

Université de Montréal

**L'acide salicylique prévient la liaison de  
l'endothéline-1 dans les myocytes de rat  
adulte**

Par

Hala Farhat

Département de Biochimie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise sciences (M.S) en Biochimie

Janvier 2005

© Hala Farhat, 2005



W

4

U58

2005

v. 168

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'acide salicylique prévient la liaison de  
l'endothéline-1 dans les myocytes de rat  
adulte**

Présenté par :  
Hala Farhat

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Dr Tony Antakly  
Directeur de recherche : Dr Bruce G. Allen  
Membre du Jury : Dr Martin G. Sirois

## RÉSUMÉ

---

Les récepteurs à l'endothéline-1 (ET-1), ETA et ETB, forment des complexes récepteur-ligand fermement liés, ce qui complique notre compréhension des propriétés de ces récepteurs. Quoique des études à l'aide de ligands radio-marqués aient démontré que la liaison de l'ET-1 au récepteur ETA soit essentiellement irréversible, l'ETA est internalisé de façon dépendante de son ligand, il relâche l'ET-1 pour être ensuite recyclé à la surface cellulaire. L'acide salicylique (AS) réduit la liaison de l'ET-1 ( $IC_{50} = 5-10$  mM) au récepteur ETA recombinant sur membrane isolée en favorisant la dissociation de l' $[^{125}I]ET-1$ . Dans cette étude, l'AS (5 mM) n'a pas affecté la liaison de  $[^{125}I]ET-1$  à des myocytes ventriculaires intacts de rats. Le manque d'effet n'était pas dû à l'internalisation des complexes récepteur-ligand. Cependant, 100 mM d'AS a réduit de façon significative la liaison de  $[^{125}I]ET-1$  aux myocytes intacts de même qu'aux membranes isolées. L'AS a induit la phosphorylation de la MAP kinase p42/44 ERK ainsi que d'une protéine de 40-kDa non identifiée, sur le motif d'activation thréonine-acide glutamique-tyrosine (T-E-Y). La phosphorylation de ERK a été réduite par l'inhibiteur de MEK, PD98059. La phosphorylation de p40 a été réduite par le SB203580, un inhibiteur de la MAP kinase p38, mais pas par le PD98059. Cependant, l'inhibition des MAP kinases ERK et p38 n'a pas affecté la capacité de l'AS 100 mM d'induire la dissociation de l' $[^{125}I]ET-1$ . Ces résultats suggèrent que, dans le myocyte ventriculaire, l'acide salicylique affecte les cinétiques de liaison de l'ET-1 et suggèrent la présence possible d'un site de liaison allostérique qui module la dissociation des complexes ligand-récepteur impliquant l'ET-1 en réponse à un médiateur encore inconnu.

**Mots clés :** endothéline, les récepteurs à l'ET-1 (ETA et ETB), les agents inotropiques, MAPK, cardiomyocytes.

## SUMMARY

---

Endothelin-1 (ET-1) receptors, ETA and ETB, form tight receptor–ligand complexes that complicate our understanding of the properties of these receptors. Although radioligand–binding studies have demonstrated the binding of ET-1 to ETA to be essentially irreversible, ETA internalize in a ligand-dependent manner, release ET-1, and then recycle to the cell surface. Salicylic acid (SA) reduces ET-1 binding ( $IC_{50} = 5\text{-}10$  mM) to recombinant ETA in isolated membranes by promoting dissociation of [ $^{125}$ I]ET-1. In the present study, SA (5 mM) did not alter [ $^{125}$ I]ET-1 binding to intact adult rat ventricular myocytes. The lack of effect was not due to internalization of receptor–ligand complexes. However, 100 mM SA significantly reduced [ $^{125}$ I]ET-1 binding to both intact myocytes and isolated membranes. SA induced the phosphorylation p42/44 extracellular signal-regulated kinase (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase and an unidentified 40-kDa protein on the activating threonine-glutamic acid-tyrosine (T-E-Y) motif. ERK phosphorylation was reduced by a MAP kinase kinase (MEK) inhibitor, PD98059. Phosphorylation of p40 was reduced by the p38 MAP kinase inhibitor SB203580, but not PD98059. However, inhibition of ERK or p38 MAP kinases did not alter the ability of 100 mM SA to induce dissociation of [ $^{125}$ I]ET-1. These results suggest that, in the ventricular myocyte, salicylic acid alters the kinetics of ET-1 binding. The results also suggest an allosteric binding site may be present that modulates the dissociation of ET-1 receptor–ligand complexes in response to an as-of-yet unidentified mediator.

**Key Words:** endothelin, endothelin receptors (ETA and ETB), inotropic agents, MAPK, cardiomyocytes.

## TABLE DES MATIÈRES

---

Résumé .....	iii
Summary.....	iv
Table de matières .....	v
Liste des figures et tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
CHAPITRE 1. Introduction et revue de littérature .....	1
I    L'ENDOCARDE.....	3
II   LE MYOCARDE.....	4
III  L'ÉPICARDE.....	5
IV   LES CARDIOMYOCYTES.....	6
V    L'HYPERTROPHIE.....	9
VI   L'ENDOTHÉLINE.....	10
VI.1  La synthèse de l'ET-1 .....	12
VI.2  L'ET-1 et le cardiomyocyte .....	14
VII  LES RÉCEPTEURS À L'ET-1 .....	17
VII.1  Les sous types B du récepteur.....	18
VII.2  Les sous types A du récepteur.....	20
VIII LA PHYSIOLOGIE DE LIAISON D'ET-1 SUR L'ETR .....	21
IX   LES ANTAGONISTES D'ETRs.....	23
X    L'ACIDE SALICYLIQUE.....	24
X.1   La pharmacologie de l'acide salicylique.....	25
X.2   La voie de signalisation de l'acide salicylique.....	25
X.3   L'acide salicylique et le système cardiovasculaire.....	26
XI   LA FAMILLE DES RCPGs.....	27
XII  LES VOIES DE MAPK .....	29
XIII HYPOTHÈSE ET BUT DE L'ÉTUDE.....	34
CHAPITRE 2. ARTICLE : <i>Salicylic Acid Alters Endothelin-1 Binding in Intact Adult Rat Ventricular Myocytes</i> .....	36
Abstract .....	40
Introduction.....	41

Materials and methods.....	44
Results.....	49
Discussion.....	53
References.....	57
Figure legends.....	62
Figures.....	67
CHAPITRE 3. Discussion générale.....	75
ANNEXE.....	84
RÉFÉRENCES.....	86



