ in VSMC from SHR was also attenuated by losartan, BQ-123 and BQ-788 as well as by growth factor receptor inhibitors, AG-1478, AG-1024 and AG-1295. The implication of growth factor receptor transactivation in AngII and ET-1 induced enhanced cell proliferation was also examined in A10 VSMC. Ang II or ET-1 induced enhanced proliferation of A-10 VSMC and enhanced ERK $\frac{1}{2}$ phosphorylation was also restored to control levels by EGF-R inhibitor. These data suggest that vasoactive peptide-induced growth factor receptor transactivation through MAP kinase signaling may contribute to the enhanced proliferation of VSMC from SHR.

Key words: hypertension, AngII, ET-1, EGF-R, transactivation, VSMC, SHR

Table des matières

Dédicace.....	iii
Remerciements.....	iv
Résumé.....	v
Summary.....	vii
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii

Chapitre 1.Introduction : Revue de la littérature

I. Hypertension	2
A. Pression artérielle.....	2
B. Structure vasculaire	3
1. Les artères.....	3
2. Les cellules musculaires lisses vasculaires	4
C. Régulation de la pression artérielle	4
1. Mécanismes de régulation à court terme.....	5
2. Mécanismes chimiques	8
3. Mécanismes de régulation à long terme	8
D. Types d'hypertension.....	8
1. Effets sur la santé.....	9
E. Modèles animaux d'hypertension	11
1. Les rats spontanément hypertendus	13
F. Prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire.....	13
G. Traitement de l'hypertension.....	15
1. Traitements non-pharmacologiques	15
2. Traitements pharmacologiques.....	16
II. Mécanismes chimiques.....	17
A. Peptides vasoactifs.....	17
B. Angiotensine	18

1.	Récepteurs de l'angiotensine et signalisation transmembranaire	20
2.	Signalisation intracellulaire.....	23
3.	Action physiologique	31
C.	Endothéline	32
1.	Récepteurs et signalisation transmembranaire	34
2.	Signalisation intracellulaire.....	36
3.	Action physiologique	41
D.	Facteurs de croissance.....	42
1.	Récepteurs tyrosines kinases	42
2.	Les facteurs de croissance	43
3.	Transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance.....	44
III.	Mécanismes de signalisation intracellulaire	45
A.	La voie des MAPKs	45
1.	La cascade de MEK/ERK.....	47
IV.	Objectifs	49
	Chapitre 2. Implication of endogenous vasoactive peptide-induced growth factor receptor transactivation in enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats.	
	Abstract	53
	Introduction	55
	Material and Methods	57
	Results	61
	Discussion	66
	Reference List	72
	Figure Legends	79
	Figures	84
	Chapitre 3. Discussion générale et conclusion	
I.	<u>Discussion</u>	94
II.	<u>Conclusion</u>.....	103
	Bibliographie.....	105

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Causes de l'élévation de la pression artérielle	10
Figure 2 : Structure du récepteur AT ₁	22
Figure 3 : Activation des phospholipases par l'angiotensine II.....	24
Figure 4 : Voies de signalisation activées par le récepteur AT ₁	29
Figure 5 : Les récepteurs à l'endothéline dans les structures vasculaires.....	35
Figure 6 : Voies de signalisation activées par l'endothéline.....	40
Figure 7 : Voies de signalisation activées par la phosphorylation du récepteur EGF-R	46

Chapitre 2

Figure 1 : Effect of vasoactive peptide antagonists on thymidine incorporation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY).....	84
Figure 2 : Effect of growth factors receptor inhibitors on thymidine incorporation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY).....	85
Figure 3 : Effect of vasoactive peptide antagonists on ERK 1/2 phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12	

weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY).....	86
Figure 4 : Effect of growth factor receptor inhibitors on ERK 1/2 phosphorylation in vascular smooth muscle cells from (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY).....	87
Figure 5 : Effect of vasoactive peptide antagonists on EGF-R phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY).....	88
Figure 6 : Effect of growth factor receptor inhibitors on EGF-R phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY)	89
Figure 7 : Effect of EGF-R inhibition (AG-1478) on vasoactive peptides-induced enhanced proliferation of A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).....	90
Figure 8 : Effect of AG-1478 on ET-1 or ANG II-induced enhanced phosphorylation of EGF-R in A-10 vascular smooth muscle cells (VSMC).....	91
Figure 9 : Effect of AG-1478 on ET-1 or Ang II induced enhanced ERK1/2 phosphorylation in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).....	92
<u>Chapitre 3</u>	
Figure 8 : Schéma intégrateur.....	100

Liste des abréviations utilisées

AngII	Angiotensine II
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AT ₁	Récepteur à l'angiotensine de type 1
ATP	Adénosine triphosphate
BQ-123	Antagoniste du récepteur ET _A
BQ-788	Antagoniste du récepteur ET _B
CMLV	Cellules du muscle lisse vasculaire
DAG	Diacylglycérol
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGF-R	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
ERO	Espèces réactives oxygénées
ET-1	Endothéline 1
ET _A	Récepteur à l'endothéline A
ET _B	Récepteur à l'endothéline B
Gai	Protéine G : sous-unité α inhibitrice de l'adénylate cyclase
Gaq ₁₁	Protéine G : sous-unité α Q/11
Gas	Protéine G : sous-unité α stimulatrice de l'adénylate cyclase

GDP	Guanosine diphosphate
GMP _c	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
IP ₃	Inositol triphosphate
KCLM	Kinase de la chaîne légère de myosine
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	Kinase des MAPK
MAPKKK	Kinase des MAPKK
MEK	MAP/ERK kinase
PA	Pression artérielle
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDGF-R	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PTK	Protéines tyrosines kinases
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
SH 2	<i>SRC homology domain 2</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rats</i>
SRA	Système rénine-angiotensine
WKY	Wistar-Kyoto

Chapitre 1

Introduction :

Revue de la littérature

I. Hypertension

L'hypertension affecte près de 20% des Canadiens, ce qui représente près de 6 millions de personnes. Cela reste approximatif, puisqu'on estime que 42% de ceux-ci ignorent qu'ils souffrent d'hypertension. Si cette dernière n'est pas traitée, elle peut dégénérer et donner lieu à des complications très graves qui nuisent grandement à la personne affectée et peuvent même entraîner la mort. Cependant, une fois détectée, l'hypertension est généralement traitable. La prévention et une meilleure compréhension de l'hypertension dite essentielle peuvent donc être très rentables autant pour la santé des personnes affectées que pour la société (Société d'hypertension canadienne, 2008).

A. Pression artérielle

Le cœur pompe le sang dans les vaisseaux. La force exercée propulse le sang aux organes, à travers les capillaires, et jusqu'aux veines puis de retour au cœur. Cette force que le sang exerce sur les parois artérielles constitue la pression artérielle (PA).

La PA varie grandement durant le cycle cardiaque. Chez l'humain en santé, elle oscille généralement entre 120 mmHg et 80 mmHg. Lorsque le cœur se contracte et propulse le sang dans les artères, on observe la PA la plus élevée, c'est la systole. Lorsque le cœur se relâche et se remplit de sang, on observe la PA la moins élevée, c'est la diastole (Marieb, 1993).

B. Structure vasculaire

1. Les artères

Le sang sous pression est pompé dans les artères. Cette pression doit être assez forte non seulement pour assurer une irrigation suffisante des organes, mais aussi pour assurer le retour du sang au cœur. La structure des artères leur permet donc de résister à d'énormes pressions. Les artères sont constituées de trois couches appelées tuniques qui entourent la lumière où s'écoule le sang. La tunique interne ou intima entoure la lumière et est constituée d'un épithélium pavimenteux simple. En plus de réduire la friction, l'intima est un centre intégrateur qui produit des facteurs pour déclencher la vasoconstriction (telle l'endothéline) ou la vasodilatation des vaisseaux (tel le monoxyde d'azote) (Spieker *et al.*, 2000; Taddei *et al.*, 2006). Ensuite vient la tunique moyenne ou media qui est une couche musculaire lisse où sont disséminées des fibres élastiques. Ce muscle lisse est principalement constitué des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) mais on y retrouve toutefois d'autres types cellulaires comme des cellules nerveuses. Ces cellules nerveuses innervent le muscle lisse des artères pour en stimuler la contraction, ce qui produit une vasoconstriction. Lorsque les cellules nerveuses ne sont pas stimulées, il s'en suit une vasodilatation. Dans les artères, cette couche est plus épaisse afin de résister aux pressions, de maintenir un tonus et de diriger le sang vers les organes cibles par une série de vasodilatations et de vasoconstrictions. Ce muscle lisse est entouré de la

tunique externe ou adventice composée de fibres de collagène qui donnent une élasticité à cette couche. L'élasticité des artères est essentielle afin d'amortir l'augmentation brusque de pression associée à la systole et d'assurer un écoulement continu au niveau des capillaires (Marieb, 1993).

2. Les cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLV sont de forme hélicoïdale et, comme toutes cellules musculaires, sont contractiles. Les CMLV conservent un grand pouvoir blastique. En effet, elles peuvent proliférer, s'hypertrophier, s'endorépliquer, migrer ou entrer en apoptose dépendamment des signaux reçus. Plusieurs de ces actions impliquent des mécanismes autocrines et paracrines (Berk, 2001).

C. Régulation de la pression artérielle

Il y a deux facteurs qui déterminent la valeur de la PA, soit la résistance périphérique totale et le débit cardiaque. Le débit cardiaque est la quantité de sang propulsée par le cœur dans le système artériel par unité de temps. Le débit cardiaque est donc déterminé par le volume éjecté à chaque systole et par la fréquence de ces systoles. La résistance périphérique totale est l'ensemble des forces qui s'opposent à l'écoulement du sang. Les principaux facteurs qui déterminent la résistance périphérique totale sont la viscosité du sang de même que la longueur, le diamètre et l'élasticité des vaisseaux. En situation normale, la viscosité du sang et la longueur des vaisseaux restent constantes. Par contre, le diamètre des artères peut varier en fonction des besoins des organes. Le diamètre des vaisseaux sanguins est

issu de l'équilibre entre la vasoconstriction et la vasodilatation, à court terme, et du remodelage vasculaire à long terme. Le remodelage vasculaire est issu de changements dans la structure des vaisseaux. La contraction vasculaire augmente avec le Ca^{2+} intracellulaire et la vasodilatation augmente avec les concentrations de GMPc intracellulaire. L'élasticité des vaisseaux varie généralement avec le diamètre en fonction du tonus du muscle lisse, mais peut également changer avec l'âge ou les pathologies. Dans un corps normal, le volume d'éjection, la fréquence des systoles et le diamètre des vaisseaux sanguins peuvent être modifiés pour maintenir la PA (Marieb, 1993).

1. Mécanismes de régulation à court terme

a) Rôle des barorécepteurs

Les barorécepteurs sont des récepteurs qui détectent les variations de PA. Ils sont situés dans la crosse aortique et dans les sinus carotidiens. Les barorécepteurs de la crosse aortique permettent de réguler la pression dans l'ensemble du système circulatoire et ceux des sinus carotidiens doivent protéger l'apport de sang au cerveau. Plus la pression est élevée, plus les récepteurs seront étirés. La fréquence des influx nerveux, que les barorécepteurs envoient au centre vasomoteur, est augmentée par leur étirement. Ces influx voyagent jusqu'au centre vasomoteur dans le bulbe rachidien, soit via les fibres sensorielles du nerf vague pour les récepteurs de la crosse aortique, soit via les fibres sensorielles du nerf glossopharyngien pour les récepteurs carotidiens. Cette augmentation de la fréquence des

influx inhibe le centre vasomoteur. Ce dernier envoie constamment des influx aux nerfs sympathiques qui innervent la couche musculaire lisse des vaisseaux sanguins. Ces influx par leurs fréquences maintiennent un tonus musculaire qui, dans la couche vasculaire musculaire lisse, entraîne une vasoconstriction. Lorsque le centre vasomoteur est inhibé, la fréquence des influx nerveux est diminuée et le tonus musculaire aussi. L'inhibition du centre vasomoteur entraîne donc une baisse de la vasoconstriction, ce qui réduit la pression à l'intérieur des artères (Marieb, 1993).

Les barorécepteurs envoient aussi des influx au centre cardio-inhibiteur. Lorsque stimulées, les neurones du centre cardio-inhibiteur vont activer le système nerveux parasympathique et agir sur le cœur pour réduire la fréquence cardiaque et le volume d'éjection. Cette baisse du débit cardiaque diminue la PA. De plus, le centre cardio-accélérateur s'en retrouve inhibé.

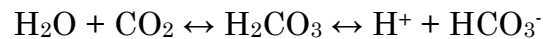
Inversement, quand la PA est faible, les barorécepteurs ne sont plus étirés. Alors, les barorécepteurs envoient moins d'influx nerveux excitateurs vers le centre cardio-inhibiteur et moins d'influx nerveux inhibiteurs vers le centre vasomoteur. Par conséquent, le centre vasomoteur permet la vasoconstriction et l'augmentation du débit cardiaque. Ceci ramène la PA à son niveau normal (Boron, 2003).

L'action des barorécepteurs est très rapide et vise à maintenir la pression sanguine stable. Les barorécepteurs ne corrigent pas les variations

de pression graduelles et soutenues. Ainsi, les barorécepteurs peuvent s'ajuster à une nouvelle valeur de référence comme observée lors de l'hypertension (Marieb, 1993).

b) Rôle des Chimiorécepteurs

Si les barorécepteurs mesurent la quantité de sang distribuée, les chimiorécepteurs en analysent la qualité. Situés dans la crosse aortique et dans les corpuscules carotidiens, les chimiorécepteurs mesurent la teneur en oxygène du sang et son pH. Le CO₂ se dissout très facilement dans l'eau où il se transforme en acide carbonique en présence de l'anhydrase carbonique selon la relation suivante :



Donc, la mesure du pH, qui révèle l'acidité du sang, donne une indication de la teneur en CO₂ du sang. Lors d'une diminution de la teneur en oxygène ou du pH du sang, les chimiorécepteurs augmentent les influx vers le centre vasomoteur. Il s'ensuit une vasoconstriction afin d'accélérer le retour du sang vers le coeur. En utilisant les mêmes mécanismes que les barorécepteurs, les chimiorécepteurs vont accélérer la circulation pour maintenir l'apport en oxygène aux organes cibles.

2. Mécanismes chimiques

En plus des mécanismes réflexes, il y a des mécanismes chimiques. Les mécanismes chimiques comprennent plusieurs hormones dont certaines seront traitées en détail plus loin.

3. Mécanismes de régulation à long terme

Lorsque le volume sanguin est trop élevé, cela augmente le débit sanguin et la PA. Les barorécepteurs ne pouvant détecter les variations lentes de volume sanguin, d'autres mécanismes interviennent. Premièrement, quand la PA augmente, le liquide filtré par le glomérule n'est plus réabsorbé autant qu'avant. Il en résulte une perte de volume sanguin par une formation excessive d'urine. L'autre mécanisme implique l'appareil juxta glomérulaire qui sécrète de la rénine lorsque le débit sanguin aux reins diminue. Cette sécrétion active le système Rénine-Angiotensine (SRA) qui engendre de la vasoconstriction et une augmentation de la pression sanguine (Marieb, 1993).

D. Types d'hypertension

L'hypertension est définie comme une PA élevée au repos. Cette pression élevée peut l'être lors de la diastole, de la systole ou les deux à la fois. Selon qu'elle affecte la circulation pulmonaire ou systémique, l'hypertension peut être qualifiée de pulmonaire ou systémique. L'hypertension peut aussi être catégorisée selon sa cause. Elle sera appelée

secondaire si elle est une conséquence d'un autre problème (comme l'insuffisance rénale) et primaire si l'hypertension n'est pas causée par un autre problème de santé. Voici les principaux types d'hypertension systémique primaire (Société d'hypertension canadienne, 2008).

L'hypertension systolique isolée est causée par une perte d'élasticité des artères, celles-ci ne peuvent alors plus absorber la brusque augmentation de la pression. Ce type d'hypertension affecte surtout les personnes âgées (Taddei *et al.*, 2006).

L'hypertension essentielle est dite idiopathique, car on n'en connaît pas la cause exacte. On soupçonne toutefois que l'épaississement du muscle lisse vasculaire joue un rôle important, car cela réduirait la lumière des artères (figure 1) (Mulvany, 1993). L'hypertension essentielle représente 90 % des cas d'hypertension.

1. Effets sur la santé

L'hypertension peut engendrer une multitude de problèmes pour la santé particulièrement des complications cardiovasculaires. Une PA élevée favorise le développement de l'artériosclérose. La PA exerce une résistance supplémentaire au sang propulsé par le cœur. Pour propulser le sang avec plus de puissance, le muscle cardiaque s'hypertrophie. Cette hypertrophie est concentrique, c'est-à-dire que le muscle devient plus épais, mais que le

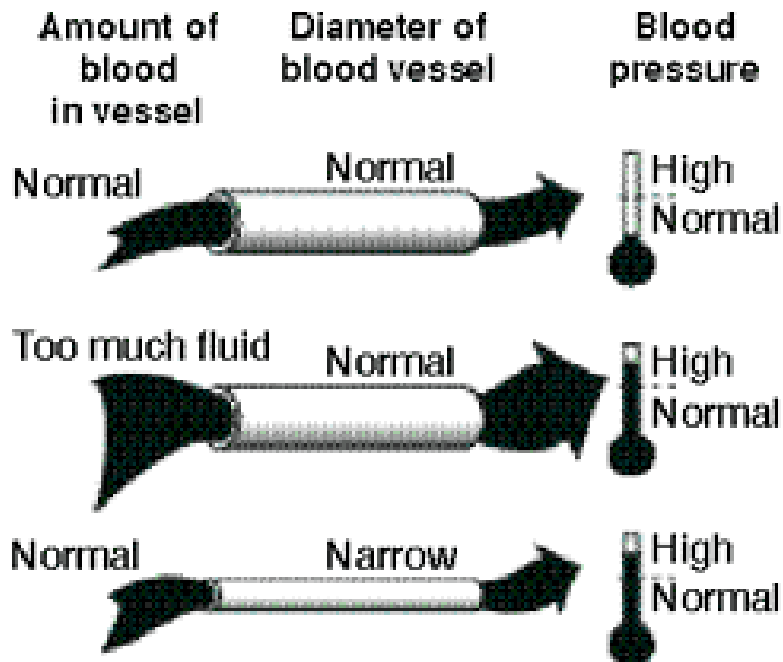


Figure 1. Causes de l'élévation de la pression artérielle

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (2008)
<http://kidney.niddk.nih.gov/Kudiseases/pubs/kdictionary/F-J.htm>.

Explication : La taille de la flèche représente le débit cardiaque et le diamètre du vaisseau représente la résistance périphérique totale. L'hypertension se produit lorsque le débit cardiaque ou la résistance périphérique totale est trop élevé.

volume intérieur ne grossit pas, en fait, il rapetisse. Si le volume de sang que peut accueillir le ventricule diminue trop, il y a risque d'insuffisance cardiaque (Lilly, 2003).

La PA élevée entraîne aussi un risque accru de rupture des artères et artéριοles. Si une artère se rompt dans le cerveau, on parle alors d'accident cérébro-vasculaire qui peut causer de graves lésions et même la mort (Société d'hypertension canadienne, 2008).

L'hypertension peut mener à une insuffisance rénale. Cette insuffisance est causée par un épaississement des parois vasculaires menant au néphron ce qui réduit son approvisionnement en sang et résulte en une atrophie des tubules et du glomérule. L'insuffisance rénale contribue au maintien ou à l'augmentation de l'hypertension. D'autres conséquences comme la cécité peuvent survenir en raison de l'hypertension. Les probabilités de complication sont multipliées si d'autres facteurs de risque tels le tabagisme, l'obésité ou la sédentarité s'ajoutent à l'hypertension (Lilly, 2003, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2008; Société d'hypertension canadienne, 2008).

E. Modèles animaux d'hypertension

Comme l'hypertension affecte un si gros pourcentage de la population, elle est très étudiée. Dans le but d'étudier plus amplement cette maladie, les scientifiques ont développé des animaux souffrant d'hypertension. Pour la

majorité de ces modèles animaux, l'hypertension a été induite par des traitements ou des opérations. Ces modèles sont très utiles et nous permettent d'étudier les mécanismes et les traitements d'hypertension dont nous connaissons bien les causes.

Le premier modèle d'hypertension qui fut inventé par Goldblatt (un des pionniers de la recherche sur l'hypertension) consiste simplement à mettre une pince autour de l'artère menant à l'un des deux reins (2 reins 1 clip). Le 2 reins 1 clip est un modèle d'hypertension rénovasculaire comme la variante plus utilisée 1 rein 1 clip. Dans ce modèle, les niveaux de rénine et d'aldostérone sont élevés et les effets sont une hypertrophie cardiaque et une dysfonction endothéliale. Les rats Dahl sensibles au sel sont une souche de rats qui a été sélectionnée à partir d'une grande variation dans la sensibilité au sel. C'est un modèle d'hypertension génétique qui manifeste de l'hypertension lors d'une diète avec une teneur normale en sel et ces animaux meurent lorsque la teneur en sel est élevée. Ce modèle présente une hypertrophie cardiaque avec des risques de troubles cardiaques, d'atteinte rénale et de dysfonction endothéliale. Un autre modèle fréquemment utilisé est le Doca-sel. Dans ce cas, l'hypertension est induite par l'ingestion d'acétate de désoxycorticostérone (Doca) et de sel par le rat, ce qui résulte en une hypertrophie cardiaque, une atteinte rénale et un dysfonctionnement endothélial. Toutefois, le remodelage vasculaire est différent de l'hypertension essentielle dans les modèles Doca-sel et Dahl sensibles au sel

(voir section I.F). Dans le modèle, 1 rein 1 clip et 2 reins 1 clip, les reins ont un rôle prépondérant par rapport aux CMLV (pinto et al, 1998).

Malheureusement, l'hypertension est, dans 90% des cas, essentielle. Les scientifiques ont alors tenté et réussi à développer des rats qui deviennent spontanément hypertendus pour servir de modèle à l'hypertension essentielle.

1. Les rats spontanément hypertendus

Les rats spontanément hypertendus (SHR) ont été développés à partir de rats wistar-kyoto (WKY) démontrant une PA légèrement supérieure à la normale. À la suite de croisements, les chercheurs ont réussi à amplifier ce trait d'une PA élevée jusqu'à l'obtention de rats qui deviennent carrément hypertendus. Ces rats ont donc été baptisés SHR (pour spontaneously hypertensive rats). Ils sont aujourd'hui très étudiés à travers le monde et sont considérés comme un bon modèle d'hypertension essentielle (Okamoto, 1963). En effet, Intengan et Schiffrin (2000) ont montré que le remodelage vasculaire est semblable dans les rats SHR et dans l'hypertension essentielle humaine. La pertinence de ce modèle par rapport à notre étude et aux autres modèles sera abordée dans la discussion.

F. Prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire

L'hypertension s'accompagne souvent d'un remodelage des structures vasculaires (Michel *et al.*, 1990; Hadrava *et al.*, 1991; Garnier, 1993; Mulvany, 1993; Hughes *et al.*, 1995). Cependant, les changements des

structures vasculaires peuvent aussi être la cause de l'hypertension comme dans le cas de l'hypertension systolique isolée. Dans certains cas comme l'hypertension essentielle, plusieurs chercheurs tentent d'établir si le remodelage vasculaire est une cause ou s'il s'agit d'une conséquence aggravante. Le remodelage vasculaire tel qu'observé lors de l'hypertension essentielle est causé par la prolifération, la migration et l'hypertrophie des CMLV. Il en résulte un épaississement concentrique de la couche musculaire lisse. Sans que le diamètre total soit affecté, la lumière du vaisseau est rétrécie par cet épaississement concentrique (Intengan et Schiffrin, 2000). Ce rétrécissement est peut-être une des causes de l'hypertension essentielle et augmente assurément la pression artérielle (figure 1). Dans cette optique, les signaux qui stimulent la prolifération des CMLV deviennent intéressants à étudier dans les modèles d'hypertension essentielle. Les facteurs de croissance et les peptides vasoactifs sont d'un intérêt particulier puisque leur concentration est accrue dans les tissus du rat SHR et d'humain hypertendu (Hahn *et al.*, 1990; Schiffrin, 1995; Kunimoto *et al.*, 1998; Rosendorff, 1998; Satoh *et al.*, 2001; Sugo *et al.*, 2001; Touyz et Schiffrin, 2003). De plus, les facteurs qui stimulent la prolifération tendent à stimuler l'hypertrophie et la migration. Dans les modèles d'hypertension induite par le sel, l'épaississement de cette même couche musculaire semble davantage excentrique. L'épaississement excentrique de la couche musculaire n'affecte pas la lumière du vaisseau où coule le sang mais entraîne un élargissement

de la taille totale du vaisseau. Toutefois, cet élargissement peut aussi être un facteur aggravant l'hypertension en rendant les parois artérielles plus rigides (Intengan et Schiffrin, 2000).

G. Traitement de l'hypertension

1. Traitements non-pharmacologiques

Les personnes souffrant d'hypertension légère, soit une PA systolique de 121 mmHg à 139 mmHg, peuvent réduire leur pression artérielle de manière significative en modifiant leurs habitudes de vie. L'activité physique, à raison d'une demi-heure par jour, permet une très bonne réduction de la PA sans médicaments. La perte de poids aussi peut réduire substantiellement la PA. La société d'hypertension du Québec évalue que la réduction de la PA systolique peut atteindre jusqu'à 7 mmHg pour chaque 5 kg de diminution de poids. En modifiant son régime alimentaire, on peut aussi réduire l'apport en sodium, calcium, potassium et lipides pour mieux contrôler sa PA. Les excès d'alcool et la consommation de tabac sont également à éviter pour ceux qui luttent contre l'hypertension (Société d'hypertension canadienne, 2008).

Le stress, particulièrement le stress quotidien, représente une des principales causes d'hypertension. Plusieurs des hormones impliquées dans le stress sont de puissants vasoconstricteurs (AngII, ET-1 ou noradrénaline) (Lilly, 2003).

2. Traitements pharmacologiques

Lorsque l'hypertension est élevée ou que les traitements non pharmacologiques n'ont pas été efficaces, les médecins peuvent compter sur un impressionnant arsenal de médicaments antihypertenseurs. Ces médicaments sont répartis en plusieurs catégories.

Les diurétiques forment la première classe de l'arsenal antihypertensif. Les diurétiques augmentent la sécrétion rénale d'eau et de sels afin de réduire le volume sanguin. Les diurétiques sont peu chers et efficaces pour faire baisser la PA. Ils ont toutefois plusieurs effets secondaires comme l'élévation de la glycémie, du cholestérol et une baisse des fonctions sexuelles. Un deuxième type de médicaments est désigné sous le terme de bêta-bloqueurs. Ces antagonistes bloquent les récepteurs bêta-adrénergiques, inhibant ainsi une partie du système sympathique, ce qui ralentit le débit cardiaque. Parallèlement, les vaisseaux se dilatent puisque les bêta-bloqueurs réduisent l'activité des nerfs sympathiques qui innervent la couche musculaire lisse. Comme les diurétiques, les bêta-bloqueurs présentent de nombreux effets secondaires. Les bloqueurs de canaux calciques constituent une troisième catégorie de médicaments contre l'hypertension. Les bloqueurs de canaux calciques à action longue sont utilisés pour réduire la contractilité du muscle lisse vasculaire et la contractilité cardiaque. La PA est alors diminuée grâce à l'action combinée de la vasodilatation et d'une réduction du débit cardiaque. Finalement, la dernière catégorie de médicament agit sur le

système rénine-angiotensine (SRA). Le SRA peut être bloqué par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui préviennent la formation d'Angiotensine II (AngII) ou par les antagonistes du récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT₁) qui empêchent l'AngII d'activer un de ses récepteurs. L'AngII étant l'agent vasoconstricteur du SRA, l'inhibition de son action entraîne une vasodilatation. Un autre effet hypotenseur est une réduction de la sécrétion d'aldostérone, ce qui augmente la sécrétion de sodium par les reins. Les effets secondaires incluent une toux sèche et une hyperkalémie (Lilly, 2003). De plus, les antagonistes de AT₁ autant que les inhibiteurs de ECA réduisent l'hypertrophie de la couche musculaire lisse vasculaire (Rosendorff, 1998).

II. Mécanismes chimiques

Les réflexes nerveux régulent surtout les variations brusques de PA, mais il existe d'autres mécanismes de régulation de la PA. Les plus importants des mécanismes chimiques sont décrits ci-dessous.

A. Peptides vasoactifs

Les peptides vasoactifs sont des peptides qui modifient le tonus musculaire des vaisseaux pour faire varier la pression sanguine. Ces peptides agissent sur les cellules endothéliales afin de provoquer la relâche d'un intermédiaire (qui influe sur les CMLV) ou interviennent directement sur les CMLV afin d'induire ou d'inhiber leur contraction. Les peptides vasoactifs

agissent selon des mécanismes semblables. Ces mécanismes impliquent généralement la sécrétion de précurseurs. Ces précurseurs ne sont pas actifs et peuvent être relâchés localement ou à partir d'un organe éloigné. Leur inactivité leur permet de franchir de grandes distances avant d'être captés ou dégradés. Près du site d'action, une enzyme de conversion clive le précurseur peptidique en peptide actif qui agira rapidement sur les cellules avoisinantes avant d'être dégradé tout aussi rapidement. Il existe plusieurs peptides vasoactifs tels que l'angiotensine, l'endothéline, la vasopressine et bien d'autres. Les peptides vasoactifs ont, comme autre point en commun, des récepteurs qui appartiennent généralement à la même famille, soit les récepteurs couplés aux protéines G (Sander et Huggins, 1972; Terragno et Terragno, 1977).

B. Angiotensine

La rénine fut le premier élément découvert dans ce qui compose le SRA en 1898 à partir d'extraits de reins de lapins. Par la suite, un groupe de chercheurs argentins mit en évidence l'hypertensine qui est produit par l'action de la rénine. Puis, des travaux dirigés par Skeggs confirmeront la nature des composantes du SRA et identifieront l'hypertensine II comme l'agent vasoconstricteur du SRA (Skeggs *et al.*, 1955; Skeggs *et al.*, 1956a; Skeggs *et al.*, 1957; Skeggs *et al.*, 1956b). Par la suite, l'hypertensine sera rebaptisée angiotensine. Le SRA est non seulement impliqué dans le maintien de la PA, mais aussi dans l'équilibre osmotique du sang. La rénine

est produite dans le rein et agit sur l'angiotensinogène qui est le précurseur de l'angiotensine. L'angiotensinogène fut d'abord identifié comme provenant du foie, mais il peut être produit et relâché dans plusieurs tissus (Naftilan *et al.*, 1991). L'angiotensinogène n'a pas d'activité physiologique, c'est pourquoi ce peptide (asp-arg-val-tyr-ileu-his-pro-phe-his-leu-leu-val-tyr-ser) doit être clivé entre les deux leucine par la rénine pour devenir l'angiotensine I (Skeggs *et al.*, 1957). L'angiotensine I aussi ne possède que peu d'activité physiologique. L'angiotensine I doit être convertie localement en AngII par l'ECA (Skeggs *et al.*, 1956a). Toutefois, l'ECA est incapable de cliver l'angiotensinogène directement en AngII. L'angiotensine II est un peptide de 8 acides aminés (asp-arg-val-tyr-ileu-his-pro-phe) (Skeggs *et al.*, 1956b). Cette conversion doit être locale, car l'AngII est rapidement dégradée en angiotensine III ou angiotensine 1-7 qui n'a pas les mêmes propriétés que l'AngII (Oudart, 2005).

Dans le but de traiter des maladies impliquant le SRA, les chercheurs ont développé une série de médicaments qui sont des inhibiteurs d'ECA. Bien qu'ils baissent la PA efficacement, ces médicaments présentent certains effets secondaires, telle la toux. Parmi les causes potentielles de ces effets secondaires, on note un ralentissement de la dégradation de la bradykinine et son accumulation. De plus, pour la recherche scientifique, les inhibiteurs d'ECA présentent les inconvénients de ne bloquer que partiellement la production d'AngII et d'agir à la fois sur le récepteur à l'angiotensine II de

type 2 (AT₂) et le récepteur AT₁ (Lilly, 2003). On développa alors des antagonistes non peptidiques dont la molécule la plus efficace fut appelée DuP753 et rebaptisée losartan. Ce dernier possède une durée de vie suffisamment longue et peut être administré de manière orale, ce qui a permis son développement en médicament. Il fut établi ultérieurement que son affinité est spécifique au récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT₁) (Chiu *et al.*, 1989). La spécificité de son action en fait un outil très utile pour étudier les rôles spécifiques des différents récepteurs à l'AngII (Chiu *et al.*, 1990).

1. Récepteurs de l'angiotensine et signalisation transmembranaire

Au moins quatre récepteurs à l'angiotensine II ont été identifiés à ce jour. Ils ont été baptisés AT₁, AT₂, AT₃ et AT₄ mais seuls AT₁ et AT₂ sont bien connus et étudiés (Unger *et al.*, 1996). En traitant des rats WKY avec de l'AngII et des antagonistes aux récepteurs à l'AngII, Li *et al.* ont montré que l'action hypertensive de l'AngII est relayée par AT₁ (Li *et al.*, 1998). Tel que montré par la figure 2, le récepteur AT₁ possède une extrémité N-terminale extracellulaire, sept domaines transmembranaires et une extrémité carboxyle intracellulaire (Sayeski et Bernstein, 2001). Ceci est caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Comme tous les RCPG, AT₁ peut initier des signaux par les protéines G. L'extrémité carboxyl, seule, est suffisante pour initier de manière dose-dépendante l'activation G_{ai} ou G_o (Shirai *et al.*, 1995). Toutefois, l'activation de la Phospholipase C (PLC) dans

les CMLV est relayée par AT₁ et non AT₂ (Freeman et Tallant, 1994; Miserey et Clauser, 1998). Par la production de chimères entre les récepteurs AT₁ et AT₂, Wang et al. (1995) ont montré que la transposition de la troisième boucle intracellulaire (Trp219-ala225) de AT₁ sur AT₂ ajoutait à ce dernier la capacité d'activer Gq₁₁. Inversement, en remplaçant la troisième boucle intracellulaire de AT₁ par celle de AT₂, le récepteur AT₁ perdait son action sur Gq₁₁.

Pour la liaison au ligand, les cystéines des domaines extracellulaires sont essentielles. La leucine à la position 199 (en noir à la figure 2) est aussi essentielle à la liaison récepteur-ligand. Finalement, les acides aminés sur la queue N-terminale près du premier domaine transmembranaire et sur la troisième boucle extracellulaire près du 7^e domaine transmembranaire affectent la liaison au ligand lorsqu'ils sont changés par une mutation.

Plusieurs facteurs régulent l'expression d'AT₁. Le principal facteur qui réduit l'expression d'AT₁ est l'AngII lui-même. De plus, les facteurs de croissance, comme le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor ou EGF), le facteur de croissance des fibroblastes et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), ainsi que l'estrogène réduisent l'expression du récepteur AT₁. Finalement, l'ET-1 régule à la baisse l'expression du récepteur AT₁.

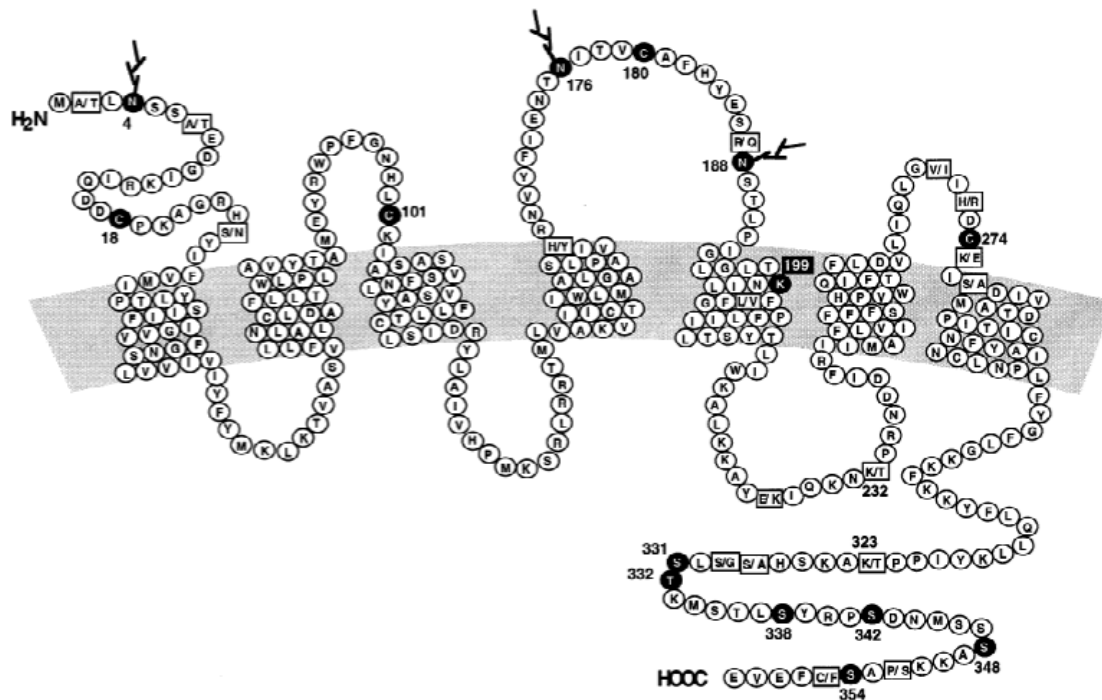


Figure 2. Structure du récepteur AT₁

Sayeski PP, Ali MS, Semeniuk DJ, Doan TN, and Bernstein KE, Angiotensin II signal transduction pathways. Regul.Pept. 78: 19-29, 1998.

2. Signalisation intracellulaire

a. L'angiotensine et l'inositol phosphate

Après avoir incubé des CMLV avec un analogue non hydrolysable du GTP, une stimulation de ces CMLV avec l'AngII mène à une accumulation de GTP non-hydrolysable à la membrane. Crawford et al. en ont déduit que AT₁ est couplé aux protéines G (Crawford *et al.*, 1992). Dans les CMLV, AT₁ est couplé aux protéines G_{αq/11}, G_{αi/0} et G_{α11/12}. La stimulation de AT₁ par l'AngII peut augmenter les concentrations d'inositol triphosphate (IP₃). L'IP₃ et le diacylglycérol (DAG) sont formés à partir du phosphatidyl-inositol-diphosphate par la phospholipase C_β (PLC_β) qui est elle-même activée suite à l'activation d'AT₁ (Paquet *et al.*, 1989; Marrero *et al.*, 1994). L'IP₃ provoque la relâche de calcium à l'intérieur de la cellule. Le calcium intracellulaire se lie à la calmoduline pour agir sur une grande variété de protéines. Parmi les protéines activées par la calmoduline, on retrouve, dans le muscle lisse, la kinase de la chaîne légère de myosine (KCLM). La KCLM phosphoryle les chaînes légères de myosine. La phosphorylation des chaînes légères de myosine enclenche la contraction du muscle lisse en associant les molécules de myosine en filaments et en augmentant l'activité catalytique de la myosine (Cooper, 1999). Le DAG va activer la protéine kinase C (figure 3) (PKC) (Sayeski *et al.*, 1998; Mehta et Griendling, 2007).

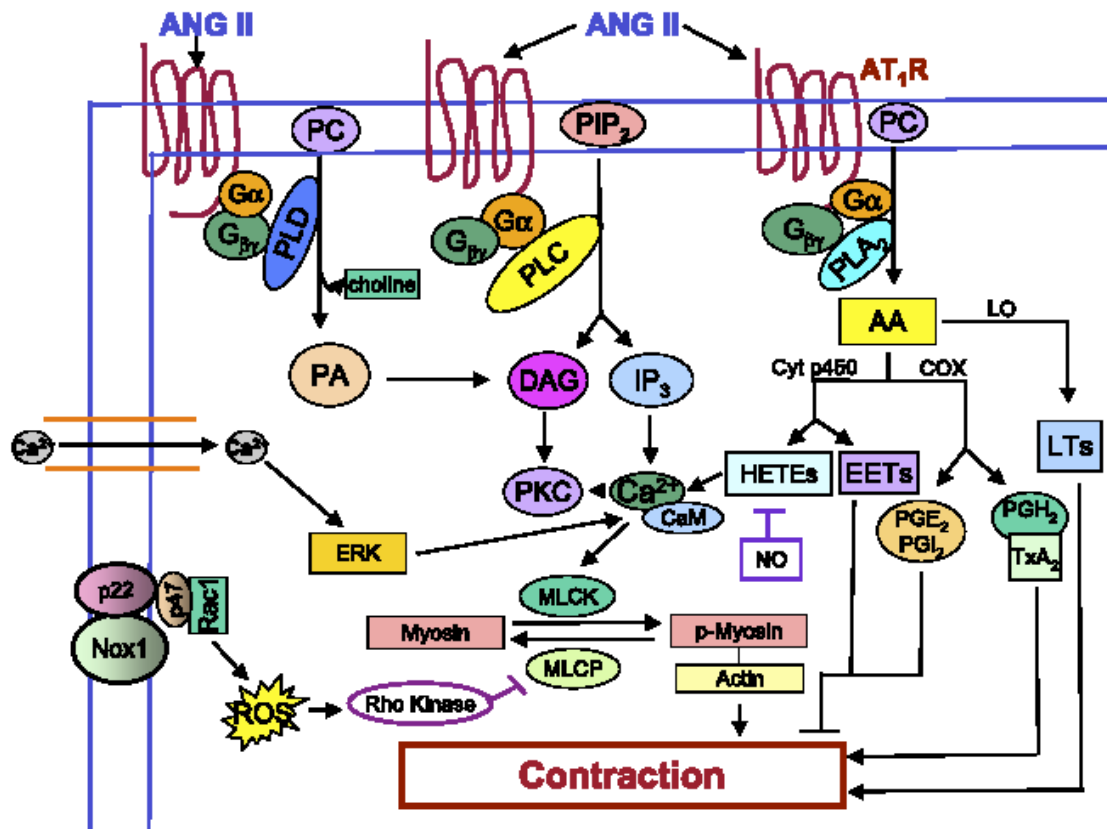


Figure 3. Activation des phospholipases par l'Angiotensine II

Mehta PK and Griendling KK, Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 292: C82-C97, 2007.

Abréviations : AA, acide arachidonique; ANGII, angiotensine; AT₁R, récepteur à l'ANGII Ca²⁺, calcium; CaM, calmoduline; DAG, diacylglycérol; G_α, sous unité alpha de la protéine G hétérotrimérique; G_{βγ}, sous unité beta/gamma de la protéine G hétérotrimérique; IP₃, Inositol triphosphate; MLCK, *myosine light chaine kinase*; MLCP, *myosine light chaine phosphatase*; PA, acide phosphatidique; PC, phosphatidylcholine; PIP₂, phosphatidylinositol biphosphate; PKC, protéine kinase C; PLA, phospholipase A; PLC, phospholipase C, PLD, phospholipase D.

Explication : L'ANGII stimule l'activité de la PLC qui transforme le PIP₂ en DAG et IP₃. L'IP₃ augmente le Ca²⁺ intracellulaire, ce qui active la CaM. La CaM active la MLCK qui initie la contraction du muscle lisse. À travers la formation de DAG, l'ANGII stimule l'activité de la PKC qui intervient dans la prolifération.

D'autres effecteurs sont aussi activés par l'AngII sur son récepteur AT₁ tels les phospholipases A₂ (PLA₂) et phospholipases D (PLD). La PLD hydrolyse la phosphatidylcholine en choline et acide phosphatidique. L'acide phosphatidique est converti en DAG (Freeman et Tallant, 1994). La PLA₂ maintient l'activité oxydante de la NADPH oxydase via la production d'acide arachidonique, de ses dérivés et de ses métabolites. L'acide arachidonique active aussi les cyclooxygénases (figure 3).

b. L'angiotensine et l'adénylate cyclase

L'adénylate cyclase est une enzyme hétérodimérique dont chacune des deux parties comporte 6 domaines transmembranaires. L'action de l'adénylate cyclase est de convertir l'ATP en AMPc. Ce dernier est un second messenger et, lorsque présent en de fortes concentrations, il active la protéine kinase A (PKA). La PKA peut phosphoryler plusieurs protéines pour les rendre actives ou inactives. Les protéines CREB, qui se lient à la séquence CRE pour activer la transcription de certains gènes, sont parmi les groupes de protéines activées par la PKA (Cooper, 1999).