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

---

Figure 1.	Une présentation schématique des trois tuniques cardiaques .....	2
Figure 2.	Une présentation schématique de l'endocarde .....	3
Figure 3.	Une présentation schématique du myocarde .....	5
Figure 4.	Une présentation schématique de l'épicarde .....	6
Figure 5.	Photo en microscopie confocale d'un cardiomyocyte.....	7
Figure 6.	Voie de la biosynthèse et la séquence peptidique de l'ET-1 .....	13
Figure 7.	Structure secondaire du récepteur ETB.....	19
Figure 8.	Une vue simplifiée des voies essentielles de la cascade des MAPK ...	30
Figure 9.	Les connections possibles entre les composantes qui mènent à l'activation de la voie ERK MAPK .....	32
Figure 10.	Présentation schématique des états intermédiaires menant à l'état irréversible du complexe ET-1/ETR. ....	78
 <b>ARTICLE : <i>Salicylic Acid Alters Endothelin-1 Binding in Intact Adult Rat Ventricular Myocytes</i></b>		
Figure 1.	Effect of salicylic acid upon the binding and dissociation of ET-1	67
Figure 2.	Effect of temperature on [ <sup>125</sup> I]ET-1 binding in the presence and absence of salicylic acid.....	68
Figure 3.	High concentrations of salicylic acid reduce ET-1 binding in intact myocytes.....	69
Figure 4.	Effect of salicylic acid upon ET-1 binding in isolated membranes	70
Figure 5.	Effect of salicylic acid upon ERK phosphorylation.....	71
Figure 6.	Effect of MAP kinase inhibitors upon p42 and p44 ERK phosphorylation.....	72
Figure 7.	Effect of MAP kinase inhibitors upon p40 .....	73
Figure 8.	Effect of PD98059 and SB203580 upon the binding and dissociation of ET-1.....	74

Figure 11. Salicylic acid displayed no receptor subtype-specific effects. .... 85

Table 1: L'affinité de liaison des ligands aux différents variants de l'ETA..... 21

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ADN .....	Acide deoxyribonucléique
AMP .....	Adénosine monophosphate
ANF .....	Facteurs natriurétiques
Ang II.....	Angiotensine II
AP-1.....	<i>Activator Protein-1</i>
Arg.....	Arginine
ARN.....	Acide ribonucléique
AS.....	Acide salicylique
BQ610.....	<i>Homopiperidiny-CO-Leu-D-N<sup>im</sup>-Formyl-D-Trp</i>
BQ788.....	N- <i>cis</i> -2,6-diméthylpiperidinocarbonyl-L- $\gamma$ -méthylleucyl-D-1-méthoxycarbonultryptophanyl-D-norleucine
Br2SA.....	Acide 3,5-dibromosalicylique
C <sub>T</sub> .....	Extrémité carboxyl - terminale
Cys.....	Cystéine
ECE .....	Enzyme de conversion de l'endothéline
ERK.....	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
ET .....	Endothéline
ETR .....	Récepteur d'endothéline
FGF.....	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GDP.....	Guanosine diphosphate
GMP .....	Guanosine monophosphate
GPCR.....	Récepteurs Couplés aux Protéines G
GTP .....	Guanosine triphosphate
His .....	Histidine
I $\kappa$ B.....	Inhibiteur du NF- $\kappa$ B
I2SA.....	acide 3,5-diiodosalicylique
IC <sub>50</sub> .....	La concentration d'inhibition de 50%
IEG .....	<i>Immediate Early Gene</i>

IP3 .....	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IRL-1620.....	<i>Succinyl-[Glu9,Ala11,5]-endothelin-1(8 - 21)</i>
JNK.....	<i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase</i>
K <sub>d</sub> .....	Constante de dissociation
K <sub>i</sub> .....	Constante d'inhibition
Lys.....	Lysine
MAPK.....	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MKK/MEK .....	MAPK Kinase
MSK-1 .....	<i>Mitogen and Stress-activated protein Kinase-1</i>
NEP 24.11.....	<i>Neutral (metallo) endopeptidase</i>
NF-κB.....	<i>Nuclear transcription Factor kappa B</i>
NO .....	Monooxyde d'azote
PIP2 .....	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
RTK.....	Récepteur Tyrosine Kinase
RT-PCR .....	<i>Reverse Trascriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
S6C .....	Sarafotoxine 6C
Ser.....	Sérine
SIPK .....	<i>Salicylic acid-Induced Protein Kinase</i>
TGF .....	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF-α.....	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tyr .....	Tyrosine
WIPK.....	<i>Wound-Induced Protein Kinase</i>

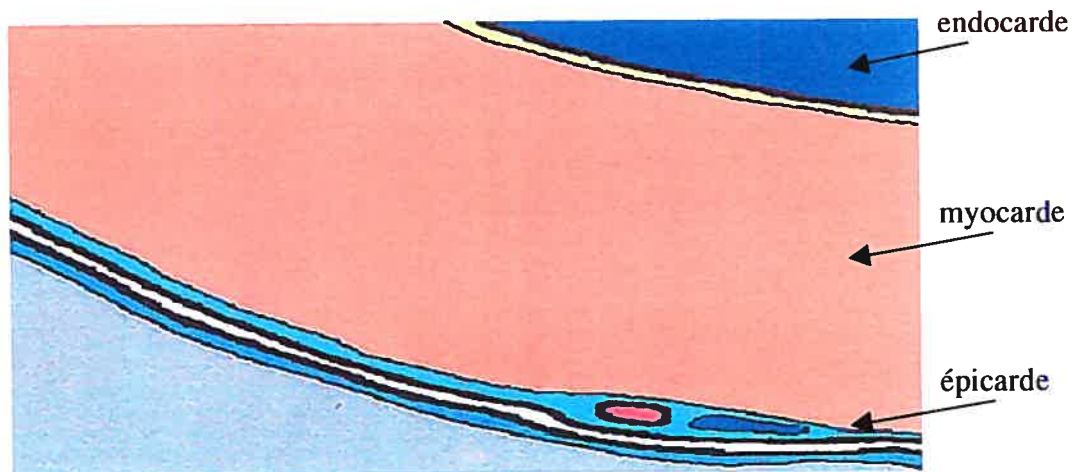
## **CHAPITRE 1. INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## I - INTRODUCTION

---

Les travées myocardiques (constituées par l'enfilade solidaire et anastomosée des cellules cardiaques) s'insèrent (comme des rubans) par leurs extrémités à un anneau fibreux (ou « charpente fibreuse » ou « squelette fibreux ») situé horizontalement sur l'organe au niveau des orifices valvulaires et des troncs de l'aorte et de l'artère pulmonaire, il existe donc en fait quatre anneaux fibreux associés (Alberts, 1995). Les masses musculaires des chambres cardiaques s'insèrent sur ces anneaux permettant de décrire des contingents indépendants pour chaque oreillette et chaque ventricule ainsi que des contingents communs aux deux oreillettes et aux deux ventricules. Les travées myocardiques donnent ainsi l'image d'une entité contractile qui décrit un mouvement d'encorbellement (de saillie c'est à dire un mouvement en forme de voûte) autour des cavités cardiaques (Alberts, 1995 ; Bergman *et al.*, 1996).