L'adénylate cyclase peut être régulée par les protéines G (Watts et Neve, 2005). Lorsque G_{ai} se lie au GTP puis à l'adénylate cyclase, l'activité de l'adénylate cyclase est alors inhibée et les taux d'AMPc diminuent drastiquement. Le récepteur AT₁ est lié à G_{ai} et peut donc réduire les taux d'AMPc (Shirai *et al.*, 1995). L'adénylate cyclase peut aussi être régulée par d'autres mécanismes faisant partie de la signalisation d'AT₁. Dans le système

cardiovasculaire, l'adénylate cyclase peut être inhibée par le Ca^{2+} (Caldwell *et al.*, 1992; Cooper *et al.*, 1995). La PKA peut aussi inhiber la formation d'AMPc. Toutefois, la PKC peut stimuler ou inhiber la formation d'AMPc en fonction du type d'adénylate cyclase (Beazely et Watts, 2006). Comme l'ont prouvé les études d'Anand-Srivastava (Anand-Srivastava, 1983), la résultante de l'action de l'AngII sur l'aorte des rats est une diminution des niveaux d'AMPc. De plus, l'expression de Gai est augmentée dans les CMLV par un traitement à l'AngII (Palaparti *et al.*, 1999). Comme le losartan inhibe cette augmentation, cela confirme que l'action de l'AngII sur l'adénylate cyclase passe par AT_1 (Anand-Srivastava et Palaparti, 2003).

c. L'angiotensine et le stress oxydatif

La stimulation des CMLV par l'AngII active la NADPH oxydase. Une fois activée, la NADPH oxydase produit des espèces réactives oxygénées (ERO) (Rajagopalan *et al.*, 1996). Il a été démontré que la stimulation par l'AngII augmente la production d'anion superoxyde (O_2^-) et l'expression des sous-unités Nox4 et p47(phox) de la NADPH oxydase (Li *et al.*, 2007). Les ERO, qui en résultent, jouent des rôles importants dans la signalisation intracellulaire. Les mécanismes exacts de cette activation sont encore à l'étude. Toutefois, la baisse d'activation de la NADPH oxydase, à la suite de l'inhibition de la PKC, et la hausse de son activité, à la suite de l'activation de la PKC, nous montrent que la PKC est un des mécanismes d'activation de la NADPH oxydase par l'AngII (Lassegue et Clempus, 2003). Il semble que la

PLD intervienne dans l'action de l'AngII sur la NADPH oxydase. L'ajout d'acide phosphatidique aux CMLV augmente l'activation de la NADPH oxydase. De plus, l'inhibition de la PLD réduit la formation des ERO, à la suite de la stimulation des CMLV par l'AngII (Lassegue et Clempus, 2003). Enfin, l'activation de la NADPH oxydase par l'acide arachidonique et la réduction des ERO produits par l'AngII lors de l'inhibition de la PLA₂, indiquent clairement le rôle de la PLA₂ dans la signalisation du stress oxydatif.

d. L'angiotensine et la transactivation des tyrosines kinases

À la suite de la stimulation des CMLV par un agoniste du récepteur AT₁, il y a transactivation de certaines tyrosines kinases. Parmi les tyrosines kinases activées, on retrouve les récepteurs des facteurs de croissance, tels le récepteur de EGF (EGF-R) et le récepteur de PDGF (PDGF-R), et des tyrosines kinases non réceptrices, tel c-Src (Rao, 1996; Berk et Corson, 1997; Eguchi et Inagami, 2000; Satoh *et al.*, 2001) (figure 4). La transactivation de EGF-R par l'AngII ne peut se produire qu'en présence d'ERO (Ushio-Fukai *et al.*, 2001). L'inhibition des ERO par des antioxydants prévient aussi l'activation de c-Src (Ushio-Fukai *et al.*, 2001). L'inhibition des métalloprotéases empêche la transactivation de EGF-R (Ohtsu *et al.*, 2006). L'inhibition de c-Src ou de EGF-R prévient la stimulation de la prolifération induite par l'AngII (Ishida *et al.*, 1998; Eguchi et Inagami, 2000; Sayeski et Ali, 2003). Des ERO comme l'anion super oxyde ou le peroxyde d'hydrogène

peuvent à eux seuls activer les voies tyrosines kinases comme EGF-R ou c-Src (Rao, 1996).

e. L'angiotensine et les MAPkinases

Dans les CMLV, la stimulation d'AT₁ active les voies de signalisation p42/p44 MAPK et JAK/STAT comme représentées à la figure 4. Lorsque l'activation de EGF-R est bloquée (par un inhibiteur de EGF-R ou un inhibiteur de métalloprotéase), l'AngII ne peut stimuler la prolifération des CMLV de rats normotendus (Yang *et al.*, 2005). L'activation des MAPK par l'AngII aussi se retrouve diminuée par l'inhibition de EGF-R (Yang *et al.*, 2005).

f. La signalisation de l'angiotensine dans l'hypertension

Dans les modèles d'hypertension SHR, 1-rein 1-clip et L-NAME, l'expression de Gai dans les CMLV est supérieure à ce qu'on observe normalement (Anand-Srivastava, 1992; Hashim et Anand-Srivastava, 2004; Ge *et al.*, 2006). Une relation claire a été établie entre l'activité et l'expression de Gai (Anand-Srivastava, 1992). On constate donc dans les CMLV de SHR que l'activité de l'adénylate cyclase et les concentrations d'AMPc sont réduites par une augmentation Gai comparées aux CMLV de rats WKY (Lappas *et al.*, 2005). Une inhibition de Gai par la toxine pertussis retarde et atténue l'apparition de l'hypertension chez les jeunes rats SHR (Li et Anand-Srivastava, 2002). Inversement, une augmentation de la signalisation de AMPc peut réduire l'hypertension (Berg *et al.*, 2008). De plus, notre

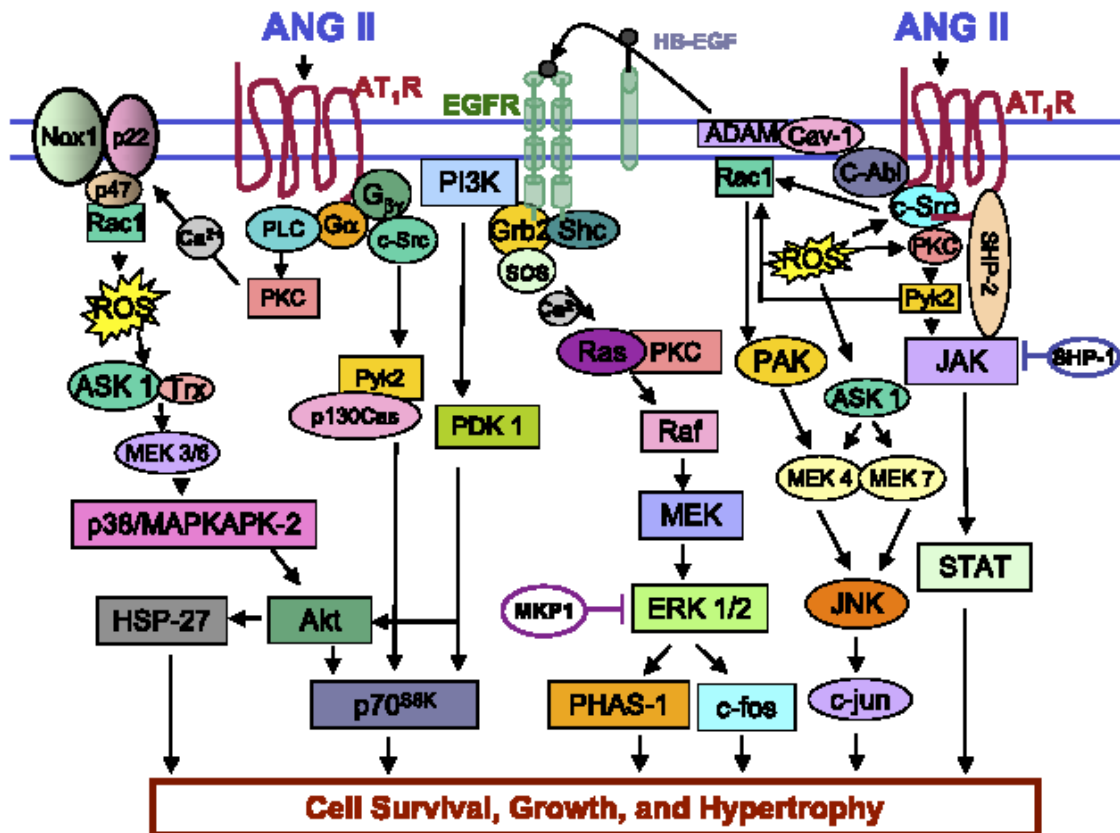


Figure 4. Voies de signalisation activées par le récepteur AT₁

Mehta PK and Griending KK, Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 292: C82-C97, 2007

Abréviations: ADAM, une métalloprotéase; ANGII, angiotensineII; AT₁R, récepteur à l'ANGII; EGF-R, *epidermal growth factor receptor*; ERK 1/2, MAPK; G_α, sous unité alpha de la protéine G hétérotrimérique; G_{βγ}, sous unité beta/gamma de la protéine G hétérotrimérique; HB-EGF, *heparin binding epidermal growth factor*; IP₃, Inositol triphosphate; MEK, MAPKK; PA, acide phosphatidique; PC, phosphatidylcholine; PIP₂, phosphatidylinositol biphosphate; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; Raf, MAPKKK; ROS, espèces réactives oxygéné

La voie des MAPK est activée à la suite de la phosphorylation de EGF-R par le HB-EGF. Le HB-EGF est libéré après la stimulation par ANGII. La PKC, c-Src et ADAM sont aussi activées par l'ANGII et ont un rôle dans la prolifération cellulaire.

laboratoire a aussi démontré que les faibles niveaux de AMPc sont responsables du stress oxydatif accru dans les CMLV de SHR (Saha *et al.*, 2008). Cela concorde avec l'augmentation de stress oxydatif observée dans plusieurs modèles d'hypertension chez le rat (Doca-sel, SHR, AngII...) (de Champlain *et al.*, 2004; Touyz, 2004). Dans les CMLV de SHR, on observe une augmentation du Ca^{2+} comme lors de l'hypertension essentielle (Zidek et Vetter, 1987). Finalement, l'activité de p42/p44 MAPK est plus importante dans les cellules vasculaires prélevées chez des rats SHR que chez des rats WKY (Kubo *et al.*, 2002). Tous ces changements dans la signalisation intracellulaire des CMLV sont compatibles avec une signalisation accrue de l'AngII.

Les CMLV de SHR expriment l'angiotensinogène et l'ECA davantage que les CMLV de rats normotendus WKY (Fukuda, 1997). Cette surexpression de l'AngII est un mécanisme de la surprolifération des CMLV de SHR (Kubo *et al.*, 1996; Min *et al.*, 2005; Hashim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Dans les CMLV de SHR comme lors de l'hypertension essentielle, le stress oxydatif est augmenté (Lappas *et al.*, 2005). L'AngII augmente le stress oxydatif et aussi la phosphorylation de EGF-R, mais il n'a pas encore été établi si, dans les CMLV de SHR, la surexpression d'AngII endogène entraîne la surprolifération par une augmentation de l'activation de ERK1/2 et de EGF-R.

3. Action physiologique

L'angiotensine exerce une série d'effets physiologiques. Le premier effet est sans contredit son action vasoconstrictrice, c'est-à-dire que l'AngII provoque la contraction des CMLV. Cela arrive très rapidement et permet d'adapter le tonus vasculaire à notre activité (Baker *et al.*, 1992). L'AngII va aussi stimuler la production d'aldostérone par les glandes corticosurrénales. L'aldostérone commande au rein la réabsorption de sodium et l'excrétion de potassium. Comme la réabsorption de sodium dans le sang entraîne l'absorption d'eau par osmolarité, l'aldostérone mène à une augmentation du volume sanguin (Goodfriend, 2006). Le SRA, par l'action de l'AngII, augmente aussi la libération de la vasopressine par la neurohypophyse. La vasopressine augmente la réabsorption de l'eau dans les tubules distaux et canaux collecteurs du rein (McKinley *et al.*, 2003). L'AngII agit aussi sur les cardiomyocytes. Par son effet inotrope, le débit cardiaque est augmenté (Endoh, 2006). L'AngII favorise aussi le remodelage cardiaque à la faveur d'une fibrose et d'une hypertrophie du muscle (Weber et Janicki, 1989). La soif est augmentée, ce qui favorise l'augmentation du volume sanguin. De plus, l'activité du système nerveux sympathique est augmentée par la libération de noradrénaline lors de la stimulation des terminaisons nerveuses par l'AngII. Le système nerveux sympathique accroît le débit cardiaque en augmentant le rythme cardiaque et le volume d'éjection. De plus, la

stimulation sympathique cause une vasoconstriction. Tous ces effets favorisent l'élévation de la pression sanguine (Sayeski *et al.*, 1998).

Le remodelage vasculaire tel qu'observé dans l'hypertension est causé par l'hypertrophie, la migration ou la multiplication des CMLV. L'hypertrophie et la prolifération des CMLV sont induites en culture par traitement à l'AngII (Hashim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). Ce dernier entraîne aussi un épaississement concentrique de la couche musculaire lisse vasculaire *in vivo* (Intengan et Schiffrin, 2000).

En plus de son action sur le système vasculaire, l'AngII émerge comme une molécule ayant des rôles jusque-là insoupçonnés dans plusieurs autres systèmes. L'AngII est capable de stimuler la prolifération et la relâche de facteurs mitogéniques dans plusieurs types cellulaires. De ce fait, l'AngII se retrouve dans certaines tumeurs (Yoshiji *et al.*, 2002). L'AngII peut aussi engendrer une angiogénèse qui est une étape importante dans le développement du cancer (Greene et Amaral, 2002). On retrouve une activation du SRA dans les maladies hépatiques impliquant la prolifération des cellules stellaires hépatiques incluant les carcinomes hépatiques et la fibrose du foie (Pinzani et Marra, 2001; Yoshiji *et al.*, 2007a; Yoshiji *et al.*, 2007b).

C. Endothéline

L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés qui possède une capacité de vasoconstriction presque inégalée et dont trois types sont connus

(Yanagisawa *et al.*, 1988). Ces trois types d'endothéline, endothéline-1 (ET-1), endothéline-2 et endothéline-3, proviennent de trois gènes différents. Les trois types d'endothéline sont d'abord relâchés sous forme de larges précurseurs, soit la pré-pro-endothéline. Chaque type d'endothéline possède son propre précurseur (pré-pro-endothéline 1, 2 et 3) (Inoue *et al.*, 1989). La pré-pro-endothéline, précurseur de 212 acides aminés, est clivée par une protéase et une convertase en pro-endothéline (ou Big-Endothelin). L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) convertit ce précurseur de 38 acides aminés en endothéline de 21 acides aminés (D'Orléans-Juste *et al.*, 2003; Shimada *et al.*, 1994). L'endothélium vasculaire et les CMLV produisent à la fois le précurseur de l'ET-1 et l'ECE nécessaire à sa formation (Hahn *et al.*, 1990). Puisque l'ET-1 est produit dans le système vasculaire et que les types d'endothélines sont exprimés de manière spécifique à leur tissu, nous concentrerons notre attention sur ET-1. De plus, l'affinité du récepteur ET_A est plus grande pour ET-1 que pour ET-2 et elle est plus grande pour ET-2 que pour ET-3.

Les cellules endothéliales produisent l'ET-1 lorsqu'elles sont stimulées par l'angiotensine, la noradrénaline, la vasopressine, la thrombine, les facteurs de croissance ou d'autres stimuli (Schiffrin et Touyz, 1998). L'action de l'angiotensine sur les CMLV n'est pas dépendante de la production d'endothéline par les cellules endothéliales ou musculaires lisses vasculaires (Schiffrin, 2003). La production d'ET-1 peut être inhibée par certains stimuli

tels le monoxyde d'azote ou les peptides natriurétiques (Marasciulo *et al.*, 2006).

1. Récepteurs et signalisation transmembranaire

À ce jour, deux récepteurs à l'endothéline ont été identifiés et clonés : ET_A et ET_B . Ce sont des RCPG. Le récepteur ET_A est présent dans plusieurs types cellulaires et en abondance dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Le récepteur ET_B est aussi exprimé dans les cellules du muscle lisse vasculaire, mais d'une manière beaucoup plus faible. ET_B est toutefois reconnu pour son rôle dans les cellules endothéliales où il n'y a pas de récepteur ET_A . Ainsi dans les cellules endothéliales, le récepteur ET_B joue un rôle dans la régulation de la relâche de NO (figure 5). ET_B est aussi exprimé dans d'autres types cellulaires seul ou avec ET_A (Marasciulo *et al.*, 2006; Bouallegue *et al.*, 2007).

Pour étudier l'action de l'ET-1, les antagonistes du récepteur ET_A (par exemple BQ-123) et les antagonistes du récepteur ET_B (par exemple BQ-788) sont utilisés. En 1991, une équipe de chercheurs japonais a modifié la toxine de *Streptomyces Misakiensis* qui possède une faible activité pour le récepteur ET_A . Les produits modifiés obtenus sont des pentapeptides cycliques dont celui ayant la plus grande affinité et spécificité pour le récepteur ET_A est le BQ-123. Aucune activité agoniste résiduelle ne lui a été attribuée (Ihara *et al.*, 1991). Le BQ-123 est aujourd'hui commercialisé et utilisé à grande échelle dans la recherche scientifique.

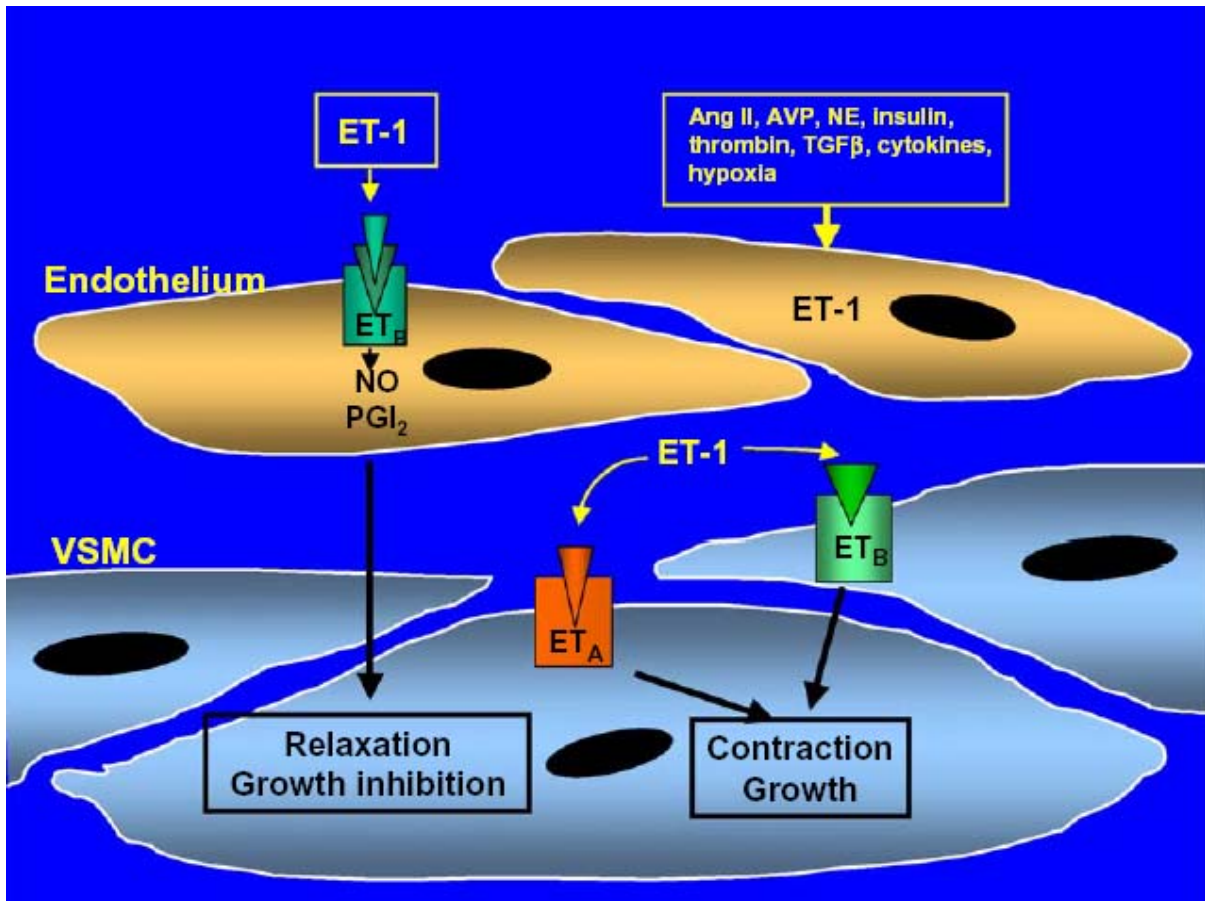


Figure 5. Les récepteurs à l'endothéline dans les structures vasculaires.

Schiffrin EL, Vascular endothelin in hypertension. *Vascul.Pharmacol.* 43: 19-29, 2005.

Abréviations : AngII, angiotensine ; AVP, vasopressine ; ET-1, endothéline ; ET_A, récepteur à l'endothéline A ; ET_B, récepteur à l'endothéline B ; NE, noradrénaline ; NO, monoxyde d'azote ; PGI₂, prostacycline ; VSMC, cellules musculaires lisses vasculaires

Explication : L'ET-1 est produite par les cellules endothéliales et relâchée vers les CMLV. L'ET-1 induit la contraction des CMLV et leur prolifération. Toutefois, lorsque l'endothéline stimule les cellules endothéliales, celles-ci relâche du monoxyde d'azote qui entraîne une vasodilatation.

En se basant sur la relation entre la structure et l'activité de BQ-123, un tripeptide a été identifié comme ayant potentiellement une activité antagoniste spécifique au récepteur ET_B . Suite à des modifications et des essais, un antagoniste efficace et sélectif à ET_B a été trouvé, le BQ-788 qui comme BQ-123 est utilisé et commercialisé à grande échelle (Ishikawa *et al.*, 1994).

2. Signalisation intracellulaire

a) Adénylate cyclase

En stimulant les CMLV avec l'ET-1, Eguchi *et al.* (1993) ont observé une augmentation d'AMPc intracellulaire. Comme cette augmentation est inhibée par BQ-123, mais n'est pas augmentée par la toxine choléra, on en déduit que, dans les CMLV, le signal de ET_A est relayé par Gas. Une fois activée, Gas stimule l'activité de l'adénylate cyclase qui convertit l'ATP en AMPc. En raison du haut niveau d'AMPc, la PKA est activée (Cooper, 1999). Toutefois, comme montré précédemment, d'autres mécanismes peuvent influencer l'activité de l'adénylate cyclase, comme le Ca^{2+} intracellulaire qui inhibe l'adénylate cyclase.

b) Endothéline et les phosphatidyls inositols

L'activation du récepteur ET_A mène à la formation de DAG et d'IP₃, ce qui indique une activation de la PLC (Eguchi *et al.*, 1992). La PLC étant

normalement activée par la protéine $G_{\alpha q/11}$, ET_A devrait être lié à $G_{\alpha q/11}$ (Bouallegue *et al.*, 2007). L'ET-1 augmente la concentration de Ca^{2+} dans les CMLV (Weber *et al.*, 1994; Miwa *et al.*, 1999). L' IP_3 entraîne la relâche de Ca^{2+} dans la cellule (Neylon, 1999; Smith *et al.*, 2003). Toutefois, les expériences de Bkaily *et al.* (2008) indiquent que l'augmentation de Ca^{2+} induite par l'ET-1 est inhibée par un traitement avec les toxines pertussis ou choléra. De plus, l'activateur de PKC (phorbol-12,13-dibutyrate) et l'inhibiteur de PKC (bisindolylmaleimide) n'ont pas affecté la hausse de Ca^{2+} induite par l'ET-1, ce qui indique un rôle pour les protéines Gas ou Gai plutôt que pour la PKC. Il s'agit peut-être d'une différence inter-espèces puisque les études d'Eguchi *et al.* (1992) ont été réalisées sur des rats et celles de Bkaily *et al.* (2008) sur des humains. Le Ca^{2+} intracellulaire engendre la contraction des CMLV (Neylon, 1999) et, avec le DAG, active la PKC (Sirous *et al.*, 2001; Bouallegue *et al.*, 2007) (figure 6).

c) *Endothéline et les espèces réactives oxygénées*

Le blocage du récepteur ET_A réduit la formation d'ERO dans les CMLV de plusieurs modèles d'hypertension (Li *et al.*, 2003; Daou et Srivastava, 2004; Callera *et al.*, 2006). Dans les CMLV des rats DOCA-sel, dont l'hypertension est dépendante de l'ET-1 (Callera *et al.*, 2003), l'activité de la NADPH oxydase, de la xanthine oxydase et des mitochondries est augmentée (Callera *et al.*, 2006). Toutefois, l'expression des sous-unités $p22^{phox}$ et $p47^{phox}$ ainsi que l'activité de la NADPH oxydase ne sont pas réduites par le blocage

de ET_A (Touyz, 2004; Callera *et al.*, 2006). Les ERO induites par l'ET-1 sont donc principalement indépendantes de la NADPH oxydase. Les mitochondries génèrent la plus grande partie des ERO dans les CMLV, à la suite d'une stimulation de ET_A (Callera *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008). Les ERO peuvent agir sur les voies de signalisation et aussi comme mécanismes de signalisation (Blanc *et al.*, 2003). L'origine des ERO peut influencer leur nature et par conséquent leur action (Blanc *et al.*, 2003; Bassil *et al.*, 2008). Dans les CMLV, l'ET-1 ne peut induire l'activation de ERK 1/2, PKB ou Pyk2 lorsque les ERO sont inhibées par des anti-oxydants (Daou et Srivastava, 2004). Dans les fibroblastes, la formation d'ERO est nécessaire à l'activation de récepteurs tyrosines kinases tel que EGF-R (Chen *et al.*, 2006).