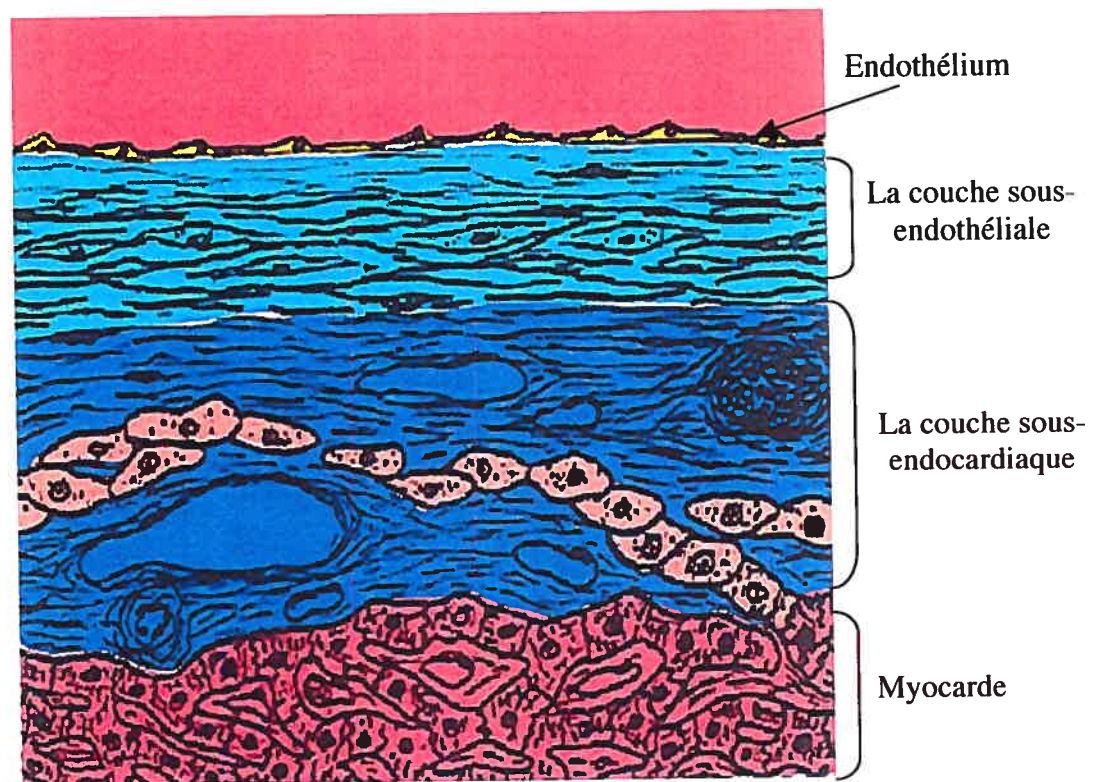
Les trois tuniques cardiaques sont successivement, à partir de la lumière, l'endocarde, le myocarde et l'épicarde (Alberts, 1995 ; Bergman *et al.*, 1996 ; Cross *et al.*, 1995).



**Figure 1 :** Une présentation schématique des trois tuniques cardiaques : l'endocarde, le myocarde et l'épicarde.

## I - L'ENDOCARDE

L'endocarde tapisse les cavités cardiaques, les valves et les cordages. Il comporte un endothélium (épithélium pavimenteux simple) en continuité avec celui des gros vaisseaux caves, pulmonaires et aortique ; il est associé par l'intermédiaire de sa lame basale à une couche sous-endothéliale de tissu fibro-élastique auquel se mêlent des cellules musculaires lisses. Au niveau des cordages et des valves, il est au contact d'un tissu conjonctif dense, tandis qu'au niveau des cavités il est séparé du myocarde par une couche sous-endocardique de tissu conjonctif lâche bien vascularisé renfermant des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins de petit calibre et dans les ventricules les ramifications du tissu cardionecteur du réseau de purkinje (Alberts, 1995 ; Bergman *et al.*, 1996 ; Cross *et al.*, 1995).



**Figure 2 :** Une présentation schématique de l'endocarde.

## II - LE MYOCARDE

Le myocarde constitue l'origine fondamentale de la paroi cardiaque. Il est plus épais là où les pressions sont plus fortes, ventricules plus qu'oreillettes et ventricule gauche encore plus que ventricule droit. Le myocarde est organisé sous forme de travées myocardiques constituées de cellules musculaires cardiaques (myocytes). Ces cellules sont liées l'une à l'autre par leurs extrémités ; entre ces travées, le tissu conjonctif est riche en capillaires sanguins et lymphatiques ainsi qu'en fibres nerveuses. Il existe trois variétés de cardiomyocytes : les cardiomyocytes contractiles, les cellules myoendocrines et les cellules cardionectrices (Alberts, 1995 ; Bergman *et al.*, 1996 ; Cross *et al.*, 1995).

Les cellules du système cardionecteur sont organisées en « nœuds » (cellules nodales constituant le nœud auriculaire et le nœud atrio-ventriculaire) et en « faisceaux ». Le nœud auriculaire est responsable du rythme sinusal. Ce nœud est relié au nœud auriculo-ventriculaire par trois faisceaux de connexion internodaux l'influx est conduit ainsi par les cardiomyocytes contractiles, mais il reste « bloqué » par le tissu conjonctif de l'anneau fibreux de cœur : Le passage de l'influx des oreillettes vers les ventricules ne peut donc se faire que par perforation anatomique de l'anneau fibreux. C'est le tronc du faisceau de His, issu du nœud auriculo-ventriculaire qui joue ce rôle. Il se divise ensuite en deux branches principales puis se ramifie dans l'ensemble des parois ventriculaires en réseau des faisceaux de Purkinje (Alberts, 1995; Bergman *et al.*, 1996; Cross *et al.*, 1995; Dadoune, 1990).



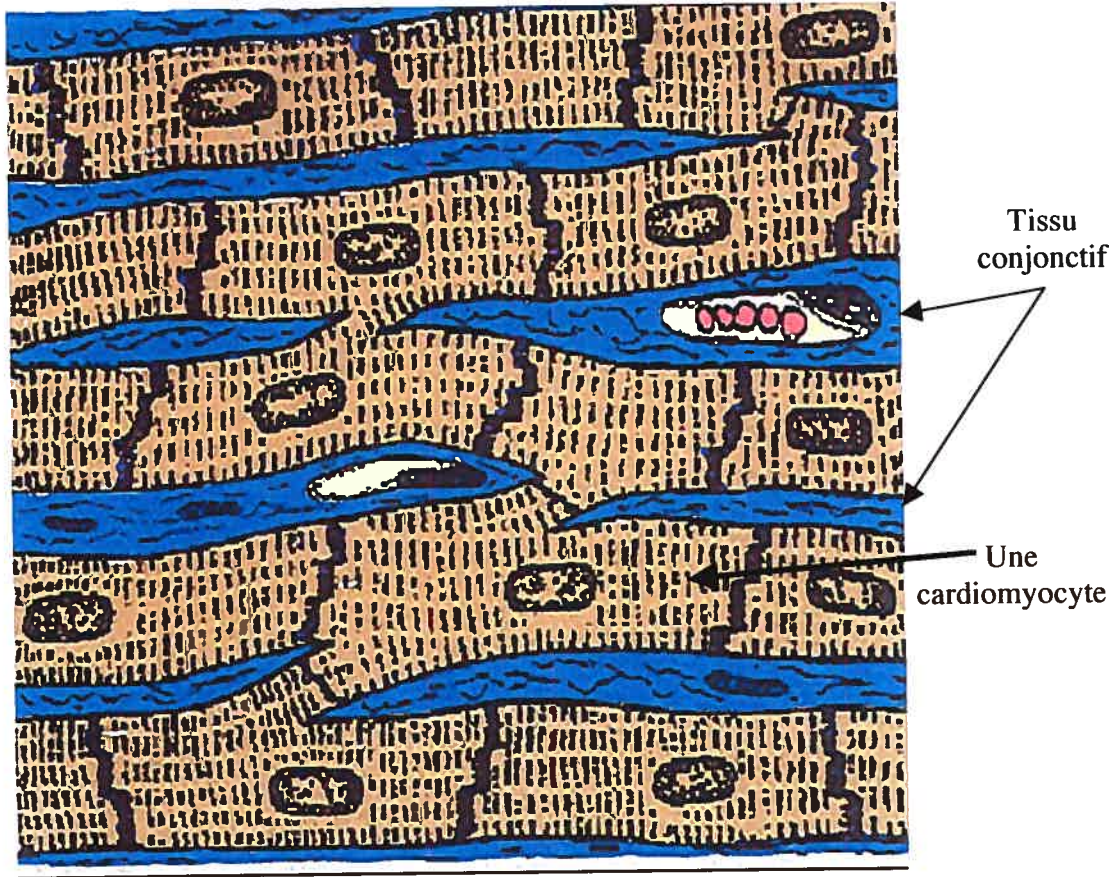
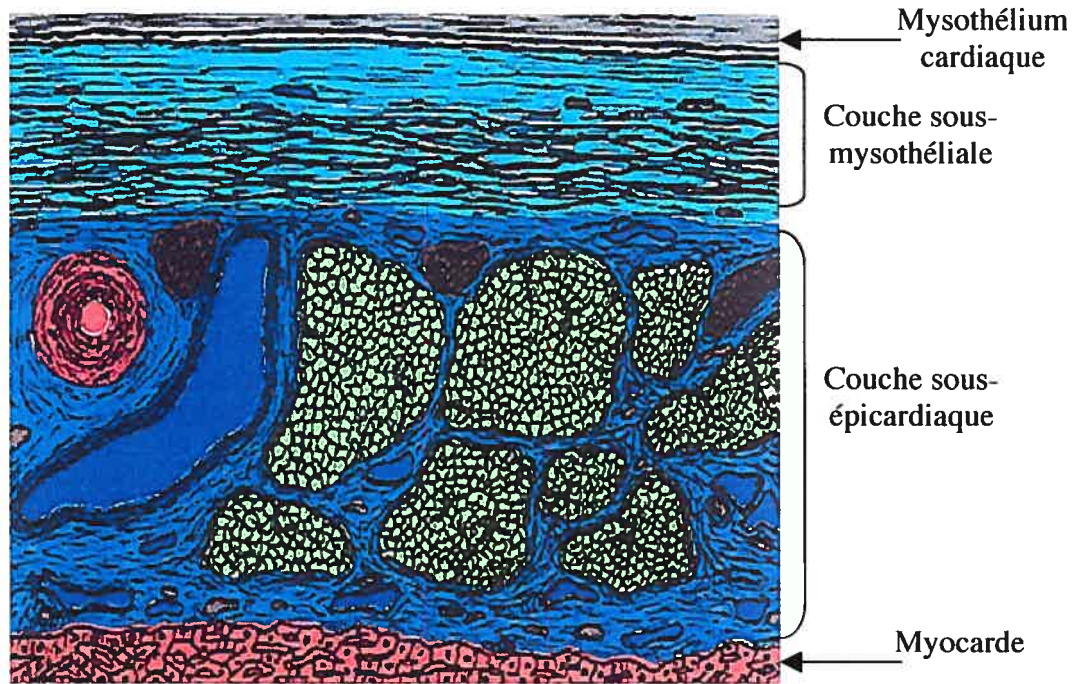


Figure 3 : Une présentation schématique du myocarde.

### III - L'ÉPICARDE

L'épicarde tapisse l'extérieur du cœur et est en fait le feuillet viscéral de la séreuse péricardique qui se réfléchit ensuite au niveau des gros troncs artériels pour se continuer par le feuillet pariétal (médiastinal) du péricarde. Il est donc constitué d'un mésothélium (épithélium pavimenteux simple) reposant par l'intermédiaire de sa lame basale sur une couche sous-mésothéliale conjonctive comportant en particulier des fibres élastiques. L'épicarde reste séparé du myocarde par une couche sous-épicardique où l'on observe une paisse couche de tissu adipeux, des nerfs et les vaisseaux coronaires (artères et veines coronaires et leurs branches) (Alberts, 1995; Fawcett, 1994).



**Figure 4 :** Une présentation schématique de l'épicaire

#### **IV - LES CARDIOMYOCYTES**

Les oreillettes et les ventricules du cœur sont composés d'un grand nombre de cellules. Les cardiomyocytes sont des cellules allongées reliées entre elles par des jonctions intercellulaires. Les battements cardiaques et leur rythme sont déterminés par l'activité intrinsèque des cardiomyocytes du nœud sino-auriculaire. En effet, les cardiomyocytes sont facilement excitables ; leur dépolarisation et repolarisation rythmique est indépendante du système nerveux. Le système nerveux végétatif exerce toutefois une influence sur le rythme des contractions : schématiquement, le parasymphatique (acétylcholine) ralentit le cœur alors que le sympathique (noradrénaline) l'accélère (Alberts, 1995; Bergman *et al.*, 1996; Cross *et al.*, 1995; Dadoune, 1990).

Les cardiomyocytes sont entourés par un riche réseau de vaisseaux sanguins et sont enrobés dans une matrice de tissu conjonctif. Dans cette matrice, sont également présents des nerfs, des vaisseaux lymphatiques ainsi que des cellules interstitielles telles que des

cellules inflammatoires, des fibroblastes, des péricytes et des cellules mésenchymateuses non différenciées. On peut donc schématiquement séparer le tissu cardiaque en deux compartiments : un compartiment cardiomyocytaire responsable de la fonction contractile et un compartiment interstitiel de soutien (Alberts, 1995; Bergman *et al.*, 1996; Cross *et al.*, 1995; Dadoune, 1990).



**Figure 5 :** Photo en microscopie confocale d'un cardiomyocyte.

Les cardiomyocytes sont cylindriques, de 80 à 100  $\mu\text{m}$  de long et 10-15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ils contiennent un ou deux noyaux oblongs centrés dans la cellule. Leurs extrémités ont un aspect en escalier qui correspond aux disques intercalaires (Alberts, 1995; Dadoune, 1990). Il s'agit de jonctions intermyocytaires (voir figure 5). La membrane plasmique des cardiomyocytes est caractérisée par des invaginations tubulaires formant le système T. Ce système d'invagination permet un contact plus direct entre le milieu extracellulaire et les régions profondes de la cellule, plus précisément avec le réticulum sarcoplasmique, et permet le couplage "excitation-contraction" du myocarde ventriculaire (Alberts, 1995; Dadoune, 1990). Les filaments contractiles occupent 50% du cytoplasme des cardiomyocytes. La matrice interfibrillaire est composée de

mitochondries, de réticulum sarcoplasmique et des tubules T, et de particules de glycogène. Les myofibrilles sont des éléments contractiles agencés de façon extrêmement ordonnée. Une périodicité claire peut être observée en microscopie optique : des bandes sombres, anisotropiques dites bandes A et des bandes claires moins anisotropiques dites bandes I. Les bandes I sont traversées par une zone large et sombre, la strie Z. L'ensemble des éléments contractiles entre deux stries Z consécutives constitue le sarcomère. Celui-ci est l'unité contractile du muscle cardiaque. Les myofibrilles constituant le sarcomère sont majoritairement la myosine et l'actine (Alberts, 1995; Gartner *et al.*, 1997).