d) Endothéline et les tyrosines kinases

D'autres peptides vasoactifs comme l'angiotensine sont reconnus pour leur capacité à transactiver certaines tyrosines kinases (réceptrices et non-réceptrices) (Berk et Corson, 1997; Eguchi et Inagami, 2000). Comme plusieurs indices laissent penser que l'Ang-II et l'ET-1 partagent plusieurs mécanismes de signalisation intracellulaire, on peut se demander si ET-1 transactive les récepteurs aux facteurs de croissance dans les CMLV (Weber *et al.*, 1994). Daub *et al.* (1996) ont démontré que EGF-R était transactivé après une stimulation du récepteur ET_A dans les fibroblastes et, par la suite, d'autres ont démontré le même phénomène dans d'autres types cellulaires (Cheng-Hsien *et al.*, 2006). Il a été établi que la stimulation de CMLV de rats

normotendus par l'ET-1 induit la transactivation de EGF-R (Iwasaki *et al.*, 1999). Cette transactivation fut inhibée par un antagoniste d'ET_A et par un « antagoniste du calcium intracellulaire » mais non pas par un antagoniste d'ET_B ou de la PKC (Iwasaki *et al.*, 1999). Les métalloprotéases, qui jouent un rôle important dans la transactivation des facteurs de croissance par des RCPG (Hao *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005), sont activées par la stimulation du récepteur ET_A (Ergul *et al.*, 2003).

e) Endothéline et les MAPKinases

L'activation des récepteurs ET_A induit la phosphorylation de p42/p44 MAPK dans les CMLV des rats normotendus (Weber *et al.*, 1994; Shichiri *et al.*, 2000; Daou et Srivastava, 2004; Bouallegue *et al.*, 2007). Cette phosphorylation est dépendante de la transactivation du récepteur au facteur de croissance EGF dans les CMLV de rats (Iwasaki *et al.*, 1999). L'activation de ERK ½ induite par l'ET-1 assure l'effet antiapoptotique de ET-1 sur les CMLV (Guo *et al.*, 1996; Shichiri *et al.*, 2000).

f) Endothéline dans l'hypertension

Les concentrations d'endothéline dans le sang ne sont supérieures à la normale que dans quelques types d'hypertension (Schiffrin, 1995; Schiffrin et Touyz, 1998; Schiffrin, 2005; Hynynen et Khalil, 2006). On observe toutefois une plus grande expression de l'ARNm de ET-1 dans l'endothélium des artères de résistance dans le cas d'hypertension sévère. La sécrétion d'ET-1

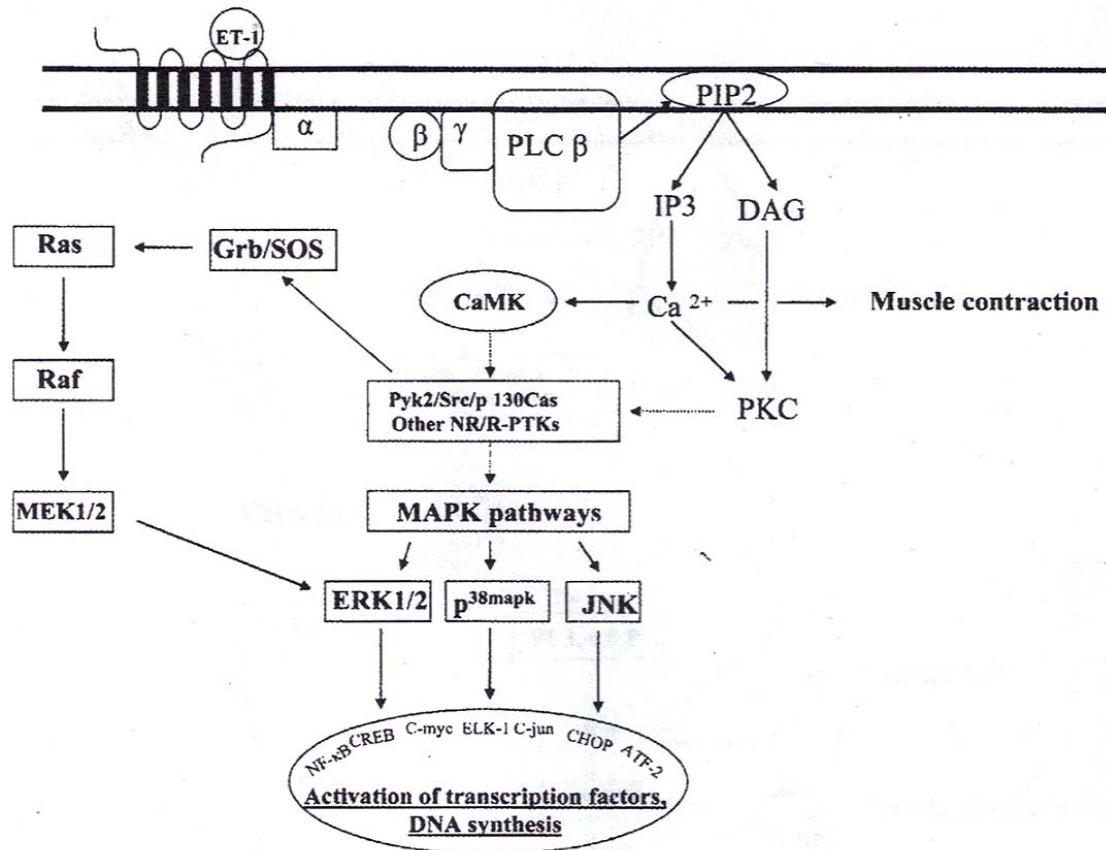


Figure 6 . Voies de signalisation activées par l'endothéline

Bouallegue, A., G. B. Daou, et A. K. Srivastava. 2007. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 5:45-52.

Abréviations : ET-I, endothéline-1; PLC β, phospholipase C; PIP2, phosphatidylinositol biphosphate; IP3, inositol triphosphate; DAG, diacylglycérol; Ca²⁺, calcium; PKC, protéine kinase C; CaMK, calmoduline;

par l'endothélium étant dirigée vers les CMLV et la dégradation de l'ET-1 dans le sang étant très rapide, les concentrations plasmatiques d'ET-1 ne sont pas représentatives de son rôle (Schiffrin, 1995). L'ET-1 est surexprimée dans la paroi artérielle lors de certains types d'hypertension seulement. Chez l'humain, l'ET-1 est surexprimée dans les cas d'hypertension reliés au sel, à l'obésité et à la résistance à l'insuline (Touyz et Schiffrin, 2003). Les modèles animaux, où on observe une surexpression d'ET-1, sont DOCA-sel, les rats Dahl sensibles au sel, les rats infusés à l'AngII et l'hypertension rénovasculaire 1 rein 1 clip. Toutefois, l'expression d'ET-1 est normale dans la paroi vasculaire des modèles d'hypertension SHR et L-NAME (Schiffrin, 1998; Hynynen et Khalil, 2006). Par contre, Lu et al. (2006) ont montré que l'ET-1 endogène aux CMLV stimulait la prolifération des CMLV de SHR.

3. Action physiologique

L'endothéline induit une élévation de la PA par la vasoconstriction des artères. C'est un des vasoconstricteurs les plus puissants connus à ce jour (Watanabe *et al.*, 1989). Indépendamment de l'élévation de la PA, l'ET-1 est capable d'induire un remodelage hypertrophique des vaisseaux du réseau vasculaire *in vivo*. Ce remodelage vasculaire est dit hypertrophique, car il entraîne un épaissement de la couche musculaire lisse et une réduction de la lumière des vaisseaux (Hynynen et Khalil, 2006).

La prolifération et l'hypertrophie des CMLV sont deux processus importants dans le remodelage vasculaire associé à l'hypertension essentielle. La stimulation des CMLV normales par l'ET-1 induit la synthèse protéique associée à l'hypertrophie (Iwasaki *et al.*, 1999; Daou et Srivastava, 2004). L'induction de cette synthèse protéique est dépendante de la production de ERO et de l'activation de EGF-R et ERK $\frac{1}{2}$. L'ET-1 induit aussi la synthèse d'ADN dans les CMLV (Weber *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1996; Rosen *et al.*, 1999; Hashim *et al.*, 2006). Cette synthèse d'ADN, qui permet de mesurer la prolifération des CMLV, est dépendante de ERK $\frac{1}{2}$ (Weber *et al.*, 1994 ; Guo *et al.*, 1996 ; Rosen *et al.*, 1999 ; Hashim *et al.*, 2006).

D. Facteurs de croissance

1. Récepteurs tyrosines kinases

Les récepteurs des facteurs de croissance font partie de la famille des récepteurs tyrosines kinase (RTK). Ce sont généralement des monomères composés d'une seule chaîne peptidique, mais certains se retrouvent sous forme d'homodimères ou composés de deux chaînes peptidiques rattachées par des liens disulfures. Les RTK ont tous en commun un domaine N-terminal extracellulaire responsable de la liaison au ligand, une seule hélice alpha transmembranaire et un domaine C-terminal cytosolique avec une activité tyrosine kinase (Cooper, 1999). Dans les cas de récepteurs monomères comme le récepteur EGF-R, la liaison avec le ligand s'accompagne d'une dimérisation puis d'une autophosphorylation des résidus

tyrosines dans la portion cytosolique (Cochet *et al.*, 1988). Grb2 est recruté par le récepteur EGF-R lors de son activation. La protéine Grb2 possède un domaine Src homology 2 (SH 2), celui-ci vient se connecter sur les séquences phosphotyrosines. Grb2 est généralement associé à une autre protéine appelée SOS (Margolis et Skolnik, 1994; Rao, 1996; Cooper, 1999). Dans son état inactif, la protéine SOS est normalement liée à Grb2. Une fois active, la protéine SOS peut activer la protéine Ras (Margolis et Skolnik, 1994). L'activation de Ras permet la transduction du signal du récepteur EGF-R à la voie des MAPK (Cooper, 1999). La voie des MAPK/ERK $\frac{1}{2}$ et la voie de PI3K/AKT peuvent être activées par EGF-R (figure 7) (Mehta et Griendling, 2007). Dans les CMLV, il est bien établi que EGF-R peut activer les MAPK/ERK $\frac{1}{2}$ (Rao, 1996; Pierce *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2002). La phosphorylation de PDGF-R peut aussi mener à l'activation de p42/44 MAPK (Tallquist et Kazlauskas, 2004).

2. Les facteurs de croissance

Le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor ou EGF) a été isolé en 1962 (Cohen, 1983). Il a d'abord été reconnu comme promoteur de la croissance de tissus épithéliaux et épidermiques. Depuis, des récepteurs au EGF ont été trouvés dans une multitude de tissus, dont évidemment les CMLV. Le facteur de croissance épidermique est un peptide de 53 acides aminés (Savage, *et al.*, 1972). Les facteurs de croissance tels que le EGF sont présents en plus fortes concentrations dans les tissus cardio-

vasculaires d'individus hypertendus ou de modèles animaux d'hypertension (Fujino *et al.*, 1998). Ces facteurs de croissance ne régulent pas la PA à court terme. Toutefois, en stimulant la prolifération des CMLV et le remodelage vasculaire concentrique, ils peuvent, à long terme, avoir un rôle dans le déclenchement de l'hypertension.

3. Transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance

L'activation de tyrosines kinases a été démontrée comme nécessaire pour transmettre les signaux provenant de la stimulation des CMLV par l'AngII ou ET-1 (Daub *et al.*, 1996; Berk et Corson, 1997; Schmitz et Berk, 1997; Ishida *et al.*, 1998; Luttrell *et al.*, 1999; Eguchi et Inagami, 2000; Frank *et al.*, 2003). Suite à l'activation du récepteur AT₁ ou d'une stimulation par l'ET-1 des CMLV, les récepteurs aux facteurs de croissance EGF-R et PDGF-R, qui sont dimérisés et phosphorylés, transmettent leur signal (Margolis et Skolnik, 1994; Shichiri *et al.*, 2000; Pierce *et al.*, 2001; Touyz *et al.*, 2002; Voisin *et al.*, 2002; Sayeski et Ali, 2003; Gao *et al.*, 2006; Ohtsu *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2006). L'activation du récepteur EGF-R est causée par la relâche de son agoniste HB-EGF (Ohtsu *et al.*, 2006). Les mécanismes menant à la relâche du HB-EGF après l'activation de AT₁ sont encore sous études mais certains éléments ont été élucidés. La relâche du HB-EGF est dépendante de c-Src et influencée par le stress oxydatif (Belsches *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1998; Ushio-Fukai *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006). De plus, l'inhibition des métalloprotéases empêche la transactivation de EGF-R (Frank *et al.*, 2003;

Ohtsu *et al.*, 2006). La transactivation du récepteur PDGF-R se produit après une stimulation par l'AngII (Yin *et al.*, 2003). Malheureusement, les mécanismes menant à la transactivation de PDGF-R ne sont pas encore élucidés.

III. Mécanismes de signalisation intracellulaire

Les voies de signalisation intracellulaire sont comme des courroies de transmission entre les récepteurs et l'action cellulaire à déclencher. Ces actions vont de la contraction musculaire à la transcription de gènes en passant par l'apoptose et la survie cellulaire. Les voies de signalisation cellulaire sont beaucoup plus que de simples courroies de transmission. Les cascades de signalisation intracellulaire sont des amplificateurs et des intégrateurs puisqu'une petite quantité d'effecteurs peut avoir un gros impact et que la somme des différents signaux y est compilée.

A. La voie des MAPKs

La voie des MAPKs ou des kinases des protéines activées par les mitogènes (*mitogen-activated protein*) est constituée d'une série de cascades de signalisation intracellulaire. Ces cascades partagent une même organisation. Un signal stimule la kinase de la kinase de la MAPK (MAPKKK). Celle-ci active la kinase de la MAPK (MAPKK). Finalement, la MAPKK active la MAPK qui elle agit sur la transcription des gènes. Il y a au moins 5 cascades MAPK identifiées à ce jour. Ce sont les MAPK ERK ½,

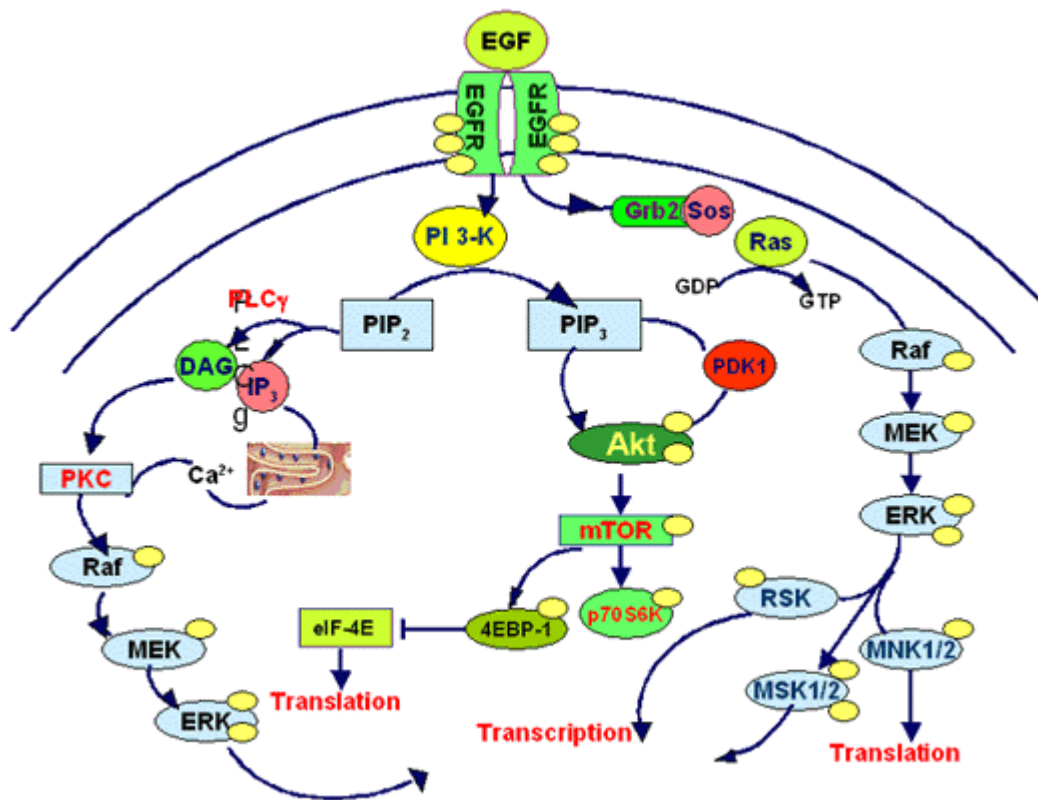


Figure 7. Voies de signalisation activées par la phosphorylation du récepteur EGF-R

Calbiochem, (2008)

http://www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/inhibitorselect_EGFR_signaling_pathway_inhibitor_panel.html

Abréviations : DAG, diacylglycérol; EGF, *epidermal growth factor*; EGF-R, *epidermal growth factor receptor*; ERK 1/2, MAPK; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIP₂, phosphatidylinositol biphosphate; PIP₃, phosphatidylinositol triphosphate; Akt, ; MEK, MAPKK; mTOR, *mammalian target of rapamycine*; DAG, diacylglycérol; IP₃, inositol triphosphate, PKC, protéine kinase C; Raf, MAPKKK

Explication : Lorsque EGF se lie au récepteur EGF-R, celui-ci se dimérise. Le signal est ensuite relayé par différents intermédiaires (comme PLC_γ ou Grb2) pour activer des voies comme celles des MAPK. Les MAPK (ERK) stimulent la survie cellulaire et la prolifération.

JNK1-3, p38, ERK 5 et ERK 3 (Brown et Sacks, 2008). Ces cascades de signalisation régulent une grande variété d'activités cellulaires telles la survie, la prolifération, la migration, la différenciation et même l'apoptose. Les MAPK JNK 1-3 et p38 sont reconnues comme étant généralement pro-apoptotiques alors que ERK ½ est souvent étudié pour son action anti-apoptotique et mitogénique (Brown et Sacks, 2008).

1. La cascade de MEK/ERK

Cette cascade est connue sous plusieurs noms, dont p42/44 MAPK, ERK 1/2, MEK/ERK. Il existe plusieurs mécanismes d'activation de cette voie, mais la plus connue est celle qui passe par l'activation de certains récepteurs tyrosines kinases tels les récepteurs aux facteurs de croissance. Tel que vu précédemment, lorsque le récepteur d'un facteur de croissance tel que EGF-R est activé, plusieurs phosphorylations surviennent pour mener à l'activation de la protéine Ras (Rao, 1996). Celle-ci possède une activité GTPase. La protéine Ras peut donc hydrolyser le GTP en GDP. Ras ne peut être activée et transmettre le signal que lorsqu'elle est liée au GTP. Certaines protéines peuvent modifier l'activité GTPase de Ras. Le signal provenant de EGF-R peut être modulé par les protéines favorisant l'hydrolyse du GTP, les facteurs favorisant l'échange de GDP pour du GTP et la quantité de GTP disponible (Accorsi *et al.*, 2001).

La protéine Ras liée au GTP recrute et active la MAPKKK Raf. Raf active et phosphoryle MEK ½ (MAPK/ERK kinase 1 et 2) sur les résidus

thréonine et tyrosine. Par la suite, la MAPKK MEK $\frac{1}{2}$ active ERK $\frac{1}{2}$ (*extracellular regulated kinase* 1 et 2). Une fois activé, ERK devient un dimère pour se déplacer vers le noyau ou pour activer des cibles cytosoliques (figure 7). ERK $\frac{1}{2}$ est constitué de 2 isoformes, soit ERK 1 et ERK 2 qui sont aussi appelés p42 et p44 (Cooper, 1999; Brown et Sacks, 2008) (figure 7). Les MAPK sont régulées par les MAPK phosphatases (MKP) qui désactivent les MAPK (Kondoh et Nishida, 2007).

Dans les CMLV, ERK est impliqué dans plusieurs processus cellulaires. Premièrement, l'activation de ERK $\frac{1}{2}$ promeut le remodelage vasculaire. ERK $\frac{1}{2}$ stimule deux aspects du remodelage vasculaire associés à l'hypertension. Ces deux aspects sont la prolifération et la migration des CMLV (Graf *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 1999).

IV. Objectifs

La couche musculaire lisse des artères subit un important remodelage vasculaire lors de l'hypertension essentielle. La première étape dans notre étude des CMLV de rats WKY et SHR a été de nous assurer que, comme pour le remodelage vasculaire, le taux de prolifération des CMLV de rats WKY était différent, *in vitro*, de celui des CMLV de rats SHR. Ceci étant confirmé, les mécanismes sous-jacents à la prolifération accrue des CMLV de SHR sont devenus intéressants à étudier. Notre étude a tenté de déterminer si l'AngII et l'ET-1 endogènes ont un rôle dans la prolifération CMLV de rats SHR et WKY. L'importance des facteurs de croissance EGF, IGF-1 et PDGF endogènes dans la prolifération des CMLV de rats SHR et WKY *in vitro* a aussi été étudiée.

Sachant que la transactivation de EGF-R est un mécanisme dans la prolifération des CMLV, l'impact des peptides vasoactifs endogènes sur la phosphorylation du récepteur EGF-R a été étudié par une analyse western. De plus, connaissant l'importance de l'activation des MAPK sur la prolifération des CMLV, l'impact de ces facteurs endogènes sur la voie des MAPkinases a également été étudié par immunobuvardage.

Pour déterminer si la phosphorylation de EGF-R est essentielle à la prolifération induite par l'ET-1 et l'AngII ou si l'ET-1 et l'AngII peuvent directement induire la phosphorylation des MAPK, ces travaux ont analysé la

capacité de l'ET-1 et l'Ang-II à induire la phosphorylation de ERK 1/2 et EGF-R en présence et absence de l'inhibiteur de EGF-R. De plus, l'impact de l'inhibiteur de EGF-R sur la prolifération induite par l'ET-1 et l'AngII a aussi été étudié.

Chapitre 2

Implication of endogenous vasoactive peptide-induced growth factor receptor transactivation in enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats.

Louis-Olivier Lévesque, Yuan Li and Madhu B. Anand-Srivastava

Département de Physiologie and Groupe de recherche sur le système nerveux autonome (GRSNA)

Université de Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

(soumis à Cardiovascular Research)

Implication of endogenous vasoactive peptide-induced growth factor receptor transactivation in enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats.*

Louis-Olivier Lévesque, Yuan Li and Madhu B. Anand-Srivastava **

Department of Physiology, Faculty of Medicine

University of Montreal.

Correspondence should be sent to:

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava
Department of Physiology
Faculty of Medicine
University of Montreal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7

Tel : (514) 343-2091

Fax : (514) 343-2111

ABSTRACT

OBJECTIVE. We have recently shown that vasoactive peptides such as angiotensin (Ang II), endothelin (ET-1) and arginine-vasopressin (AVP) increased the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC). Since the levels of Ang II and ET-1 are increased in hypertension, the present studies were undertaken to examine if these endogenous vasoactive peptides contribute to the enhanced proliferation of VSMC in spontaneously hypertensive rats (SHR) and to further investigate the underlying mechanisms responsible for enhanced proliferation. **METHODS.** A10 VSMC and aortic VSMC from 12 week old SHR and age-matched WKY rats were used for these studies. Cell proliferation was determined by [³H]thymidine incorporation and ERK1/2 and growth factor receptor phosphorylation was determined by Western blotting. **RESULTS** VSMC from SHR exhibited enhanced cell proliferation as compared to WKY as determined by enhanced [³H]thymidine incorporation which was attenuated by Ang II AT1 receptor antagonist losartan, as well as by endothelin receptor ETA and ETB antagonists BQ123 and BQ788 respectively. The inhibitors of platelet derived growth factor receptor (PDGF-R); AG1295, epidermal growth factor receptor (EGF-R); AG1478 and insulin-like growth factor receptor (IGF-R); AG1024 also attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR to WKY control levels. In addition, VSMC from SHR exhibited enhanced phosphorylation of EGF-R as compared to WKY, which was attenuated by losartan, BQ123, BQ788, AG1478 and not by AG1024 and AG1295. Furthermore, the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from SHR was also attenuated by losartan, BQ123 and BQ788 as well as by growth factor receptor inhibitors, AG1478, AG1024 and AG1295. The implication of growth factor receptor transactivation in Ang II- and ET-

induced enhanced cell proliferation was also examined in A10 VSMC. AngII or ET-1-induced enhanced proliferation of A10 VSMC and enhanced ERK1/2 phosphorylation was also restored to control levels by EGF-R inhibitor. **CONCLUSIONS.** These data suggest that vasoactive peptide-induced growth factor receptor transactivation through MAP kinase signaling may contribute to the enhanced proliferation of VSMC from SHR.