Ces cellules constituent de 70 à 80% de la masse du cœur adulte. Les myocytes du ventricule adulte ont été utilisées pour délinéer la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G qui règlent la mobilité du calcium à l'intérieur de la cellule et le processus de contraction (Alberts, 1995; Gartner *et al.*, 1997). Cependant, ces cellules sont moins utiles pour examiner la croissance cellulaire et la plupart des études sur l'hypertrophie des cardiomyocytes ont utilisé des myocytes néo-nataux en culture primaire. Pendant le remodelage cardiaque, l'hypertrophie des cardiomyocytes cause une augmentation dans la masse cardiaque accompagnée d'un agrandissement de la taille des cellules, une surproduction des protéines contractiles comme la chaîne lourde de myosine, et aussi l'expression des gènes embryonnaires comme les gènes codant pour les facteurs natriuretiques (ANF) (Alberts, 1995; Bergman *et al.*, 1996; Cross *et al.*, 1995; Dadoune, 1990).

Les ventricules cardiaques sont constitués de différents types cellulaires remplissant chacun une fonction précise. Lorsqu'un travail supplémentaire est demandé au cœur ou lorsqu'un stimulus est délivré (hormone, facteur de croissance, etc...), les cellules y répondent différemment selon leur type. On parle de réponse inadéquate et donc pathologique, lorsque la réponse des cellules entraîne un remodelage du myocarde conduisant à terme à une perte des performances cardiaques. Ainsi, ne pourra-t-on pas parler de processus pathologique chez le sportif dont le muscle cardiaque s'hypertrophie en réponse à une demande accrue de son organisme. Cette hypertrophie est une réponse physiologique qui tend à augmenter les performances cardiaques (Alberts, 1995; Bergman *et al.*, 1996; Cross *et al.*, 1995; Dadoune, 1990).

## V - L'HYPERTROPHIE

L'hypertrophie cardiaque est un processus physiologique adaptatif qui arrive en réponse à des stimuli extracellulaires, tels que le stress mécanique, la stimulation par les agonistes des RCPG, les facteurs de croissance ou les cytokines. En effet, l'hypertrophie cardiaque est causée par l'augmentation de la tension hémodynamique suite à la surcharge de pression et de volume de cet organe. Ceci est caractérisé par des changements dans la structure et le contenu des cellules musculaires du cœur et de vaisseaux sanguins. L'endommagement des cellules produit suite à l'hypertrophie est la conséquence du processus de remodelage qui implique les deux types majeurs de cellules du cœur : les cardiomyocytes et les fibroblastes (Bueno *et al.*, 2000; Cooper, 1997). Les cardiomyocytes sont différenciés à partir des cellules souches qui sont responsables de la réponse contractile du cœur par l'activation des RCPGs. En effet, la stimulation soutenue de RCPGs telle que celle produite par les récepteurs adrénergiques, l'ET-1 et l'angiotensine II (AngII), aboutie souvent à l'hypertrophie cardiaque. Ceci due au fait que ces agents mènent à la croissance cellulaire et à l'accumulation de la matrice extracellulaire (Bueno *et al.*, 2000).

En plus des ses effets vasoactifs, l'ET-1 cause l'hypertrophie des myocytes cardiaques isolés. En 1990, il a été montré pour la première fois que l'ET-1 peut agir directement sur les myocytes cardiaques - des cellules différenciées et qui expriment principalement l'ETA – en causant l'hypertrophie (Bueno *et al.*, 2000; Shubeita *et al.*, 1990; Sugden *et al.*, 1998a). Les myocytes exposés à l'ET-1 développent la myofibrillogène et montrent une dysfonction dans le modèle d'expression des gènes. Ceci est aussi accompagné par des phénotypes qui sont normalement associés au processus hypertrophique (Sugden *et al.*, 1998a), tels que (1) l'augmentation du volume cellulaire des myocytes et le contenu en protéines en absence du phénomène de division cellulaire, (2) l'expression précoce mais transitoire des facteurs de transcription qui appartiennent à la famille IEG (*Immediate Early Gene*) comme c-jun et c-fos (3) l'expression précoce et permanente du peptide natriuretique de type B, (4) la re-expression des gènes fœtaux et des protéines correspondantes, comme la protéine  $\alpha$ -actine de muscle squelettique et la chaîne lourde de la  $\beta$ -myosine et (5) finalement, la surexpression des gènes constitutifs

tels que la chaîne légère de la myosine ventriculaire, l' $\alpha$ -actine de muscle cardiaque et les canaux d'échange  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Il est aussi connu que l'ET-1 augmente la contractilité cardiaque. Il est fortement possible que la réponse hypertrophique produite par l'ET-1 soit transmise par cette action. De plus, en agissant de façon autocrine ou paracrine, ET-1 peut transmettre la réponse hypertrophique produite par l'AngII ou par le stress mécanique dans les myocytes en culture primaire (Ito *et al.*, 1993; Sugden *et al.*, 1998a; Yamazaki *et al.*, 1996).

## VI - L'ENDOTHÉLINE

L'endothéline (ET) est un polypeptide formé d'une chaîne de 21 acides aminés avec deux ponts disulfures reliant des molécules de cystéine (figure 6). Elle a été purifiée et séquencée la première fois en 1988 à partir des cellules endothéliales de l'aorte de porc, par une équipe d'investigateurs Japonais (Mayes, 2003; Yanagisawa *et al.*, 1988). On distingue l'ET-1, ET-2 et ET-3 qui se diffèrent par certains de leurs acides aminés. Ces isoformes ressemblent toutes à la sarafotoxine, un puissant vasoconstricteur contenu dans le venin de serpent (Masaki, 1998; Mayes, 2003; Okada *et al.*, 2002). L'ET-1, ET-2 et ET-3 sont exprimées à partir du même gène avec des localisations tissulaires et des fonctions spécifiques à chaque isoforme (Inoue *et al.*, 1989a; Mayes, 2003). L'ET a été trouvée dans le système cardio-vasculaire, respiratoire, gastro-intestinal, endocrine, urogénital, et les systèmes nerveux centraux, de même que dans le rein (Mayes, 2003; Oldroyd *et al.*, 2000; Rubanyi *et al.*, 1994; Simonson *et al.*, 1990).

L'ET-1 est synthétisée et relachée à partir des cellules endothéliales vers la circulation sanguine. La concentration plasmatique de l'ET-1 est très basse (1 fmole/ml) avec une courte demi-vie, moindre que sept minutes (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Levin, 1995; Okada *et al.*, 2002; Oldroyd *et al.*, 2000; Ortega Mateo *et al.*, 1997; Simonson *et al.*, 1990). Ceci suggère que l'ET-1 ne sert pas d'hormone endocrine, mais agirait plutôt au niveau local; paracrine sur les cellules musculaires sous-jacentes et autocrine sur les cellules endothéliales elles-mêmes (Gratton *et al.*, 1997; Mawji *et al.*, 2003; Mayes, 2003; Oldroyd *et al.*, 2000; Simonson *et al.*, 1990; Wanecek *et al.*, 2000). L'ET-1 est aussi exprimée par les cellules épithéliales, les cellules de la moelle osseuse, les

macrophages, les leucocytes, les cardiomyocytes, et les fibroblastes (Mayes, 2003; Rubanyi *et al.*, 1994; Teder *et al.*, 2000). L'ET-1 est l'isoforme fonctionnelle la plus abondante de cette protéine (Levin, 1995; Mayes, 2003). L'ET-1 joue plusieurs rôles physiologiques essentiels aux plans développementaux. Elle agit comme régulatrice dans la physiologie normale, y compris l'homeostasie cardio-vasculaire, l'équilibre du sel et de l'eau, et le développement du système respiratoire (Mayes, 2003; McCulloch *et al.*, 1996; Michel *et al.*, 2001). L'ET-1 est aussi considérée comme médiateur pathologique avec plusieurs effets nuisibles, y compris la vasoconstriction, la fibrose, l'hypertrophie vasculaire, et l'inflammation.

Cependant, aucune fonction physiologique n'a été identifiée pour l'ET-2, alors que l'ET-3, qui est abondante dans le tissu cérébral, peut être la responsable de la fonction neuronale de l'endotheline (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Mayes, 2003; Modesti *et al.*, 1999).

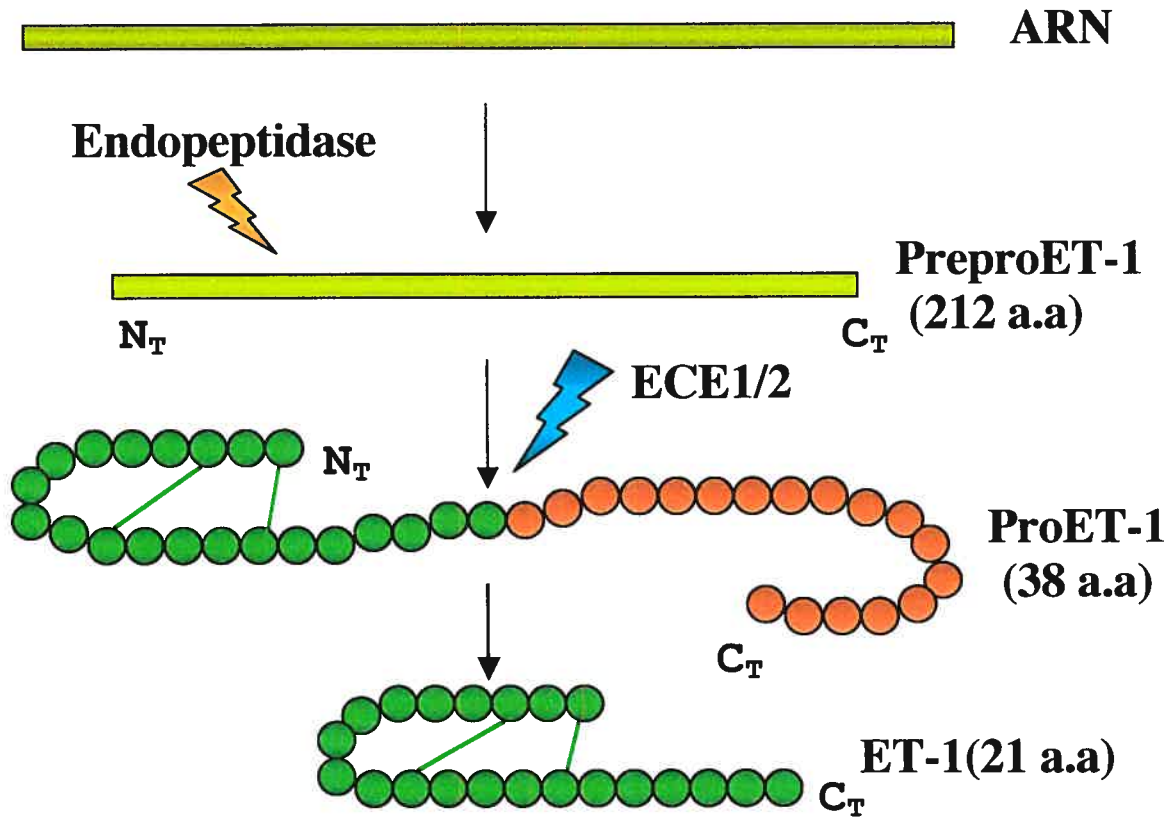
L'ET-1 est un peptide vasoactif très puissant qui reconnaît son RCPG (ETA et ETB) en déclenchant la cascade de signalisation de phospholipase C (Davenport *et al.*, 1993; Yanagisawa *et al.*, 1988). Une des propriétés les plus importantes de l'ET-1 est sa capacité à lier son récepteur de façon presque irréversible (Waggoner *et al.*, 1992). La liaison quasi-irréversible de l'ET-1 a plusieurs implications et conséquences pharmacologiques qui ont été récemment mises au point. Cette liaison de l'ET-1 a été proposée comme étant responsable de l'action prolongée de l'injection d'une faible quantité de cette drogue. En effet, l'administration d'une faible quantité d'ET-1 produit une réponse biphasique; une vasoconstriction – résultant de l'action autocrine de la protéine – suivie par une réponse vasodilatatrice – résultant de l'action paracrine de l'ET-1. Ceci peut être causé par la liaison quasi-irréversible de l'ET-1 sur l'ETR. Une autre conséquence à la liaison prolongée de l'ET-1 est que le niveau circulant de l'ET-1 ne représente pas la vraie quantité de cette protéine dans les tissus (Ferrari *et al.*, 1998). Finalement, la forte affinité envers son récepteur limite l'accès et la compétition des antagonistes de l'ET-1 aux récepteurs. En effet, la liaison de l'ET-1 sur son site spécifique empêche l'accès de l'antagoniste jusqu'à ce que l'ET-1 quitte le site et permette à l'antagoniste d'occuper des sites récemment accessibles (Talbot *et al.*,

2000). Ce simple fait peut être la cause de l'utilité limitée des antagonistes contre l'action de l'ET-1 endogène.

## **VI.1 - LA SYNTHÈSE DE L'ET-1**

Les trois isoformes de l'endothéline sont exprimées à partir de trois gènes différents et leur niveau d'expression est régulé au niveau de la transcription de l'ARNm (Inoue *et al.*, 1989b; Russell *et al.*, 1999; Wanecek *et al.*, 2000). Le premier transcrit est un peptide de 212 a.a. appelé la prépro-ET-1. Ce peptide est clivé sur deux sites basiques (Lys<sup>52</sup>-Arg<sup>53</sup> et Arg<sup>90</sup>-Arg<sup>91</sup>) par une endopeptidase pour donner un autre peptide intermédiaire de 38 a.a. appelé la pro ET-1. Cette étape peut être régulée par la pro-protéine convertase, une furine intervenant dans la voie de sécrétion constitutive de la protéine. La pro ET-1 est biologiquement moins active ( $\approx 140$  fois) que l'ET-1 qui se trouve dans la circulation. Pour générer cette forme mature (21 aa) la pro-hormone (pro ET-1) est finalement coupée par une métalloprotéase, l'enzyme de conversion de l'ET-1 (ECE-1), sur le site Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> dans la portion C<sub>T</sub> (figure 6) (Goraca, 2002; Hunley *et al.*, 2001; Krum *et al.*, 2001; Rubanyi *et al.*, 1994; Wanecek *et al.*, 2000).