KEY WORDS: Vasoactive peptides, AT1 receptors, ETA/ETB receptors, growth factor receptors, ERK1/2, VSMC, cell proliferation, SHR.

1. INTRODUCTION

Excessive vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation contributes to vascular remodelling that occurs in several vascular disease states including atherosclerosis, hypertension and diabetes^{1, 2}. It is widely recognized that vasoactive peptides including angiotensin II and endothelin regulate a variety of physiological functions including blood pressure, VSMC proliferation, cell differentiation and apoptosis^{3, 4}. We have recently demonstrated that Ang II, ET-1 and Arginine-Vasopressin (AVP) increased the proliferation of A-10 VSMC through MAP kinase/PI3 kinase pathway⁵.

Ang II elicits its physiological effects by interacting with at least two distinct receptor subtypes, designated as AT1 and AT2⁶. The presence of AT1 receptor subtype has been shown in rat vascular tissues, however, a small proportion of AT2 receptors are also present in rat aorta⁷. Most of the physiological effects of Ang II are mediated through the activation of AT1 receptors that are coupled to several signaling pathways including adenylyl cyclase/cAMP inhibition through $G_i\alpha$ proteins^{8, 9}, mitogen activated protein kinase (MAPK)¹⁰ and phosphatidylinositol turnover through $G_q/11\alpha$ ¹¹. On the other hand, ET-1 interacts with two receptor subtypes ET_A and ET_B . ET_A is coupled to $G_q/11\alpha$, G_{12}/G_{13} and G_i proteins leading to stimulation of phospholipase C/protein kinase C pathway, small RhoA and inhibition of adenylyl cyclase respectively¹²⁻¹⁴, whereas ET_B is coupled to G_q and G_i ,^{15, 16} however, in endothelial cells, its activation releases NO and results in vasorelaxation¹⁷. In addition, the activation of ET_A receptor also stimulates intracellular signaling pathways including MAPK/P13K which are similar to those activated by growth factor receptors that possess intrinsic protein tyrosine kinase

activity¹⁵. ET-1 as well as Ang II have also been reported to enhance the activation of growth factor receptors such as epidermal growth factor receptor (EGF-R), platelet derived growth factor (PDGF-R) and insulin-like growth factor (IGF-R) in a variety of cell types^{18, 19}, the phenomenon known as transactivation..

Hypertension is associated with enhanced cell proliferation²⁰⁻²². We²¹ and others^{20, 22, 23} have demonstrated that VSMC from spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit enhanced proliferation as compared to their age-matched WKY rats which was shown to be attributed to the enhanced expression of Gi α proteins. In addition, the levels of Ang II and ET-1 as well as growth factors have also been shown to be increased in hypertension²⁴⁻²⁶. Furthermore, endogenous Ang II has also been reported to augment the levels of several growth factors including transforming growth factor (TGF-B β 1), PDGF-AA and bFGF proteins in VSMC from SHR²⁷. Thus, taken together, it may be possible that the enhanced levels of endogenous vasoactive peptides and growth factors may contribute to hyperproliferation of VSMC from SHR. The present studies were therefore undertaken to investigate the role of endogenous vasoactive peptides and growth factors in the enhanced proliferation of VSMC from SHR and to examine if the transactivation of growth factor receptor by endogenous vasoactive peptides through the activation of MAPkinase signalling contribute to the enhanced proliferation of VSMC from SHR.

We showed that endogenous Ang II, ET-1 and growth factors such as PDGF, IGF and EGF may be responsible for the enhanced proliferation of VSMC in SHR and the transactivation of EGF-R by endogenous Ang II and ET-1 through AT₁, ET_A as well as ET_B receptor may contribute to the enhanced cell proliferation observed in SHR.

2. MATERIALS AND METHODS

Materials

The ET_A antagonist BQ123, the ET_B antagonist BQ788, the EGF-R inhibitor AG1478, the IGF1-R inhibitor AG1024 and the PDGF-R inhibitor AG1295 were purchased from Calbiochem (La Jolla, California, USA). The antibodies pEGFR (Tyr 1173) (goat polyclonal phosphospecific-tyrosine¹¹⁷³), EGFR (1005), p-ERK (E-4) (monoclonal phosphospecific-tyrosine²⁰⁴), ERK 2 (C-14) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). All other chemicals used in these experiments were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).

2.1 *Cell culture*

A-10 cell line from embryonic thoracic aorta of rat was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MA). VSMC from 12-week-old SHR and their age-matched WKY rats were cultured from aortas as described previously²⁸. The purity of the cells was checked by immunofluorescence technique using α -actin as described previously²⁹. These cells were found to contain high levels of smooth muscle-specific actin. The cells were plated in 75 cm² flasks and incubated at 37 °C in 95% air and 5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, L-glutamine and sodium bicarbonate) containing antibiotics and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). The cells were passaged upon reaching confluence with 0,5% trypsin containing 0,2% EDTA and utilized between passages 5 and 15. Confluent cell cultures were starved by incubation for 24 h in DMEM without FBS at 37 °C to reduce the interference by growth factors present in the serum.

2.2 *Cell lysis and immunoblotting*

For immunoblotting, VSMC from SHR and WKY rats were incubated in the absence or presence of vasoactive peptide antagonists or growth factors receptor inhibitors (10^{-6} M) for 30 min. A-10 VSMC were incubated in absence or presence of growth factor inhibitors for 30 min (10^{-6} M) and then treated with vasoactive peptides for 5 min (10^{-7} M). After treatment, cells were then washed twice with ice- cold phosphate-buffered saline and lysed in 100 μ l buffer (25 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 25 mmol/l NaCl, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 10 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l sodium pyrophosphate, 2 mol/l benzamidine, 2 mmol/l ethylenebis(oxyethyleninitrolo)-tetraaceticacid, 2mmol/l EDTA, 1mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 0.5 μ g/ml leupeptin) on ice. The cell lysates were centrifuged at $12000\times g$ for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. Supernatants were used for immunoblotting.

Immunoblotting of ERK $\frac{1}{2}$ and EGF-R was performed by using specific antibodies as described previously³⁰. After SDS-PAGE, the separated proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose paper with a semi-dry transblot apparatus (Bio- Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) at 15 V for 45 min for medium molecular weight protein (<100 kDa) and liquid transfer with transfer buffer (19g tris-base, 77,5 glycine, 200 ml methanol and 800 ml H₂O) at 80 V for 90 min for high molecular weight protein (>100 kDa). After transfer, the membranes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and were incubated in PBS containing 5% dehydrated milk at room temperature for 2 h. The blots were then incubated with respective primary antibodies; monoclonal phosphospecific Tyr¹¹⁷³EGF-R for pEGF-R, 1005 for EGF-R, monoclonal phosphospecific Tyr²⁰⁴ERK1/2 for pERK1/2 and C-14 for ERK1/2 in PBS and 0.1%

Tween-20 at room temperature for 2 h. The antibody–antigen complexes were detected by horseradish peroxidase-conjugated second antibody and protein bands were visualized by enhanced-chemiluminescence Western-blotting detection reagents from Amersham as described previously³⁰. Quantitative analysis of specific bands was performed by densitometric scanning of the autoradiographs with an enhanced laser densitometer (LKB Ultrosan XL, Pharmacia, Dorval, Quebec) and quantified using gelscan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia.

2.3 *[Methyl-³H]thymidine incorporation*

DNA synthesis was evaluated by incorporation of [³H]thymidine into cells as described earlier⁵. Subconfluent VSMC were plated in 6-well plates for 24 h and were serum deprived for 24 h to induce cell quiescence. The A-10 cells were then incubated with ANG II or ET-1 (10⁻⁷ M) alone or with growth factor receptor inhibitors (10⁻⁶ M) for 24 h. The VSMC from SHR and WKY rats were incubated in the presence or absence of growth factor receptor inhibitors; AG1478, AG1295, AG1024 (10⁻⁶M) or vasoactive peptide antagonists losartan, BQ123 or BQ788 (10⁻⁶ M) for 24 h. [³H]thymidine (1μCi) was added and further incubated for 4 h before the cells were harvested. The cells were rinsed twice with ice-cold PBS and incubated with 5% trichloroacetic acid for 1 h at 4°C. After being washed twice with ice-cold water, the cells were lysed with 0.4 N sodium hydroxide for 30 min at room temperature. Radioactivity of the sodium hydroxide was determined by liquid scintillation counter. Cell viability was checked with the trypan blue exclusion technique.

2.4 *Statistical analysis*

Results are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were made with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. Results were considered significant at a value of $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 *Effect of the antagonists of the vasoactive peptides receptor on SHR and WKY cell proliferation*

VSMC from SHR have been shown to exhibit enhanced proliferation²². Since the levels of vasoactive peptides such as Ang II or ET-1, that have been reported to enhance the proliferation of VSMC⁵, are upregulated in hypertension^{24, 25}, it may be possible that these endogenous vasoactive peptides may contribute to the enhanced proliferation of VSMC in SHR. To test this possibility, we examined the effects of Ang II and ET-1 receptor antagonists on cell proliferation of VSMC from SHR and WKY rats and the results are shown in Fig 1. As reported earlier²¹, VSMC from SHR exhibited enhanced proliferation as compared with WKY (~ 100% increase) as determined by [3H] thymidine incorporation which was significantly attenuated by about 50% by AT₁ receptor antagonist losartan. On the other hand, losartan did not have any effect on the proliferation in VSMC from WKY. In addition, endothelin receptor ET_A and ET_B antagonists BQ123 and BQ788 respectively also attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR by 70% and 50% respectively, whereas these antagonists did not reduce the proliferation of VSMC from WKY rats.

3.2 *Effects of the growth factor receptor inhibitors on VSMC proliferation*

The levels of growth factors that promote the proliferation of VSMC have been reported to be increased in SHR²⁶. To examine the role of endogenous growth factors in the enhanced cell proliferation of VSMC from SHR, the effect of growth factor receptor inhibitors on DNA synthesis was investigated in VSMC from SHR and WKY rats. The results shown in Fig. 2 indicate that the enhanced (~ 80%) proliferation of VSMC from

SHR as compared to WKY was restored towards control WKY level by AG1478, EGF-R inhibitor, AG1024, IGF-R inhibitor and AG1295, PDGF-R inhibitor, suggesting the implication of endogenous growth factor receptors in enhanced proliferation of VSMC from SHR. In addition, these growth factor receptor inhibitors inhibited the basal proliferation of VSMC from WKY rats.

3.3 Implication of endogenous vasoactive peptides in enhanced ERK1/2 phosphorylation

We have recently reported the implication of ERK1/2 in enhanced proliferation of VSMC induced by Ang II and other vasoactive peptides⁵. Since VSMC from SHR have been shown to exhibit enhanced levels of vasoactive peptides^{24, 25} and enhanced phosphorylation of ERK1/2^{21, 30}, it was of interest to examine if the enhanced ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR is attributed to the enhanced levels of endogenous vasoactive peptides. To test this, we examined the effect of losartan, BQ123 and BQ788 on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR and the results are shown in Fig. 3. ERK1/2 phosphorylation was significantly enhanced (~ 60%) in VSMC from SHR as compared to WKY control rats and this enhanced phosphorylation was restored towards control levels by losartan, BQ123 and BQ788 suggesting the implication of AT₁, ET_A and ET_B receptor in enhanced ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR.

In addition, to implicate the role of growth factor receptors in enhanced ERK1/2 phosphorylation in SHR, we also examined the effect of EGF-R, PDGF-R and IGF-R inhibitors on ERK1/2 phosphorylation. The results shown in Fig. 4 indicate that these inhibitors were also able to restore the enhanced phosphorylation to control levels.

3.4 Role of vasoactive peptides in transactivation of EGF-R in VSMC from SHR

Vasoactive peptides are known to transactivate different growth factor receptors in many cell types including VSMC^{18,19}. Since both endogenous vasoactive peptides such as ET-1 and Ang II and growth factor receptors contribute to the enhanced proliferation of VSMC from SHR, it was of interest to examine if the enhanced proliferation induced by endogenous vasoactive peptides is mediated through the transactivation of growth factor receptor. To test this, the effect of losartan, BQ123 and BQ788 on the phosphorylation of EGF-R was examined in VSMC from SHR. As shown in Fig. 5 the phosphorylation of EGF-R was enhanced by about 80% in VSMC from SHR compared to VSMC from WKY rats. The enhanced phosphorylation was restored to control WKY levels by losartan, BQ123, BQ788 as well as by AG1478. These results suggest that endogenous ET-1-and Ang II-induced enhanced proliferation of VSMC of SHR may be mediated through the transactivation of EGF-R. In addition, AG1478, EGF-R, inhibitor, also restored the enhanced phosphorylation to control levels, whereas inhibitors of PDGF-R and IGF-R did not have any effect on the phosphorylation of EGF-R (fig.6). These results suggest the specificity of the EGF-R inhibitor.

3.5 Implication of EGF-R in endothelin-1 and angiotensin II-induced proliferation of A10 VSMC

Since the enhanced proliferation of VSMC of SHR was attributed to endogenous Ang II and ET-1-induced transactivation of EGF-R, it was of interest to examine if vasoactive peptide-induced enhanced proliferation of A10 VSMC is also mediated through EGF-R transactivation. To test this, the effect of EGF-R inhibitor; AG1478 was examined on ET-1 and Ang II-induced proliferation of A10 VSMC. As shown in Fig. 7A, endothelin increased the [³H]thymidine incorporation in a concentration-dependant

manner. The maximal proliferation (~ 75%) was observed at 10^{-7} M. The treatment of A10 cells with EGF-R inhibitor attenuated the proliferation by about 50%. Similarly, Ang II also increased the cell proliferation in a concentration-dependent manner (Fig. 7B). The maximal proliferation observed was about 130% at 10^{-7} M. Prior treatment of VSMC with EGF-R inhibitor completely attenuated the Ang II-induced increased proliferation. These results suggest that ET-1- as well as Ang II-induced increased proliferation of VSMC may be attributed to the transactivation of EGF-R.

3.6 *Ang II- and ET-1-induced enhanced phosphorylation of EGF-R.*

Since endogenous Ang II-and ET-1 transactivate the growth factor receptors in VSMC from SHR, it was of interest to test if the treatment of A-10 VSMC with Ang II and ET-1 could also transactivate the EGF-R. Results shown in Fig. 8 indicate that Ang II and ET-1 enhanced the phosphorylation of EGF-R by about 50% which was almost completely restored to control levels by AG1478.

3.7 *Implication of EGF-R in ET-1 and Ang II-induced enhanced phosphorylation of ERK1/2*

To further investigate if Ang II- or ET-1-induced enhanced phosphorylation of ERK1/2 is also attributed to the growth factor receptor transactivation, the effect of AG1478; EGE-R inhibitor was examined on Ang II and ET-1-induced enhanced ERK1/2 phosphorylation. The results shown in Fig. 9 indicate that the treatment of A10 cells with Ang II or E-1 increased the ERK1/2 phosphorylation by ~25%, which was almost completely attenuated by AG1478. These results suggest that both ET-1 and Ang II-

induced activation of EGF-R that stimulates MAP kinase signaling may contribute to the enhanced proliferation of VSMC.

4. DISCUSSION

Vascular remodelling that contributes to the pathophysiology of vascular diseases including hypertension, is associated with alteration in VSMC growth, hypertrophy etc. We and others reported earlier that VSMC from SHR exhibit exaggerated cell growth (proliferation) compared to VSMC from WKY rats²⁰⁻²². The enhanced proliferation of VSMC from SHR was shown to be attributed to the enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins, because the treatment of VSMC from SHR with pertussis toxin that inactivates $G_{i\alpha}$ proteins resulted in the restoration of enhanced proliferation to control WKY levels²¹. However, in the present study, we report for the first time that endogenous vasoactive peptides such as Ang II and ET-1 through the transactivation of growth factor receptors may contribute to the enhanced proliferation of VSMC from SHR.

The role of vasoactive peptides in the proliferation of VSMC has been well documented^{5, 23}. We recently reported that Ang II, ET-1 and arginine-vasopressin (AVP) increased the proliferation of A-10 VSMC via $G_{i\alpha}$ /MAP kinase pathways⁵. In addition, Ang II treatment of VSMC from SHR was shown to enhanced the proliferation, to a greater extent compared to VSMC from WKY, which was attenuated by Ang II AT_1 receptor antagonist losartan indicating the implication of AT_1 receptor in the enhanced proliferation of VSMC from SHR³¹.

We demonstrate that blockade of AT_1 , ET_A and ET_B receptors by losartan; an AT_1 receptor antagonist, BQ123; an ET_A receptor antagonist and BQ788; an ET_B receptor antagonist, attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR. These results suggest that the autocrine effects of AngII and ET-1 through the activation of AT_1 , ET_A and ET_B receptors respectively may contribute to the hyperproliferation of VSMC from

SHR. Our results are in agreement with the studies of other investigators who also reported the role of endogenous vasoactive peptides in the enhanced proliferation of VSMC from SHR³²⁻³⁶. Kubo et al.³² showed that DNA synthesis in aortic VSMC from 10 week old SHR was significantly enhanced as compared with VSMC from WKY and was attenuated by AT₁ receptor antagonist (CV-11974) as well as by delapril, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. These data suggest that VSMC from SHR synthesize Ang II that promotes the proliferation in an autocrine manner. The autocrine role of ET-1 in the regulation of proliferation was also shown by the studies of various investigators³³⁻³⁶. Lu et al.³⁶ reported that VSMC in addition to endothelial cells could also synthesize and secrete ET-1. However, VSMC from SHR release more ET-1 and have a higher growth rate than VSMC from WKY when cultured in a serum free medium³⁶. In addition, Lu et al.³⁶ also showed that anti-ET-1 antibody as well as BQ123 and BQ788, ET_A and ET_B receptor antagonists, respectively attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR and suggested the contribution of endogenous ET-1 through ET_A as well as ET_B receptor in hyperproliferation of VSMC from SHR. Furthermore, the studies showing that thrombin-induced VSMC growth in WKY and SHR was attenuated by ET_A/ET_B receptor blockers further supports the autocrine effects of ET-1 in cell proliferation³⁶. The intracellular signaling mechanism by which endogenous AngII and ET-1 increased the cell proliferation in SHR VSMC appears to be through the activation of MAP kinase pathway, because losartan, BQ123 and BQ788, antagonists of AT₁, ET_A and ET_B receptors respectively that inhibited enhanced proliferation also attenuated the enhanced phosphorylation of ERK1/2. In this regard, the

implication of MAP kinase signalling in the regulation of cell proliferation by vasoactive peptides is well documented^{37, 38}.

VSMC have been shown to express various growth factors which promote cell proliferation^{27,39, 40}. We showed that the inhibition of growth factor receptors PDGF-R, IGF-R and EGF-R by AG1024, AG1295 and AG1478 respectively attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR. These data suggest that the endogenous growth factors PDGF, IGF-1 and EGF which are upregulated in VSMC from SHR may also contribute to the hyperproliferation of VSMC from SHR through the activation of respective receptors. Hamet et al.⁴⁰ showed the implication of TGF- β in increased DNA synthesis in VSMC from SHR. Furthermore, the studies showing that the deletion of TGF- β by antisense oligonucleotide complementary to TGF- β mRNA that inhibited the enhanced proliferation of VSMC from SHR⁴¹ further support the involvement of TGF- β in augmented growth of VSMC from SHR. Various studies have shown that VSMC from SHR express higher levels of various growth factors including TGF- β , PDGF-A chain, basic fibroblast growth factors (bFGF), as compared to VSMC from WKY²⁷. Our studies showing that growth factor receptor inhibitors also inhibited the basal proliferation of VSMC from WKY further suggests the expression of growth factor receptors in VSMC from WKY rats that may contribute to the proliferation of VSMC. In support of this, Fukuda et al.⁴² have reported the increased expression of TGF- β type II receptor in VSMC from SHR compared with cells from WKY. In addition, induction of hypertension by abdominal aortic coarction has also been shown to increase the levels of vascular IGF-1 mRNA⁴³. Furthermore, a three-fold increase in aortic steady state PDGF- β receptor mRNA levels has also been reported in DOCA-salt hypertensive rats²⁶. Taken together, it

may be suggested that the hyperproliferation of VSMC from SHR may be attributed to the autocrine effects of growth factors through their receptor activation.

The transactivation of growth factor and growth factor receptors by exogenous Ang II and ET-1 has been shown by several investigators^{18, 19, 44}. The treatment of VSMC with Ang II has been shown to increase the expression of IGF-1 mRNA as well as DNA synthesis⁴⁴. Ang II-induced enhanced DNA synthesis was shown to be attenuated by anti-IGF-1 antibody. These data suggest that Ang II-induced transactivation of IGF-1 plays a role in vascular growth promoting effects of Ang II. The transactivation of EGF-R by Ang II through AT₁ has also been reported in cultured VSMC, which through the activation of MAP kinase signaling induce protein synthesis⁴⁵. In the heart, administration of Ang II has also been reported to potentiate cardiac IGF-1 and IGF-1R mRNA expression⁴⁶ and treatment with ACE inhibitors was shown to inhibit cardiac IGF-1 gene expression⁴⁷. Furthermore infusion of Ang II in the rats was also shown to increase the levels of EGF-R mRNA and protein in the aorta and heart⁴⁸.

However, we demonstrate for the first time that endogenous Ang II and ET-1 through the activation of AT₁, ET_A and ET_B receptor respectively could also transactivate EGF-R in VSMC from SHR because the enhanced tyrosine phosphorylation of EGF-R exhibited by VSMC from SHR was attenuated by losartan, BQ123 and BQ788, the inhibitors of the AT₁, ET_A and ET_B receptor respectively. The fact that the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from SHR was also attenuated by the inhibitors of EGF-R, PDGF-R, IGF-R, as well as by the inhibitors of AT₁, ET_A and ET_B receptors suggest that the endogenous Ang II and ET-1 through the transactivation of growth factor receptors may activate MAP kinase signaling that contributes to the enhanced cell growth

in SHR. In this regard, various studies have shown the implication of growth factor receptor transactivation in Ang II-induced enhanced activation of MAP kinase⁴⁴⁻⁴⁶. The implication of EGF-R in Ang II and ET-1-induced enhanced proliferation of VSMC was further substantiated by our studies showing that Ang II and ET-1-evoked increased proliferation of A-10 VSMC was attenuated by AG1478, an EGF-R inhibitor. In addition, the increased phosphorylation of EGF-R as well as ERK1/2 induced by Ang II and ET-1 was also attenuated by EGF-R inhibitor, AG1478.

In conclusion, we demonstrate for the first time that endogenous Ang II and ET-1 through the activation of AT₁, ET_A and ET_B receptors transactivate EGF-R, which by increasing the activation of MAP kinase may contribute to the enhanced proliferation of VSMC from SHR.

Footnotes

* This study was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (MOP 53074).

** To whom correspondence should be addressed.

List of abbreviation:

ACE: Angiotensin converting enzyme, AngII: angiotensin II, AT₁: type 1 angiotensin receptor, EGF : epidermal growth factor, EGF-R: epidermal growth factor receptor, ERK ½ : extracellular regulated kinase, ET-1: endothelin, ET_A : endothelin receptor A, ET_B : endothelin receptor B, IGF : insulin like growth factor, IGF-R : insulin like growth factor receptor, MAPK: mitogen-activated protein kinase, PDGF : platelet-derived growth factor, PDGF-R : platelet-derived growth factor receptor, SHR: spontaneously hypertensive rats, VSMC: vascular smooth muscle cells, WKY: wistar-kyoto rat breed

Acknowledgements

We would like to thank Christiane Laurier for her valuable secretarial help.

REFERENCES

1. Michel JB, De RN, Plissonnier D, Anidjar S, Salzmann JL and Levy B. Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; **16 Suppl 1**: S4-11.
2. Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 2005; **90**: 449-455.
3. Schiffrin EL. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1995; **25**: 1135-1143.
4. Suzuki J, Iwai M, Nakagami H et al. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* 2002; **106**: 847-853.
5. Hashim S, Li Y and Anand-Srivastava MB. Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through Gialpha protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**: H3144-H3153.
6. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; **45**: 205-251.
7. Chang RS and Lotti VJ. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Sci* 1991; **49**: 1485-1490.

8. Anand-Srivastava MB. Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **117**: 420-428.
9. Anand-Srivastava MB. Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat myocardial sarcolemma. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**: 489-496.
10. Duff JL, Berk BC and Corson MA. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **188**: 257-264.
11. Griending KK, Rittenhouse SE, Brock TA, Ekstein LS, Gimbrone MA, Jr. and Alexander RW. Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1986; **261**: 5901-5906.
12. Vogelsang M, Broede-Sitz A, Schafer E, Zerkowski HR and Brodde OE. Endothelin ETA-receptors couple to inositol phosphate formation and inhibition of adenylate cyclase in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; **23**: 344-347.
13. Takagi Y, Ninomiya H, Sakamoto A, Miwa S and Masaki T. Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelinA/B chimeras. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10072-10078.
14. Wu-Wong JR and Opgenorth TJ. Endothelin and isoproterenol counter-regulate cAMP and mitogen-activated protein kinases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **31**

Suppl 1: S185-S191.

15. Bouallegue A, Daou GB and Srivastava AK. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; **5**: 45-52.
16. Eguchi S, Hirata Y, Imai T and Marumo F. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 1993; **132**: 524-529.
17. Schiffrin EL and Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **32 Suppl 3**: S2-13.
18. Eguchi S and Inagami T. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept* 2000; **91**: 13-20.
19. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH and Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2268-2274.
20. Hughes AD, Sinclair AM, Geroulakos G et al. Structural changes in the cardiovascular system of untreated essential hypertensives. *Blood Press* 1995; **4**: 42-47.
21. Li Y, Bou Daou G and Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gi α protein in SHR contributes to enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells : Implication of MAPK/PI3K signaling pathways. *Can J Cardiol* 2005; **21**: 1556- (abstract).

22. Paquet JL, Baudouin-Legros M, Marche P and Meyer P. Enhanced proliferating activity of cultured smooth muscle cells from SHR. *Am J Hypertens* 1989; **2**: 108-110.
23. Hadrava V, Tremblay J and Hamet P. Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1989; **13**: 589-597.
24. Kunimoto M, Soma M and Kanmatsuse K. Production of eicosanoids and angiotensin II in resistance vessels in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; **25**: 430-434.
25. Touyz RM and Schiffrin EL. Role of endothelin in human hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; **81**: 533-541.
26. Sarzani R, Arnaldi G and Chobanian AV. Hypertension-induced changes of platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart. *Hypertension* 1991; **17**: 888-895.
27. Satoh C, Fukuda N, Hu WY, Nakayama M, Kishioka H and Kanmatsuse K. Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; **37**: 108-118.
28. Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M and Genest J. Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **108**: 213-219.

29. Liao G and Chan LM. Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10315-10320.
30. Lappas G, Daou GB and Anand-Srivastava MB. Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005; **23**: 2251-2261.
31. El_Mabrouk M, Touyz RM and Schiffrin EL. Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **281**: H30-H39.
32. Kubo A, Fukuda N, Soma M, Izumi Y and Kanmatsuse K. Inhibitory effect of an angiotensin II type 1 receptor antagonist on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; **27**: 58-63.
33. Resink TJ, Hahn AW, Scott-Burden T, Powell J, Weber E and Buhler FR. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **168**: 1303-1310.
34. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y and Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1990; **1**: 649-659.
35. Kanse SM, Takahashi K, Warren JB et al. Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; **17 Suppl 7**: S113-S116.

36. Lu MH, Chao CF, Tsai SH, Chen JY and Chang LT. Autocrine effects of endothelin on in vitro proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2006; **28**: 463-474.
37. Shichiri M, Yokokura M, Marumo F and Hirata Y. Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 989-997.
38. Liao DF, Monia B, Dean N and Berk BC. Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6146-6150.
39. Mikhail N, Fukuda N, Tremblay J and Hamet P. Platelets, growth factors, and vascular smooth-muscle cells in hypertension and diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; **22 Suppl 6**: S64-S74.
40. Hamet P, Hadrava V, Kruppa U and Tremblay J. Vascular smooth muscle cell hyper-responsiveness to growth factors in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1988; **6**: S36-S39.
41. Fukuda N, Tremblay J and Hamet P. Participation of proteolysis and transforming growth factor [beta]1 activation in growth of cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *genet hypertens* 1992; **218**: 227-229.
42. Fukuda N, Kubo A, Izumi Y, Soma M and Kanmatsuse K. Characteristics and expression of transforming growth factor-beta receptor subtypes on vascular smooth

- muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1995; **13**: 831-837.
43. Fath KA, Alexander RW and Delafontaine P. Abdominal coarctation increases insulin-like growth factor I mRNA levels in rat aorta. *Circ Res* 1993; **72**: 271-277.
44. Delafontaine P and Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 16866-16870.
45. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H et al. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8890-8896.
46. Brink M, Chrast J, Price SR, Mitch WE and Delafontaine P. Angiotensin II stimulates gene expression of cardiac insulin-like growth factor I and its receptor through effects on blood pressure and food intake. *Hypertension* 1999; **34**: 1053-1059.
47. Donohue TJ, Dworkin LD, Ma J, Lango MN and Catanese VM. Antihypertensive agents that limit ventricular hypertrophy inhibit cardiac expression of insulin-like growth factor-I. *J Invest Med* 1997; **45**: 584-591.
48. Kagiya S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC and Phillips MI. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 2002; **106**: 909-912.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Effect of vasoactive peptide antagonists on thymidine incorporation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). Confluent VSMC from SHR and WKY rats were incubated in the absence or presence of Losartan (10^{-6} M), BQ123 (10^{-6} M) or BQ788 (10^{-6} M) for 24 h. Thymidine incorporation was determined as described in “Material and Methods”. Results are expressed as percentage of WKY control taken as 100%. Values are means \pm SE of 3 separate experiments. *** $p < 0,001$ vs WKY rats, $\delta\delta p < 0,01$, $\delta\delta\delta p < 0,001$ vs SHR.

Fig. 2 Effect of growth factors receptor inhibitors on thymidine incorporation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). Confluent VSMC from SHR and WKY rats were incubated in the absence or presence of AG1478 (10^{-6} M), AG1295 (10^{-6} M) or AG1024 (10^{-6} M) for 24 h. Thymidine incorporation was determined as described in “Material and Methods”. Results are expressed as percentage of WKY control taken as 100%. Values are means \pm SE of 3 separate experiments. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs WKY rats, $\delta\delta\delta p < 0,001$ vs SHR.

Fig. 3 Effect of vasoactive peptide antagonists on ERK 1/2 phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). Confluent VSMC from SHR

and WKY rats were incubated in the absence or presence of Losartan (10^{-6} M), BQ123 (10^{-6} M) or BQ788 (10^{-6} M) for 30 min. Cell lysates were immunoblotted by phospho-specific-Tyr²⁰⁴ERK1/2 for pERK1/2 antibodies as shown on the top panel. Blots were also analysed for total ERK1/2 (bottom panel). The blots are representative of five separate experiments. Detection of p-ERK1/2 and total ERK1/2 was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. Results are expressed as percentage of WKY control taken as 100%. Values are means \pm SE of 5 separate experiments. ***p<0,001 vs WKY rats, §p<0,05,vs SHR.

Fig. 4 Effect of growth factor receptor inhibitors on ERK 1/2 phosphorylation in vascular smooth muscle cells from (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). Confluent VSMC from SHR and WKY rats were incubated in the absence or presence of AG1478 (10^{-6} M), AG1295 (10^{-6} M) or AG1024 (10^{-6} M) for 30 min. Cell lysates were immunoblotted by phospho-specific-Tyr²⁰⁴ERK1/2 for pERK1/2 antibodies as shown on the top panel. Blots were also analysed for total ERK1/2 (bottom panel). The blots are representative of five separate experiments. Detection of p-ERK1/2 and total ERK1/2 was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. Results are expressed as percentage of WKY control taken as 100%. Values are means \pm SE of 5 separate experiments. **p<0,01, vs WKY rats, §§p<0,01, §§§p <0,001 vs SHR.

Fig. 5 Effect of vasoactive peptide antagonists on EGF-R phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 weeks-old spontaneously

hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). Confluent VSMC from SHR and WKY rats were incubated in the absence or presence of Losartan (10^{-6} M), BQ123 (10^{-6} M) or BQ788 (10^{-6} M) for 30 min. Cell lysates were immunoblotted by phospho-specific- Tyr¹¹⁷³EGF-R for pEGF-R antibodies as shown on the top panel. Blots were also analysed for total EGF-R (bottom panel). The blots are representative of five separate experiments. Detection of p-EGF-R and total EGF-R was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. Results are expressed as percentage of WKY control taken as 100%. Values are means \pm SE of 5 separate experiments. *** $p < 0,001$, vs WKY rats, §§ $p < 0,01$, vs SHR.

Fig. 6 Effect of growth factor receptor inhibitors on EGF-R phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from from 12 weeks-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). Confluent VSMC from SHR and WKY rats were incubated in the absence or presence of AG1478 (10^{-6} M), AG1295 (10^{-6} M) or AG1024 (10^{-6} M) for 30 min. Cell lysates were immunoblotted by phospho-specific-Tyr¹¹⁷³EGF-R for pEGF-R antibodies as shown on the top panel. Blots were also analysed for total EGF-R (bottom panel). The blots are representative of five separate experiments. Detection of p-EGF-R and total EGF-R was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. Results are expressed as percentage of WKY control taken as 100%. Values are means \pm SE of 5 separate experiments. * $p < 0,05$ vs WKY rats, § $p < 0,05$ vs SHR.

Fig. 7 Effect of EGF-R inhibition (AG-1478) on vasoactive peptides-induced enhanced proliferation of A10 vascular smooth muscle cells (VSMC). Confluent A10 VSMC were pretreated in the absence or presence of AG-1478 (10^{-6} M) for 30 min and were then challenged with different concentrations of ET-1 (10^{-11} to 10^{-7} M) (**A**) or AngII (10^{-9} to 10^{-7} M) (**B**). Thymidine incorporation was determined as described in “Material and Methods”. Results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SE of 5 separate experiments. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs control, $\delta p < 0,05$, $\delta\delta p < 0,01$, $\delta\delta\delta p < 0,001$ vs Ang II or ET-1 treatment.

Fig. 8 Effect of AG-1478 on ET-1 or ANG II-induced enhanced phosphorylation of EGF-R in A-10 vascular smooth muscle cells (VSMC). Confluent A-10 VSMC were incubated in the absence or presence of AG1478 (10^{-6} M) for 30 min and then challenged with ET-1 (10^{-7} M) or Ang-II (10^{-7} M) for 5 min. Cell lysates were immunoblotted by phospho-specific-Tyr¹¹⁷³EGF-R for pEGF-R antibodies as shown on the top panel. Blots were also analysed for total EGF-R (bottom panel). The blots are representatives of five separate experiments. Detection of p-EGF-R and total EGF-R was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. Results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SE of 5 separate experiments. * $p < 0,05$, vs control, $\delta\delta\delta p < 0,001$ vs Ang II treated A10 VSMC, $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$ ET-1 treated A-10 VSMC.

Fig. 9 Effect of AG-1478 on ET-1 or Ang II induced enhanced ERK1/2 phosphorylation in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC). Confluent A10 VSMC

were incubated in the absence or presence of AG1478 (10^{-6} M) for 30 min and then challenged with ET-1 (10^{-7} M) or Ang-II (10^{-7} M) for 5 mins. Cell lysates were immunoblotted by phospho-specific-Tyr²⁰⁴ERK1/2 for pERK1/2 antibodies as shown on the top panel. Blots were also analysed for total ERK1/2 (bottom panel). The blots are representatives of five separate experiments. Detection of p-ERK1/2 and total ERK1/2 was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. Results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SE of 5 separate experiments. * $p < 0,05$, vs control, ††† $p < 0,001$, vs ET-1 treated A10 VSMC, δδδ $p < 0,001$ vs Ang II treated A10 VSMC.