**Figure 6 :** La voie de biosynthèse et la séquence péptidique de l'ET-1.

Les ECEs font partie de la famille des métalloprotéases contenant un atome de zinc (Goraca, 2002; Rubanyi *et al.*, 1994; Wanecek *et al.*, 2000). L'ECE-1 se trouve dans la majorité des cellules à l'exception des cellules neuronales et des cellules gliales. Cette enzyme montre une activité optimale à un pH neutre ce qui explique sa présence sur les membranes cellulaires internes et externes. L'activité de l'ECE-1 est inhibée par le phosphoramidon et par l'inhibiteur de NEP 24.11 [Neutral (metallo) endopeptidase]. L'isoforme-2 de cette enzyme (ECE-2) participe aussi à la maturation de l'ET-1 et son activité est inhibée par les mêmes inhibiteurs. Cette dernière isoforme se trouve en abondance dans le tissu neuronal (Krum *et al.*, 2001; Rubanyi *et al.*, 1994). Les deux enzymes ECE1/2 sont classifiées parmi les protéines membranaires et la majorité de la pro ET-1 est convertie en ET-1 au cours du processus de sécrétion, dans les vésicules de

Golgi (Rubanyi *et al.*, 1994; Schiffrin *et al.*, 1998). Plusieurs évidences suggèrent que la libération de l'ET-1 se produit du côté abluminal de la membrane cellulaire, facilitant ainsi l'action directe sur les cellules musculaires (Wagner *et al.*, 1992).

À cause de leur importance dans le processus de la synthèse, l'enzyme de conversion occupe une place considérable en recherche. Plusieurs études s'intéressent aux mécanismes de régulation de ces enzymes afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la synthèse de l'ET-1 (Krum *et al.*, 2001; Schiffrin *et al.*, 1998).

## VI.2 - L'ET-1 ET LE CARDIOMYOCYTE

L'hypertrophie cardiaque est une cause majeure des maladies cardiaques, telles que l'infarctus du myocarde et les arythmies cardiaques. C'est une réponse adaptative qui arrive quand le myocyte cardiaque est continuellement exposé à des stimuli externes tels qu'une surcharge hémodynamique et/ou une augmentation des facteurs neurohormonaux (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 1993; Sugden *et al.*, 1998b; Yamazaki *et al.*, 1996). Plusieurs évidences suggèrent que certains agonistes à RCPG<sub>αi</sub>, dont l'ET-1, l'AngII et les agonistes des récepteurs α1-adrénergiques, produisent une réponse hypertrophique dans cardiomyocytes néo-nataux en culture. De plus, certaines études portant sur des souris transgéniques surexprimant la protéine G<sub>αq</sub> ont démontré qu'elles pouvaient développer l'hypertrophie du myocarde. Ces données suggèrent que les facteurs mentionnés précédemment provoquent l'inhibition controversée des signaux des G<sub>αq</sub> via G<sub>αi</sub>. De même, au niveau du cardiomyocyte, les antagonistes du récepteur à l'ET-1 bloquent la capacité du stress et de la norepinéphrine à induire la réponse hypertrophique. Ajoutant à ces données les résultats de Suzuki *et al.* (1993) qui suggèrent que le cardiomyocyte est capable de produire et de sécréter l'ET-1. Toutes ces évidences confirment que l'ET-1 agit de façon autocrine/paracrine, probablement sur les cardiomyocytes, pour aboutir à l'hypertrophie cardiaque.

Au niveau des cardiomyocytes, l'ET-1 déclenche les trois voies classiques de signalisation ; la voie menant à l'activation des protéines ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2), JNK ( c-Jun N-terminal Kinase) et p38 MAPK (Sugden *et al.*,

1998a; Sugden *et al.*, 1998b). Récemment une nouvelle cascade de signalisation était mise en évidence dans le cardiomyocyte; c'est la voie de signalisation menant à l'activation de ERK5. L'activation de cette dernière voie mène à l'hypertrophie du cardiomyocyte (Nakamuta *et al.*, 1991; Nicol *et al.*, 2001), mais le mécanisme exact n'est pas encore bien identifié.

Dans les cardiomyocytes néonataux, l'activation des protéines ERK1/2 par l'ET-1 est stoechiométrique (c'est à dire que la totalité de la protéine ERK est activée suite à la stimulation par l'ET-1) (Bogoyevitch *et al.*, 1994; Bogoyevitch *et al.*, 1993; Chiou *et al.*, 2000; Clerk *et al.*, 2001). Au repos, la cellule contient une concentration définie avec un niveau basal d'activation de la protéine ERK 1/2 ( $EC_{50}$  est d'ordre de nanomolaire). Suite à une stimulation extra-cellulaire, ERK MAPK est activée de façon rapide et transitoire. (Bogoyevitch *et al.*, 1993; Chiou *et al.*, 2000; Clerk *et al.*, 2001). Cette activation est maximale à 3 - 5 minutes suivant la stimulation, et retourne au niveau basal après environ 12 heures (Bogoyevitch *et al.*, 1993; Sugden *et al.*, 1998a). De même, la translocation de ERK1/2 au noyau, suite à son activation, est aussi transitoire dans les cardiomyocytes (Clerk *et al.*, 2001). Cette activation de la voie ERK1/2 semble jouer un rôle essentiel dans la transmission de la réponse hypertrophique produite par l'ET-1 au niveau du cardiomyocyte. En effet, des études ont été effectuées sur des lignées de souris transgéniques dans lesquelles la protéine ERK est active de façon constitutive (grâce à MKK1 constitutivement active). Les cœurs de ces animaux développent une hypertrophie compensatoire biventriculaire. Cette réponse est probablement causée par une diminution de la fonction contractile, et par la résistance au phénomène d'apoptose. Une étude faite par Bueno et collègues (2000) montre aussi que l'inhibition de la voie ERK MAPK augmente l'apoptose cellulaire et le dommage lors de la reperfusion suite à une période d'ischémie dans les cœurs isolés. Ceci suggère que la résistance à l'apoptose est un facteur très important dans le développement de l'hypertrophie compensatoire.

Les voies JNK et p38 MAPK ont été initialement identifiées comme étant activées par différents stress cytotoxiques tels que le choc hyperosmotique, l'ultraviolet, le stress oxydatif, les inhibiteurs de la synthèse protéique, l'arsénique, etc. Cette propriété leur a donné une autre nomenclature : les protéines kinases activées par le stress (Shichiri *et al.*, 2000; Tsao *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001; Yanagisawa *et al.*, 1988). Il a été montré par

plusieurs équipes que le stress cytotoxique active ces voies (JNK et p38) dans les cardiomyocytes néonataux (Bogoyevitch *et al.*, 1995; Clerk *et al.*, 1998a; Clerk *et al.*, 1998b). De même que dans un cœur isolé, JNK et p38 sont fortement activées par l'ischémie et la reperfusion (Bogoyevitch *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1996). Les plus connus des substrats de ces protéines kinases sont les facteurs de transcription c-Jun et la protéine MAPKAPK-2 (MAPK-activated protein kinase 2). La protéine JNK active son substrat spécifique qui est le facteur de transcription c-Jun sur son domaine de trans-activation. Ceci déclenche la transcription des certains gènes. Alors que le p38 active (par phosphorylation) la protéine MAPKAPK-2 qui, à son tour, active la petite protéine de choc thermique, Hsp25/27 (Clozel *et al.*, 1992; Kiemer *et al.*, 2002; Kyriakis *et al.*, 2001).