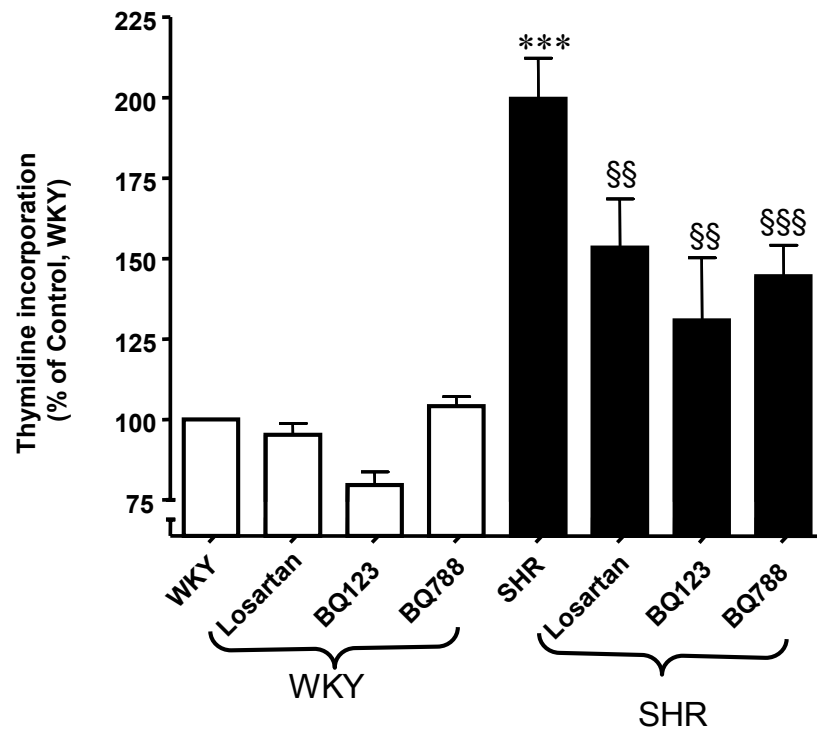


Fig.1

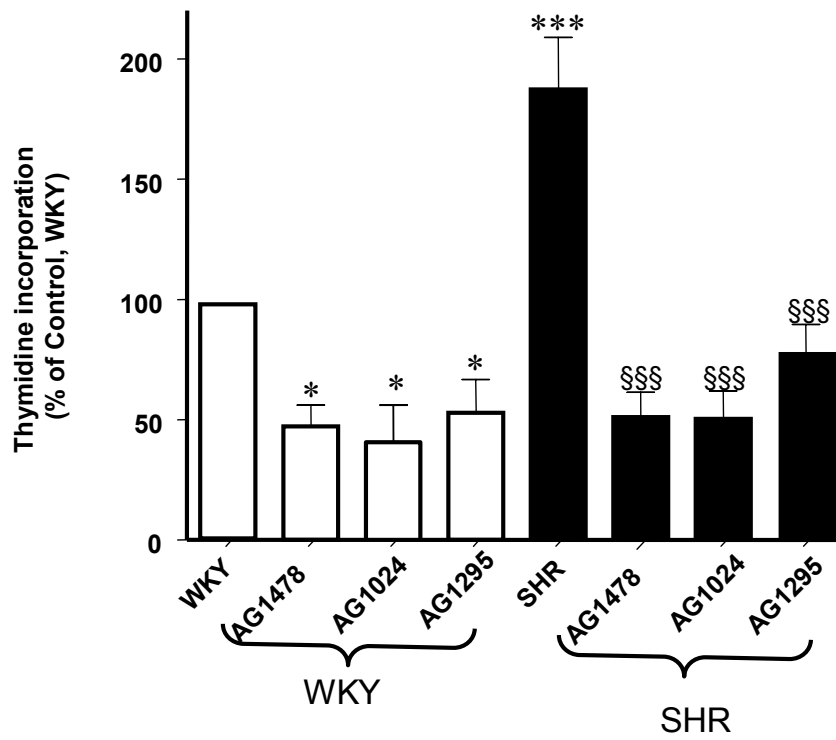


Fig. 2

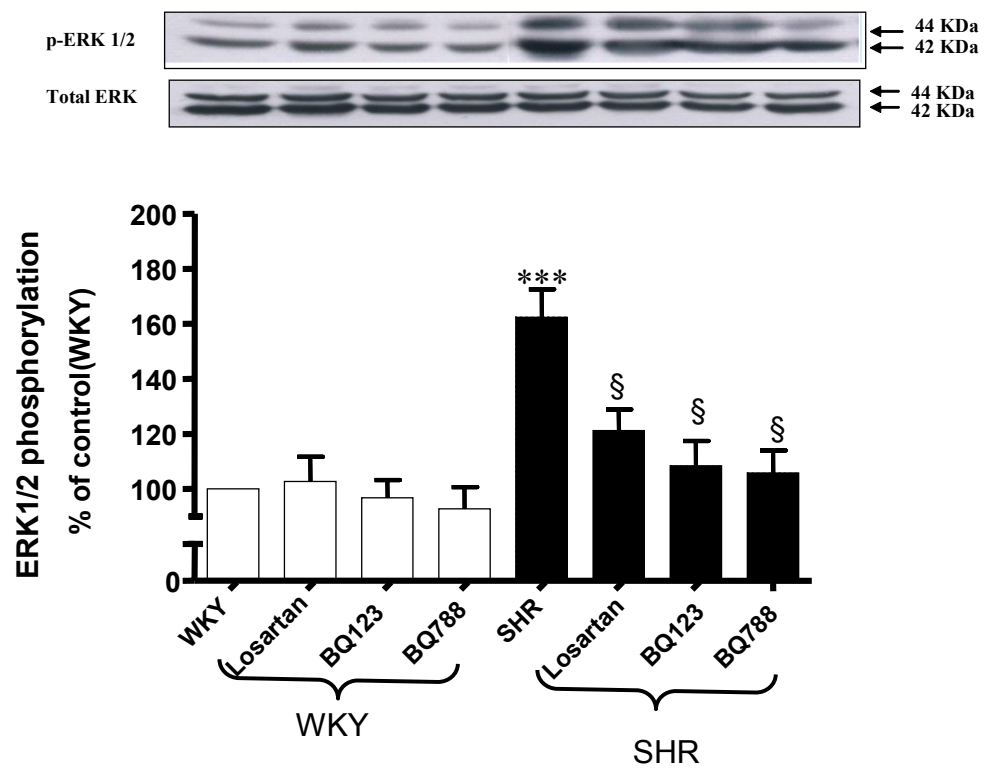


Fig.3

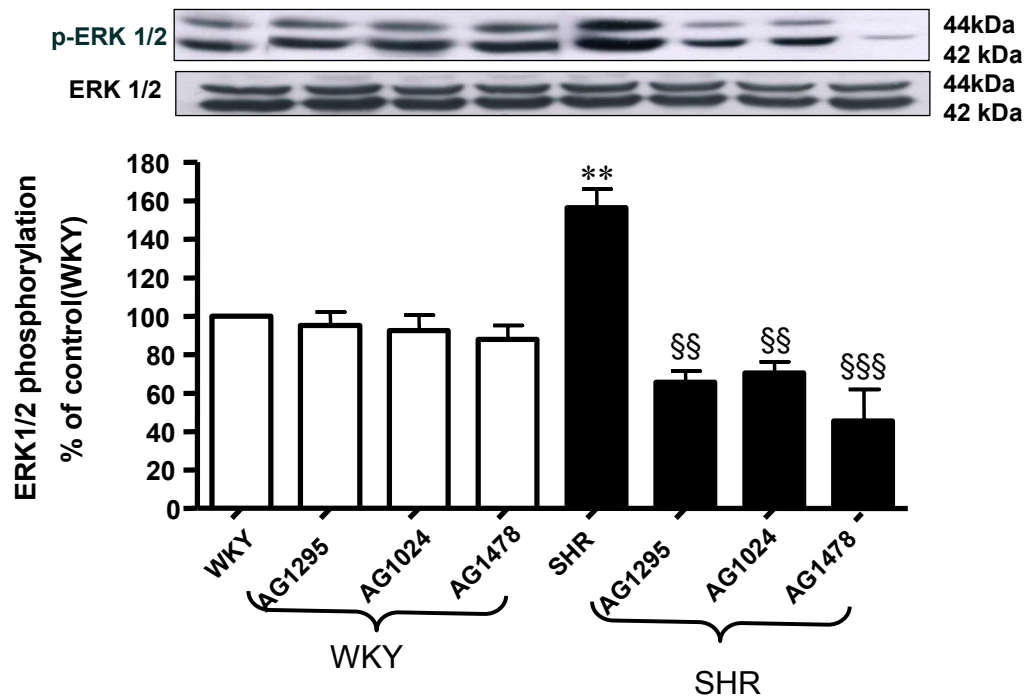


Fig. 4

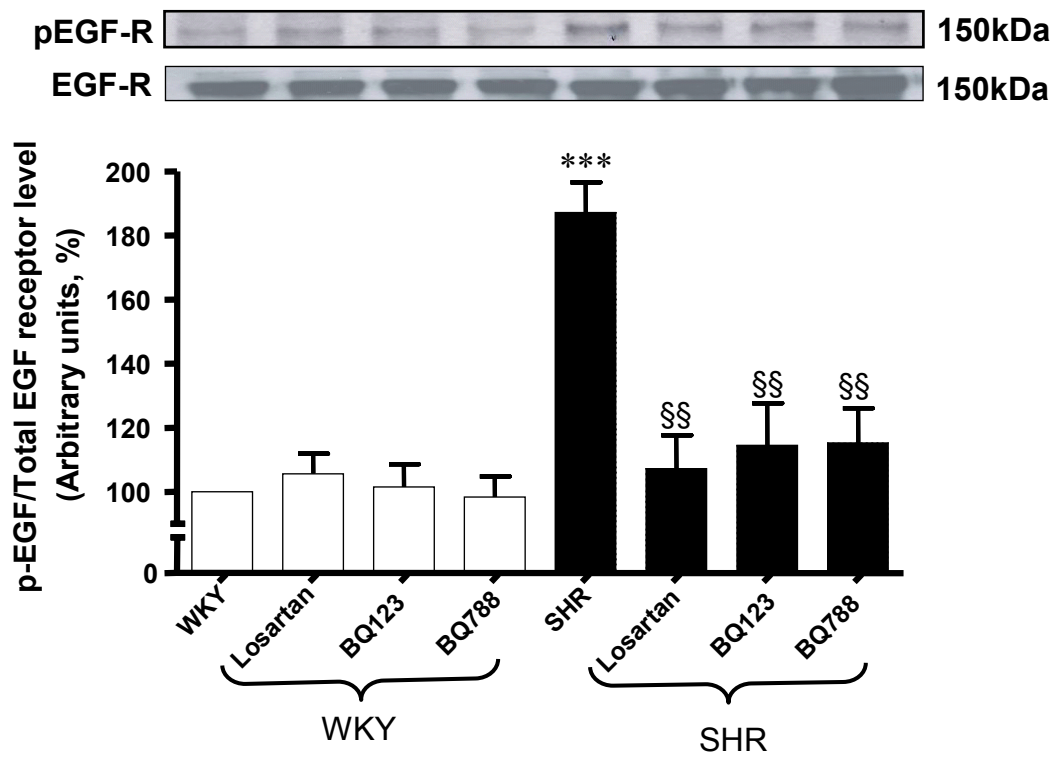


Fig.5

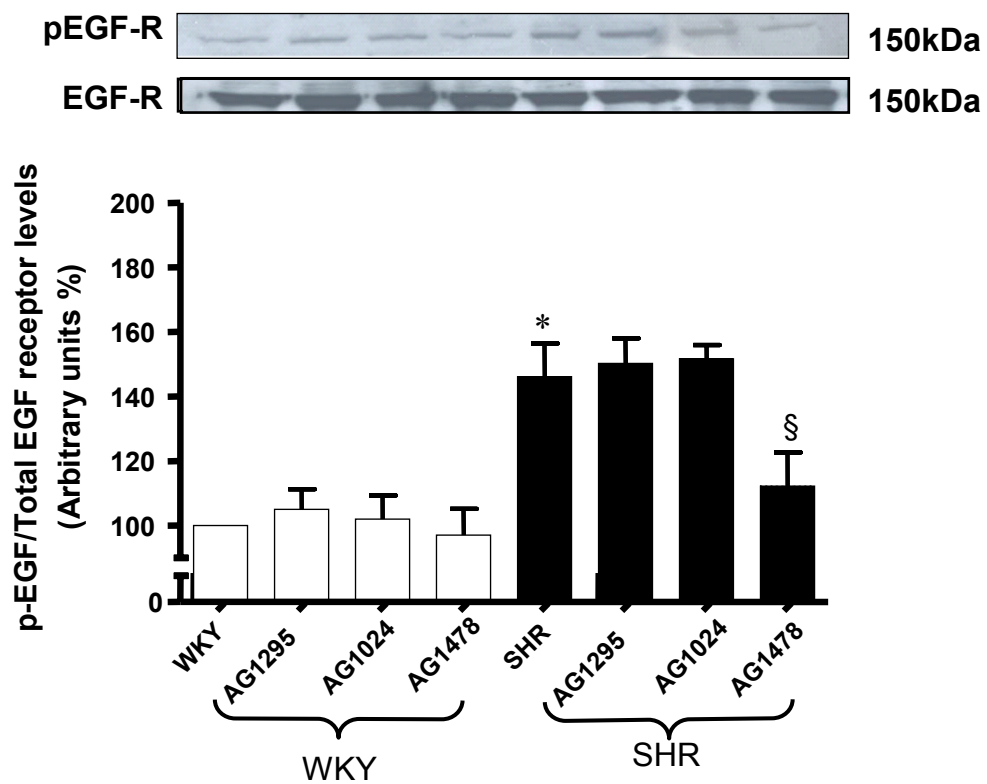


Fig.6

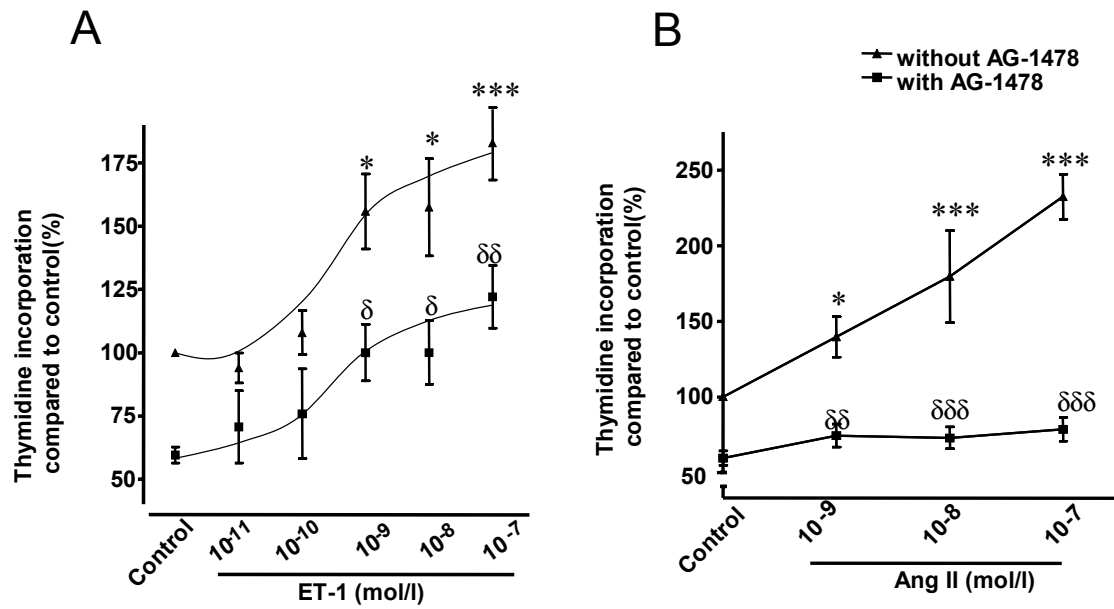


Fig.7

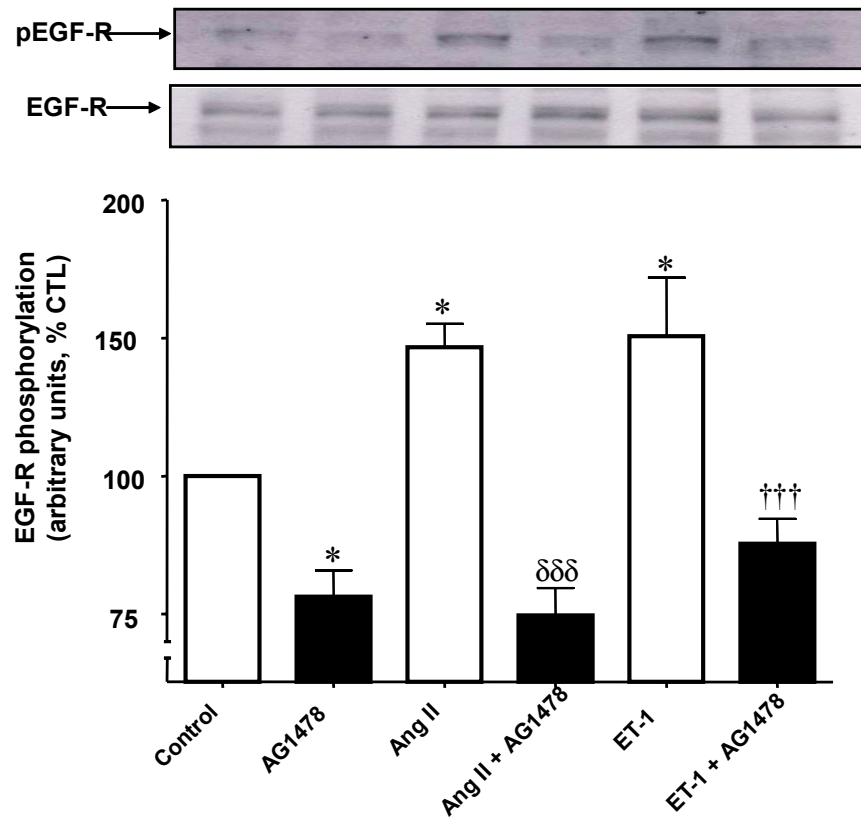


Fig. 8

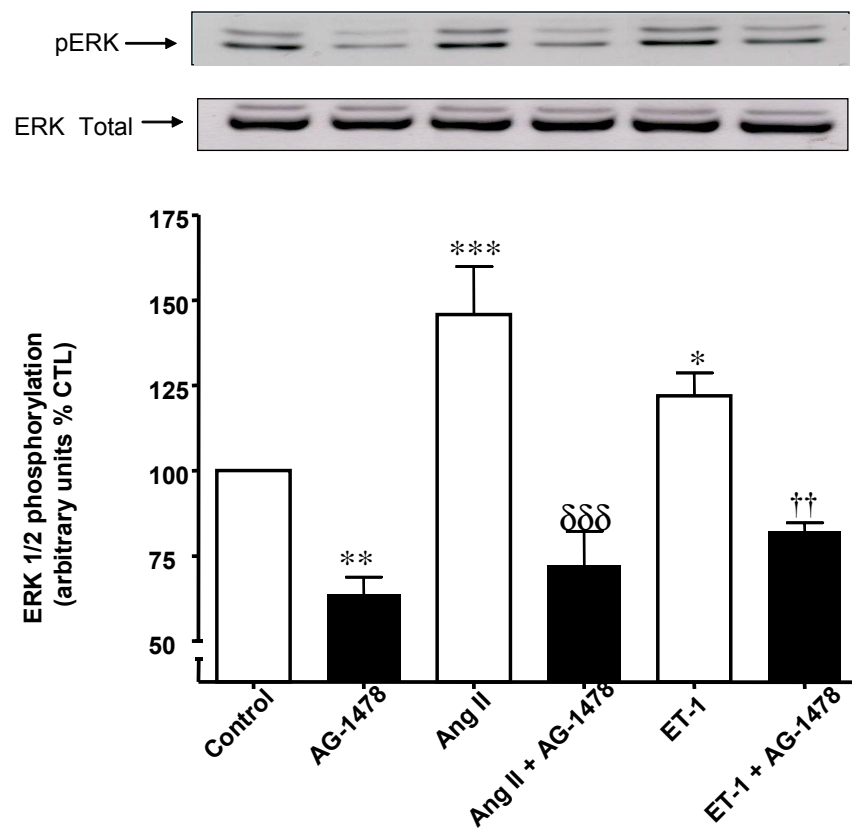


Fig. 9

Chapitre 3

Discussion générale et conclusion

I. Discussion

Le remodelage vasculaire associé à l'hypertension est le résultat d'une prolifération accrue et d'une hypertrophie des CMLV. Notre laboratoire et d'autres ont déjà démontré que les CMLV de SHR affichent une prolifération accrue comparée à des souches normotendues comme WKY (Hadrava *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2005). Non seulement nos résultats confirment la prolifération accrue des CMLV de SHR mais ils nous montrent aussi que le losartan, le BQ-123 et le BQ-788 atténuent cette prolifération accrue sans affecter celle des CMLV de rats WKY. Ceci indique que les peptides vasoactifs endogènes ont un rôle important dans l'induction de la prolifération accrue des CMLV de SHR et que leur action s'exerce via les récepteurs AT₁, ET_A et ET_B. En atténuant la prolifération des CMLV avec un inhibiteur d'ECA aussi bien qu'avec un antagoniste de AT₁, Kubo *et al.* (1996) ont démontré le rôle d'AT₁ dans la prolifération accrue des CMLV induite par l'AngII. Lu *et al.* (2006) ont montré le rôle de l'ET-1 endogène et de l'activation des récepteurs ET_A et ET_B dans la prolifération accrue des CMLV de SHR en atténuant la prolifération accrue par un anticorps anti-ET-1 ainsi que par les antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B.

Les inhibiteurs des récepteurs aux facteurs de croissance, AG-1295, AG-1024 et AG-1478, atténuent aussi la prolifération accrue des CMLV de SHR, suggérant l'implication des récepteurs PDGF-R, IGF-R et EGF-R

respectivement dans la surprolifération des CMLV de SHR. Ceci est en accord avec de précédentes recherches qui ont démontré que les facteurs de croissance, comme les peptides vasoactifs, peuvent induire la prolifération de CMLV normales en culture (Mikhail *et al.*, 1993). Plusieurs études ont confirmé une augmentation des facteurs de croissance (IGF-1) (Fath *et al.*, 1993) ou de leur récepteur (PDGF-R β) dans l'hypertension (Sarzani *et al.*, 1991). D'une manière plus spécifique, l'expression de plusieurs facteurs de croissance, dont le transforming growth factor β (TGF β), PDGF et basic fibroblast growth factor (bFGF), est majorée chez les CMLV de SHR, ce qui pourrait contribuer à la prolifération accrue des CMLV de SHR (Satoh *et al.*, 2001). De plus, la phosphorylation de EGF-R est accrue dans le système cardiovasculaire de SHR (Fujino *et al.*, 1998).

En traitant des CMLV avec de l'AngII ou de l'ET-1, plusieurs chercheurs ont observé une « transactivation » de EGF-R (Eguchi *et al.*, 1998 ; Chung et Walker, 2007). Non seulement, nous avons observé une phosphorylation accrue de EGF-R dans les CMLV de SHR comparées à celles de WKY, mais nous avons aussi observé que cette phosphorylation accrue de EGF-R était atténuée par les antagonistes des peptides vasoactifs, soit losartan, BQ-123 et BQ-788 dans les CMLV des SHR. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation accrue de EGF-R est attribuable à l'AngII et l'ET-1 endogènes des CMLV de SHR, en accord avec les observations précédentes (Eguchi *et al.*, 1998 ; Chung et Walker, 2007).

En plus de la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance accrue, nous avons observé une activation accrue de ERK $\frac{1}{2}$ dans les CMLV de SHR comparées aux CMLV de rat WKY. Les antagonistes des peptides vasoactifs ainsi que les inhibiteurs des facteurs de croissance atténuent significativement la phosphorylation accrue de ERK $\frac{1}{2}$ dans les CMLV de SHR. Ce qui nous laisse penser que l'AngII et l'ET-1 endogènes stimulent la prolifération accrue des CMLV de SHR par la transactivation accrue de EGF-R puis de ERK $\frac{1}{2}$.

Dans notre recherche, le rat SHR fut utilisé comme modèle d'hypertension avec son pendant non hypertendu le rat WKY. L'étiologie de l'hypertension du rat SHR est bien connue et est héréditaire selon la génétique mendélienne. L'hypertension essentielle chez l'humain est très variée dans son étiologie. Conséquemment, l'hypertension essentielle humaine varie dans ses symptômes, dans ses réponses aux traitements et dans les dangers qu'elle apporte. L'utilisation du rat SHR comme modèle d'hypertension essentiel est souvent critiquée, car l'hérédité mendélienne ne représente qu'une minorité des causes d'hypertension essentielle. Toutefois, l'étiologie n'est pas le seul facteur à considérer. En effet, selon le type de recherche qu'on désire effectuer, il peut être plus pertinent de considérer la réponse aux traitements ou le type de symptôme observé.

Une première manière de catégoriser l'hypertension est de tenir compte des niveaux de rénine. Quand la pression sanguine est élevée, le

niveau de rénine devrait être bas, puisque la sécrétion de rénine est normalement inhibée par cette pression élevée. Dans 70% des cas d'hypertension essentielle, les taux de rénine vont de moyens à élevés. Or même un niveau moyen représente beaucoup de rénine pour quelqu'un d'hypertendu (Lilly, 2003). Comme le rat SHR présente un SRA élevé, il devrait constituer un bon modèle représentatif d'une partie importante des patients souffrant d'hypertension essentielle. Puisque nous employons dans notre étude un antagoniste de l'AngII, nous devons utiliser un modèle où l'hypertension est susceptible à l'inhibition du SRA comme c'est le cas pour SHR. Comme la majorité des patients répondent aux traitements d'inhibition du SRA, notre étude reste intéressante en vue de l'application à l'humain.

L'autre critère important, quand vient le temps de choisir un modèle d'hypertension, est le type de dommage physiologique étudié. Tous les modèles d'hypertension ne montrent pas les mêmes problèmes physiologiques. Comme nos travaux portent sur le remodelage vasculaire, il est important que le remodelage vasculaire observé dans notre modèle soit semblable à celui observé chez l'humain. Comme mentionnée dans l'introduction, la similarité entre le remodelage vasculaire de SHR et de l'humain a déjà été établie. De plus, comme nous voulions examiner la transactivation de EGF-R suite à la stimulation par des peptides vasoactifs endogènes, notre modèle devait avoir des CMLV exprimant ces peptides vasoactifs comme c'est le cas pour SHR. Nous pouvons donc affirmer que le

choix de SHR comme modèle d'hypertension dans notre étude était pertinent et probablement le meilleur.

L'importance de la phosphorylation de EGF-R dans l'activation des MAPK par les peptides vasoactifs endogènes est appuyée par nos résultats indiquant l'atténuation de la prolifération accrue induite par l'Ang-II et l'ET-1 des CMLV A-10 par l'AG-1478, inhibiteur de EGF-R. De plus, nos résultats montrent que l'AngII et l'ET-1 majorent la phosphorylation de EGF-R et ERK et que cette majoration est complètement atténuée par l'AG-1478. Ceci conforte l'idée que l'AngII et l'ET-1 stimulent la prolifération des CMLV par la transactivation de EGF-R puis de ERK $\frac{1}{2}$ et dans les CMLV de SHR, l'AngII et l'ET-1 endogènes stimulent la prolifération accrue.

Nous devons souligner ici que nous avons effectué nos expériences sur des CMLV issues de la lignée A-10. Il aurait été aussi intéressant d'utiliser les CMLV primaires de rats non-hypertendus comme WKY ou Sprague-Dawley. Toutefois, les CMLV A-10 ont déjà démontré qu'elles se comportent comme des CMLV primaires, tout en étant plus stables.

Les réponses que nous avons trouvées soulèvent d'autres questions. Ainsi, nous avons découvert que EGF-R est impliqué dans la stimulation de la prolifération des CMLV induite par les peptides vasoactifs, mais les mécanismes permettant la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance depuis la stimulation des peptides vasoactifs n'ont pas été suffisamment élucidés. Par exemple, il reste à déterminer lequel de Gai ou de

Gαq₁₁ est essentiel pour produire la transactivation de EGF-R. De plus, il semble que, dans la prolifération des CMLV induite par ET-1, des mécanismes indépendants de EGF-R puissent être impliqués. Une prochaine étape pourrait être d'établir si l'un des deux récepteurs à l'ET-1 est capable de stimuler la prolifération des CMLV malgré une inhibition de EGF-R.

Plusieurs recherches ont démontré l'importance des ERO constituant le stress oxydatif dans la transactivation de EGF-R et l'induction de la prolifération accrue par l'AngII (Ushio-Fukai et al., 2001; Chen et al., 2006). Certains chercheurs pensent que les ERO transactivent le récepteur EGF-R via une oxydation de tyrosines kinases tel que c-Src (Chen et al., 2006) alors que d'autres tentent de démontrer que les ERO interviennent dans la transactivation via les métalloprotéases. Les mécanismes d'action des ERO restent donc à établir, mais les nombreux indices mentionnés précédemment nous permettent d'avancer que les ERO agissent en amont du récepteur EGF-R (figure 8).

Selon plusieurs études de notre laboratoire, l'activité accrue de Gαi entraîne une prolifération accrue des CMLV. Cette activité accrue de Gαi serait initiée par une stimulation de AT₁, ET_A ou ET_B. De plus, cette activité de Gαi serait dépendante de la phosphorylation des MAPK (Li et al. 2005,

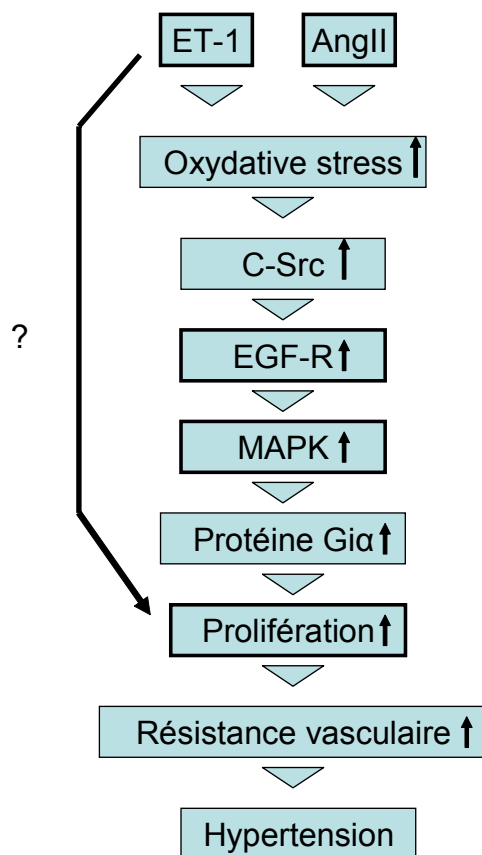


Figure 8. Schéma intégrateur

Explication : L'ET-1 et l'AngII induisent la transactivation du récepteur EGF-R. Cette transactivation est nécessaire pour l'activation des MAPK induite par l'ET-1 et l'AngII et pour la prolifération des CMLV induite par l'ET-1 et l'AngII. L'ET-1 et l'AngII sont tous deux produits par les CMLV de rats SHR, ce qui contribue à la pathogénèse de l'hypertension des rats SHR. Les résultats obtenus sur les CMLV A-10 suggèrent que l'ET-1 possède une faible activité proliférative indépendamment de la transactivation de EGF-R.

Hashim et al. 2006, li et al. 2006). Comme la transactivation de EGF-R par AngII ou ET-1 mène à la phosphorylation des MAPK, nous pouvons supposer que l'activité accrue de Gai est dépendante de la transactivation de EGF-R (figure 8). De prochaines expériences tenteront de vérifier cette hypothèse.

1. Perspectives

Cette recherche a mis en lumière le rôle de la transactivation du récepteur EGF-R dans la prolifération des CMLV associée au remodelage vasculaire. De prochaines études se pencheront sur le rôle de la transactivation de EGF-R dans l'hypertrophie des CMLV. De plus, pour confirmer nos résultats et ceux à venir, d'autres techniques, comme l'injection intracellulaire d'ARN d'interférence de EGF-R, pourraient être utilisées. Comme le remodelage vasculaire est associé à la transactivation de EGF-R, il serait pertinent de vérifier l'effet de l'inhibiteur de EGF-R sur le remodelage vasculaire in vivo chez des SHR. Il serait aussi intéressant d'observer l'effet des agents réduisant le remodelage vasculaire (tels le monoxyde d'azote, les peptides natriurétiques et la bradykinine) sur la transactivation de EGF-R dans les CMLV de rats SHR. Parallèlement à ces recherches, de prochains travaux pourraient déterminer comment la stimulation par les peptides vasoactifs transactive EGF-R. Parmi les nombreux mécanismes à étudier, on retrouve les métalloprotéases, des tyrosines kinases comme c-Src, les ERO et même les protéines G qui pourront être étudiées avec leurs inhibiteurs

respectifs et l'effet de ceux-ci sur la transactivation de EGF-R. Plusieurs pistes ont déjà été proposées (Eguchi et al., 1998; Ushio-Fukai et al., 2001; Ohtsu et al., 2006; Shah et al., 2006), mais la séquence complète est loin d'avoir été établie et confirmée. Finalement, en plus de la transactivation de EGF-R, la transactivation des autres facteurs de croissance n'a pas été étudiée lors de nos recherches et est très peu abordée dans la littérature.

II. Conclusion

Le remodelage vasculaire est une des causes de l'hypertension des rats SHR. Ce remodelage vasculaire se caractérise par une prolifération et une hypertrophie accrue des CMLV de rats SHR lorsque comparées aux CMLV de rats WKY. Cette prolifération accrue fut atténuée par les antagonistes des récepteurs aux peptides vasoactifs (le losartan, le BQ-123 et le BQ-788) ainsi que par les inhibiteurs des facteurs de croissance (l'AG-1478, l'AG-1295 et l'AG-1024) dans les CMLV de SHR. Ceci démontre l'importance des peptides vasoactifs endogènes et des facteurs de croissance endogènes dans la surprolifération des CMLV de SHR. Parallèlement à la prolifération, la phosphorylation de EGF-R fut aussi accrue dans les CMLV de SHR comparées à celles de WKY. Encore une fois, cette phosphorylation fut atténuée par les antagonistes des peptides vasoactifs ainsi que par les inhibiteurs de EGF-R dans les CMLV de SHR mais pas dans les CMLV de rats WKY. La phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ dans les CMLV de SHR est plus élevée que dans les CMLV de rats WKY, mais elle est atténuée autant par les antagonistes des récepteurs aux peptides vasoactifs que par les inhibiteurs des facteurs de croissance. Dans les CMLV A-10, la surprolifération induite par l'AngII et l'ET-1 fut bloquée par l'inhibiteur de EGF-R. Parallèlement, la phosphorylation accrue de EGF-R et ERK $\frac{1}{2}$ induite par AngII et ET-1 fut atténuée par l'AG-1478. Ces données suggèrent

que l'AngII et l'ET-1 endogènes engendrent la prolifération accrue des CMLV de SHR à travers la transactivation de EGF-R et l'activation subséquente de ERK $\frac{1}{2}$. Les résultats obtenus avec les CMLV A-10 montrent que l'activation de ERK $\frac{1}{2}$ par l'AngII et l'ET-1 passe nécessairement par la transactivation de EGF-R. La stimulation de la prolifération par AngII et ET-1 passe aussi par la transactivation de EGF-R.

Bibliographie

- Accorsi, K., Giglione, C., Vanoni, M., and Parmeggiani, A. (2001) The Ras GDP/GTP cycle is regulated by oxidizing agents at the level of Ras regulators and effectors. *FEBS Lett* 492, 139-145.
- Anand-Srivastava, M. B. (1983) Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 117, 420-428.
- Anand-Srivastava, M. B. (1992) Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats. Relationship to adenylate cyclase inhibition. *Biochem J* 288 (Pt 1), 79-85.
- Anand-Srivastava, M. B. and Palaparti, A. (2003) Angiotensin-II-induced enhanced expression of Gi proteins is attenuated by losartan in A10 vascular smooth muscle cells: role of AT1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 150-158.
- Baker, K. M., Booz, G. W., and Dostal, D. E. (1992) Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 54, 227-241.
- Bassil, M., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2008) Peroxynitrite inhibits the expression of G(i)alpha protein and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H775-H784.
- Beazely, M. A. and Watts, V. J. (2006) Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report. *Eur J Pharmacol* 535, 1-12.
- Belsches, A. P., Haskell, M. D., and Parsons, S. J. (1997) Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci* 2, d501-d518.
- Berg, T., Degerman, E., and Tasken, K. (2008) Increased cAMP Signaling Can Ameliorate the Hypertensive Condition in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Vasc Res* 46, 25-35.
- Berk, B. C. (2001) Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81, 999-1030.
- Berk, B. C. and Corson, M. A. (1997) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 80, 607-616.
- Bkaily, G., Choufani, S., Avedanian, L., Ahmarani, L., Nader, M., Jacques, D., D'Orléans-Juste, P., and Al, K. J. (2008) Nonpeptidic antagonists of ETA and ETB receptors reverse the ET-1-induced sustained increase of

cytosolic and nuclear calcium in human aortic vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 86, 546-556.

Blanc, A., Pandey, N. R., and Srivastava, A. K. (2003) Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *Int J Mol Med* 11, 229-234.

Boron, W. F. and E. L. Boulpaep. 2003. *Medical Physiology*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.

Bouallegue, A., Daou, G. B., and Srivastava, A. K. (2007) Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc*

Brown, M. D. and Sacks, D. B. (2008) Compartmentalised MAPK pathways. *Handb Exp Pharmacol* 205-235.

Calbiochem .

http://www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/inhibitorselect_EGFR_signaling_pathway_inhibitor_panel.html. Calbiochem . 2008.

Ref Type: Generic

Caldwell, K. K., Boyajian, C. L., and Cooper, D. M. (1992) The effects of Ca²⁺ and calmodulin on adenylyl cyclase activity in plasma membranes derived from neural and non-neural cells. *Cell Calcium* 13, 107-121.

Callera, G. E., Tostes, R. C., Yogi, A., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2006) Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 110, 243-253.

Callera, G. E., Touyz, R. M., Teixeira, S. A., Muscara, M. N., Carvalho, M. H., Fortes, Z. B., Nigro, D., Schiffrin, E. L., and Tostes, R. C. (2003) ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension* 42, 811-817.

Chen, C. H., Cheng, T. H., Lin, H., Shih, N. L., Chen, Y. L., Chen, Y. S., Cheng, C. F., Lian, W. S., Meng, T. C., Chiu, W. T., and Chen, J. J. (2006) Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* 69, 1347-1355.

Cheng-Hsien, C., Yung-Ho, H., Yuh-Mou, S., Chun-Cheng, H., Horng-Mo, L., Huei-Mei, H., and Tso-Hsiao, C. (2006) Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase regulates endothelin-1-induced epidermal growth factor receptor transactivation in rat renal tubular cell NRK-52E. *Pflugers Arch* 452, 16-24.

Chiu, A. T., Herblin, W. F., McCall, D. E., Ardecky, R. J., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wong, P. C., Wexler, R. R., Johnson, A. L., and . (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 196-203.

Chiu, A. T., McCall, D. E., Price, W. A., Wong, P. C., Carini, D. J., Duncia, J. V., Wexler, R. R., Yoo, S. E., Johnson, A. L., and Timmermans, P. B. (1990) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 252, 711-718.

Chung, K. Y. and Walker, J. W. (2007) Interaction and inhibitory cross-talk between endothelin and ErbB receptors in the adult heart. *Mol Pharmacol* 71, 1494-1502.

Cochet, C., Kashles, O., Chambaz, E. M., Borrello, I., King, C. R., and Schlessinger, J. (1988) Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. *J Biol Chem* 263, 3290-3295.

Cohen, S. (1983) The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* 51, 1787-1791.

Cooper, D. M., Mons, N., and Karpen, J. W. (1995) Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374, 421-424.

Cooper, G. M. La cellule une approche moléculaire. 1999. Bruxelles, De Boeck Université.

Ref Type: Generic

Crawford, K. W., Frey, E. A., and Cote, T. E. (1992) Angiotensin II receptor recognized by DuP753 regulates two distinct guanine nucleotide-binding protein signaling pathways. *Mol Pharmacol* 41, 154-162.

D'Orléans-Juste, P., Plante, M., Honore, J. C., Carrier, E., and Labonte, J. (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 503-510.

Daou, G. B. and Srivastava, A. K. (2004) Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 37, 208-215.

Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.

de Champlain, J., Wu, R., Girouard, H., Karas, M., EL Midaoui A., Laplante, M. A., and Wu, L. (2004) Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 26, 593-601.

Eguchi, S., Hirata, Y., Ihara, M., Yano, M., and Marumo, F. (1992) A novel ETA antagonist (BQ-123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 302, 243-246.

Eguchi, S., Hirata, Y., Imai, T., and Marumo, F. (1993) Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 132, 524-529.

Eguchi, S. and Inagami, T. (2000) Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept* 91, 13-20.

Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E. D., Kawakatsu, H., Owada, K. M., Hirata, Y., Marumo, F., and Inagami, T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273, 8890-8896.

Endoh, M. (2006) Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium. *J Pharmacol Sci* 100, 525-537.

Ergul, A., Portik-Dobos, V., Giulumian, A. D., Molero, M. M., and Fuchs, L. C. (2003) Stress upregulates arterial matrix metalloproteinase expression and activity via endothelin A receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2225-H2232.

Fath, K. A., Alexander, R. W., and Delafontaine, P. (1993) Abdominal coarctation increases insulin-like growth factor I mRNA levels in rat aorta. *Circ Res* 72, 271-277.

Frank, G. D., Mifune, M., Inagami, T., Ohba, M., Sasaki, T., Higashiyama, S., Dempsey, P. J., and Eguchi, S. (2003) Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta. *Mol Cell Biol* 23, 1581-1589.

Freeman, E. J. and Tallant, E. A. (1994) Vascular smooth-muscle cells contain AT1 angiotensin receptors coupled to phospholipase D activation. *Biochem J* 304 (Pt 2), 543-548.

Fujino, T., Hasebe, N., Fujita, M., Takeuchi, K., Kawabe, J., Tobise, K., Higashiyama, S., Taniguchi, N., and Kikuchi, K. (1998) Enhanced expression of heparin-binding EGF-like growth factor and its receptor in

hypertrophied left ventricle of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 38, 365-374.

Fukuda, N. (1997) Molecular mechanisms of the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells in hypertension. *J Atheroscler Thromb* 4, 65-72.

Gao, B. B., Hansen, H., Chen, H. C., and Feener, E. P. (2006) Angiotensin II stimulates phosphorylation of an ectodomain-truncated platelet-derived growth factor receptor-beta and its binding to class IA PI3K in vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 397, 337-344.

Garnier, L. F. (1993) [Arterial hypertension, vascular remodelling and atherosclerosis]. *J Mal Vasc* 18, 6-11.

Ge, C., Garcia, R., and Anand-Srivastava, M. B. (2006) Enhanced expression of Gialpha protein and adenylyl cyclase signaling in aortas from 1 kidney 1 clip hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 739-746.

Goodfriend, T. L. (2006) Aldosterone--a hormone of cardiovascular adaptation and maladaptation. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8, 133-139.

Graf, K., Xi, X. P., Yang, D., Fleck, E., Hsueh, W. A., and Law, R. E. (1997) Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 29, 334-339.

Greene, A. S. and Amaral, S. L. (2002) Microvascular angiogenesis and the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 4, 56-62.

Guo, X., Okada, K., Fujita, N., Ishikawa, S., Komatsu, N., and Saito, T. (1996) Inhibitory effect of BQ-123 on endothelin-1-stimulated mitogen-activated protein kinase and cell growth of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 19, 23-30.

Hadrava, V., Kruppa, U., Russo, R. C., Lacourciere, Y., Tremblay, J., and Hamet, P. (1991) Vascular smooth muscle cell proliferation and its therapeutic modulation in hypertension. *Am Heart J* 122, 1198-1203.

Hadrava, V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1989) Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 13, 589-597.

Hahn, A. W., Resink, T. J., Scott-Burden, T., Powell, J., Dohi, Y., and Buhler, F. R. (1990) Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1, 649-659.

Hao, L., Du, M., Lopez-Campistrous, A., and Fernandez-Patron, C. (2004) Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 94, 68-76.

Hashim, S. and Anand-Srivastava, M. B. (2004) Losartan-induced attenuation of blood pressure in L-NAME hypertensive rats is associated with reversal of the enhanced expression of Gi alpha proteins. *J Hypertens* 22, 181-190.

Hashim, S., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2006) Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through Gialpha protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H3144-H3153.

Hughes, A. D., Sinclair, A. M., Geroulakos, G., Mayet, J., Mackay, J., Shahi, M., Thom, S., Nicolaides, A., and Sever, P. S. (1995) Structural changes in the cardiovascular system of untreated essential hypertensives. *Blood Press* 4, 42-47.

Hynynen, M. M. and Khalil, R. A. (2006) The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* 1, 95-108.

Ihara, M., Fukuroda, T., Saeki, T., Nishikibe, M., Kojiri, K., Suda, H., and Yano, M. (1991) An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 132-137.

Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2863-2867.

Intengan, H. D. and Schiffrin, E. L. (2000) Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36, 312-318.

Ishida, M., Ishida, T., Thomas, S. M., and Berk, B. C. (1998) Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 82, 7-12.

Ishikawa, K., Ihara, M., Noguchi, K., Mase, T., Mino, N., Saeki, T., Fukuroda, T., Fukami, T., Ozaki, S., Nagase, T., and . (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4892-4896.

Iwasaki, H., Eguchi, S., Ueno, H., Marumo, F., and Hirata, Y. (1999) Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated

protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 140, 4659-4668.

Kondoh, K. and Nishida, E. (2007) Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1227-1237.

Kubo, A., Fukuda, N., Soma, M., Izumi, Y., and Kanmatsuse, K. (1996) Inhibitory effect of an angiotensin II type 1 receptor antagonist on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 27, 58-63.

Kubo, T., Ibusuki, T., Chiba, S., Kambe, T., and Fukumori, R. (2002) Altered mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 537-543.

Kunimoto, M., Soma, M., and Kanmatsuse, K. (1998) Production of eicosanoids and angiotensin II in resistance vessels in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25, 430-434.

Lappas, G., Daou, G. B., and Anand-Srivastava, M. B. (2005) Oxidative stress contributes to the enhanced expression of G α proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23, 2251-2261.

Lassegue, B. and Clempus, R. E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R277-R297.

Li, J. S., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (1998) Effects of AT1 and AT2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 31, 487-492.

Li, L., Fink, G. D., Watts, S. W., Northcott, C. A., Galligan, J. J., Pagano, P. J., and Chen, A. F. (2003) Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 107, 1053-1058.

Li, Y. and Anand-Srivastava, M. B. (2002) Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 91, 247-254.

Li, Y., Bou Daou, G., and Anand-Srivastava, M. B. (2005) Enhanced expression of G α protein in SHR contributes to enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells : Implication of MAPK/PI3K signaling pathways. *Can J Cardiol* 21, 1556-(abstract).

Li, Y., Hashim, S., and Anand-Srivastava, M. B. (2006) Intracellular peptides of natriuretic peptide receptor-C inhibit vascular hypertrophy via Gqalpha/MAP kinase signaling pathways. *Cardiovasc Res* 72, 464-472.

Li, Y., Lappas, G., and Anand-Srivastava, M. B. (2007) Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi(alpha) proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1922-H1930.

Lilly, L. S. Pathophysiology of heart disease 3rd edition. 2003. Baltimore, Lippincott William & Wilkins.

Ref Type: Generic

Lu, M. H., Chao, C. F., Tsai, S. H., Chen, J. Y., and Chang, L. T. (2006) Autocrine effects of endothelin on in vitro proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clin Exp Hypertens* 28, 463-474.

Luttrell, L. M., Daaka, Y., and Lefkowitz, R. J. (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 177-183.

Marasciulo, F. L., Montagnani, M., and Potenza, M. A. (2006) Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem* 13, 1655-1665.

Margolis, B. and Skolnik, E. Y. (1994) Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol* 5, 1288-1299.

Marieb, E. N. Anatomie et physiologie humaine 2e édition. 1993. Montréal, ERPI.

Ref Type: Generic

Marrero, M. B., Paxton, W. G., Duff, J. L., Berk, B. C., and Bernstein, K. E. (1994) Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269, 10935-10939.

McKinley, M. J., A. L. Albiston, A. M. Allen, M. L. Mathai, C. N. May, R. M. McAllen, B. J. Oldfield, F. A. Mendelsohn, and S. Y. Chai. (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:901-918.

Mehta, P. K. and Griendling, K. K. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C82-C97.

Michel, J. B., De, R. N., Plissonnier, D., Anidjar, S., Salzmann, J. L., and Levy, B. (1990) Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 1, S4-11.

Mikhail, N., Fukuda, N., Tremblay, J., and Hamet, P. (1993) Platelets, growth factors, and vascular smooth-muscle cells in hypertension and diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 6, S64-S74.

Min, L. J., Mogi, M., Li, J. M., Iwanami, J., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2005) Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 97, 434-442.

Miserey, S. and Clauser, E. (1998) [Angiotensin II receptors: classification, structure, and signal transduction]. *Therapie* 53, 205-211.

Miwa, S., Iwamuro, Y., Zhang, X. F., Inoki, T., Okamoto, Y., Okazawa, M., and Masaki, T. (1999) Ca²⁺ entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn J Pharmacol* 80, 281-288.

Mulvany, M. J. (1993) Vascular remodelling in hypertension. *Eur Heart J* 14 Suppl C, 2-4.

Naftilan, A. J., Zuo, W. M., Inglefinger, J., Ryan, T. J., Jr., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1991) Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest* 87, 1300-1311.

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases .
<http://kidney.niddk.nih.gov/Kudiseases/pubs/kdictionary/F-J.htm>. 2008.
Ref Type: Generic

Neylon, C. B. (1999) Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 149-153.

Ohtsu, H., Dempsey, P. J., Frank, G. D., Brailoiu, E., Higuchi, S., Suzuki, H., Nakashima, H., Eguchi, K., and Eguchi, S. (2006) ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, e133-e137.

Okamoto, K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27, 282-293.

Oudart, N. (2005) [The renin-angiotensin system: current data]. *Ann Pharm Fr* 63, 144-153.

Palaparti, A., Ge, C., and Anand-Srivastava, M. B. (1999) Angiotensin II enhances the expression of G α in A10 cells (smooth muscle):

relationship with adenylyl cyclase activity. *Arch Biochem Biophys* 365, 113-122.

Paquet, J. L., Baudouin-Legros, M., Marche, P., and Meyer, P. (1989) Enhanced proliferating activity of cultured smooth muscle cells from SHR. *Am J Hypertens* 2, 108-110.

Pierce, K. L., Tohgo, A., Ahn, S., Field, M. E., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2001) Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J Biol Chem* 276, 23155-23160.

Pinto, Y. M., M. Paul, and D. Ganten. 1998. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc. Res.* 39:77-88.

Pinzani, M. and Marra, F. (2001) Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21, 397-416.

Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griending, K. K., and Harrison, D. G. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97, 1916-1923.

Rao, G. N. (1996) Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* 13, 713-719.

Reynolds, C. M., Eguchi, S., Frank, G. D., and Motley, E. D. (2002) Signaling mechanisms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 39, 525-529.

Rosen, B., Barg, J., and Zimlichman, R. (1999) The effects of angiotensin II, endothelin-1, and protein kinase C inhibitor on DNA synthesis and intracellular calcium mobilization in vascular smooth muscle cells from young normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 12, 1243-1251.

Rosendorff, C. (1998) Vascular hypertrophy in hypertension: role of the renin-angiotensin system. *Mt Sinai J Med* 65, 108-117.

Saha, S., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2008) Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 86, 190-198.

Sarzani, R., Arnaldi, G., and Chobanian, A. V. (1991) Hypertension-induced changes of platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart. *Hypertension* 17, 888-895.

Satoh, C., Fukuda, N., Hu, W. Y., Nakayama, M., Kishioka, H., and Kanmatsuse, K. (2001) Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 37, 108-118.

Savage, C. R., Jr., Inagami, T., and Cohen, S. (1972) The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 247, 7612-7621.

Sayeski, P. P. and Ali, M. S. (2003) The critical role of c-Src and the Shc/Grb2/ERK2 signaling pathway in angiotensin II-dependent VSMC proliferation. *Exp Cell Res* 287, 339-349.

Sayeski, P. P., Ali, M. S., Semeniuk, D. J., Doan, T. N., and Bernstein, K. E. (1998) Angiotensin II signal transduction pathways. *Regul Pept* 78, 19-29.

Sayeski, P. P. and Bernstein, K. E. (2001) Signal transduction mechanisms of the angiotensin II type AT(1)-receptor: looking beyond the heterotrimeric G protein paradigm. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2, 4-10.

Schiffrin, E. L. (2003) The angiotensin-endothelin relationship: does it play a role in cardiovascular and renal pathophysiology? *J Hypertens* 21, 2245-2247.

Schiffrin, E. L. (2005) Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43, 19-29.

Schiffrin, E. L. (1995) Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 25, 1135-1143.

Schiffrin, E. L. (1998) Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. *J Hypertens* 16, 1891-1895.

Schiffrin, E. L. and Touyz, R. M. (1998) Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3, S2-13.

Schmitz, U. and Berk, B. C. (1997) Angiotensin II signal transduction: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Trends Endocrinol Metab* 8, 261-266.

Shah, B. H., Neithardt, A., Chu, D. B., Shah, F. B., and Catt, K. J. (2006) Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *J Cell Physiol* 206, 47-57.

Shichiri, M., Yokokura, M., Marumo, F., and Hirata, Y. (2000) Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 989-997.

Shimada, K., Takahashi, M., and Tanzawa, K. (1994) Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 269, 18275-18278.

Shirai, H., Takahashi, K., Katada, T., and Inagami, T. (1995) Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 25, 726-730.

Sirous, Z. N., Fleming, J. B., and Khalil, R. A. (2001) Endothelin-1 enhances eicosanoids-induced coronary smooth muscle contraction by activating specific protein kinase C isoforms. *Hypertension* 37, 497-504.

Skeggs, L. T., Kahn, J. R., Lentz, K., and Shumway, N. P. (1957) The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J Exp Med* 106, 439-453.

Skeggs, L. T., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1956a) The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 103, 295-299.

Skeggs, L. T., Lentz, K. E., Kahn, J. R., Shumway, N. P., and Woods, K. R. (1956b) The amino acid sequence of hypertensin. II. *J Exp Med* 104, 193-197.

Skeggs, L. T., Marsh, W. H., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1955) Amino acid composition and electrophoretic properties of hypertensin I. *J Exp Med* 102, 435-440.

Smith, L., Payne, J. A., Sedeek, M. H., Granger, J. P., and Khalil, R. A. (2003) Endothelin-induced increases in Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction are enhanced during high-salt diet. *Hypertension* 41, 787-793.

Société d'hypertension canadienne . <http://hypertension.ca>. 2008.
Ref Type: Generic

Spieker, L. E., Noll, G., Ruschitzka, F. T., Maier, W., and Luscher, T. F. (2000) Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. *J Hum Hypertens* 14, 617-630.

Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Isumi, Y., Nakao, K., Kangawa, K., and Matsuo, H. (2001) Regulation of endothelin-1 production in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 37, 25-40.

- Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L., Versari, D., and Salvetti, A. (2006) Endothelium, aging, and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 8, 84-89.
- Tallquist, M. and Kazlauskas, A. (2004) PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 205-213.
- Terragno, N. A. and Terragno, A. (1977) Role of naturally occurring vasoactive principles in hypertension. State of the art. *Mayo Clin Proc* 52, 449-458.
- Touyz, R. M. (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44, 248-252.
- Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (2003) Role of endothelin in human hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 533-541.
- Touyz, R. M., Wu, X. H., He, G., Salomon, S., and Schiffrin, E. L. (2002) Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39, 479-485.
- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Hohle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., and Zhu, Y. Z. (1996) Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 14, S95-103.
- Ushio-Fukai, M., Griending, K. K., Becker, P. L., Hilenski, L., Halleran, S., and Alexander, R. W. (2001) Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 489-495.
- Viel, E. C., Benkirane, K., Javeshghani, D., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2008) Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H281-H288.
- Voisin, L., Foisy, S., Giasson, E., Lambert, C., Moreau, P., and Meloche, S. (2002) EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C446-C455.
- Wang, C., Jayadev, S., and Escobedo, J. A. (1995) Identification of a domain in the angiotensin II type 1 receptor determining Gq coupling by the use of receptor chimeras. *J Biol Chem* 270, 16677-16682.
- Watanabe, T., Kusumoto, K., Kitayoshi, T., and Shimamoto, N. (1989) Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in in vivo

and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5, S108-S111.

Watts, V. J. and Neve, K. A. (2005) Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 106, 405-421.

Weber, H., Webb, M. L., Serafino, R., Taylor, D. S., Moreland, S., Norman, J., and Molloy, C. J. (1994) Endothelin-1 and angiotensin-II stimulate delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for common signaling mechanisms. *Mol Endocrinol* 8, 148-158.

Weber, K. T. and Janicki, J. S. (1989) Angiotensin and the remodelling of the myocardium. *Br J Clin Pharmacol* 28 Suppl 2, 141S-149S.

Xi, X. P., Graf, K., Goetze, S., Fleck, E., Hsueh, W. A., and Law, R. E. (1999) Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 73-82.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.

Yang, X., Zhu, M. J., Sreejayan, N., Ren, J., and Du, M. (2005) Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells* 20, 263-270.

Yin, G., Yan, C., and Berk, B. C. (2003) Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 780-783.

Yoshiji, H., Kuriyama, S., and Fukui, H. (2002) Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial growth factor. *Tumour Biol* 23, 348-356.

Yoshiji, H., Kuriyama, S., and Fukui, H. (2007a) Blockade of renin-angiotensin system in antifibrotic therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1, S93-S95.

Yoshiji, H., Noguchi, R., Ikenaka, Y., Kitade, M., Kaji, K., Tsujimoto, T., Uemura, M., and Fukui, H. (2007b) Renin-angiotensin system inhibitors as therapeutic alternatives in the treatment of chronic liver diseases. *Curr Med Chem* 14, 2749-2754.

Zidek, W. and Vetter, H. (1987) Calcium and primary hypertension. *Nephron* 47 Suppl 1, 13-20.