Bien que les deux voies de signalisation JNK et p38 MAPK, soient identifiées dans le cardiomyocyte leurs fonctions biologiques restent obscure. Les deux voies sont impliquées avec le phénomène de la mort cellulaire programmée ou l'apoptose (Clerk *et al.*, 1998a; Clerk *et al.*, 1997). Plusieurs expériences dans la littérature prouvent que ces voies sont impliquées dans l'hypertrophie du cardiomyocyte. Les protéines kinases de ces voies sont aussi identifiées : MKK4/MKK7 pour la cascade de JNK, et MKK3/MKK6 pour la cascade de p38 MAPK, cependant, les molécules de signalisation en amont des MKKs ont besoin de plus de caractérisation (Kyriakis *et al.*, 2001; Lowes *et al.*, 2002). À ce jour, une MKKK a été identifiée, et il est aussi connu que deux petites protéines G appartenant à la superfamille de protéine Rho (Rac et Cdc42) sont en amont de MKKK.

## VII - LES RÉCEPTEURS À L'ET-1

Au niveau de la membrane plasmique, l'ET-1 peut se lier sur deux types de récepteurs, soit l'ETA (Arai *et al.*, 1990; Hosoda *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1991; Luttrell *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2002) et l'ETB (Elshourbagy *et al.*, 1992; Nakamuta *et al.*, 1991; Ogawa *et al.*, 1991; Saito *et al.*, 1991; Sakurai *et al.*, 1990). Ces récepteurs font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces deux types de récepteurs lient les trois isoformes d'ET avec des affinités différentes, l'ETA est très sélectif pour la liaison de l'ET-1. Chez l'humain, par exemple, l'ET-1 lie l'ETA avec une affinité 100 fois plus grande que celle de l'ET-3 (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1994; Reinhart *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 1999; Thorin *et al.*, 1998). Alors que le sous type B du récepteur montre une affinité égale pour les trois isoformes du ligand (Lee *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 2002; Takayanagi *et al.*, 1991).

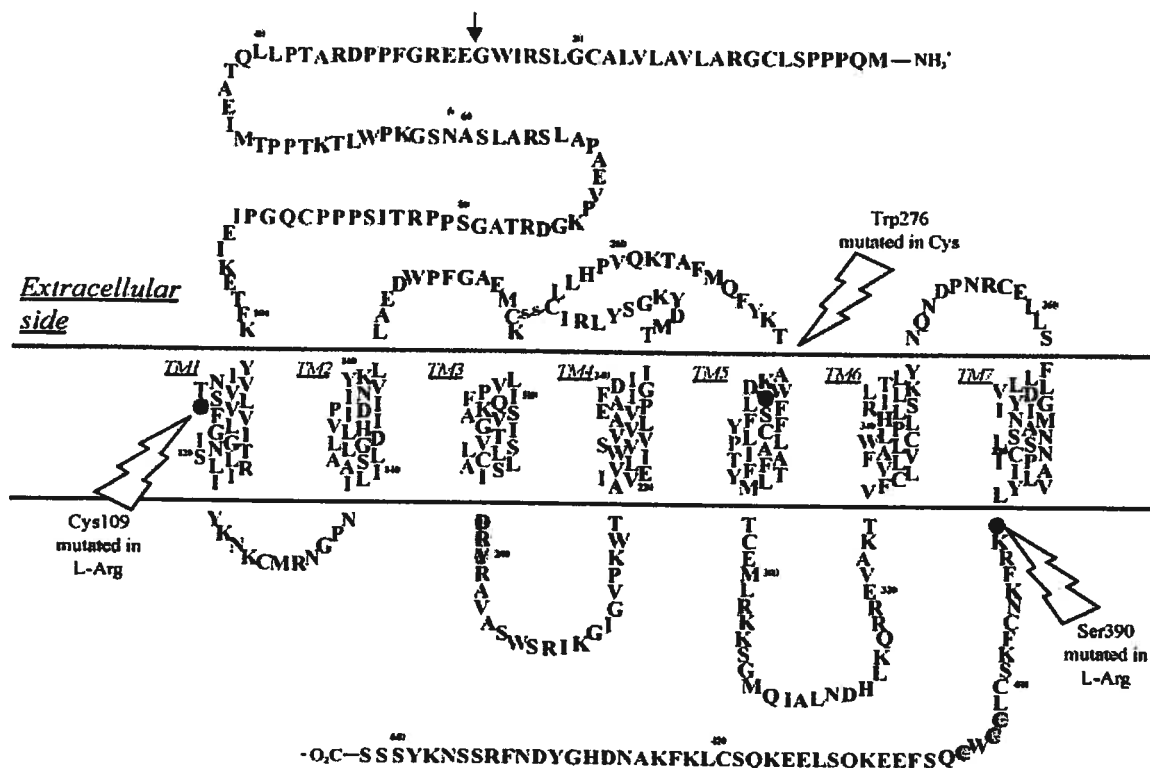
En général, la membrane cellulaire peut contenir un ou les deux types du récepteur, selon l'espèce et le patron tissulaire d'expression de la protéine. Les deux types de récepteurs ont été détectés dans le myocarde ventriculaire chez l'humain (Allen *et al.*, 2003; Molenaar *et al.*, 1993; Ponické *et al.*, 1998) et dans la préparation membranaire des cellules ventriculaires chez le rat (Hoche *et al.*, 1999; Thibault *et al.*, 1995). L'analyse par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) du niveau d'ARN messager des récepteurs à l'ET-1 indique que les deux types de récepteurs, ETA/ETB, sont exprimés dans le cœur de rat adulte, alors que seul les messagers d'ETA étaient présents dans les cardiomyocytes néonataux en culture (Desmarets *et al.*, 1996; Haynes *et al.*, 1995; Hilal-Dandan *et al.*, 1997). De plus, une étude précédente, effectuée dans notre laboratoire (Allen *et al.*, 2003) a démontré que les cardiomyocytes adultes (fraîchement isolés à partir des ventricules du rat) exprimaient les deux types de récepteurs, dont les deux sous types d'ETB (ETB1 et ETB2), avec une dominance d'ETA (~ 80 %) versus l'ETB (~ 20%).

Plusieurs facteurs physiologiques régulent l'expression des récepteurs. En effet, l'hypoxie, l'AMPc, le facteur de croissance épidermique, et le facteur de croissance de fibroblaste fondamental ( $\beta$ -FGF) stimulent la synthèse d'ETA dans quelques types tissulaires, l'ET-1, Ang II, le facteur de croissance dérivé de plaquette, (PDGF), et TGF,

inhibent la synthèse du récepteur ETB (Barker *et al.*, 2002; Mayes, 2003; Rubanyi *et al.*, 1994).

### **VII.1 - Les sous-type B du récepteur**

Le sous-type B du récepteur avec une masse de 50 KDa, a été cloné chez différentes espèces animales ainsi que chez l'humain (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002). Bien que l'homologie structurale soit conservée, l'emplacement et le numéro chromosomique des acides aminés sont spécifiques à chaque espèce. Il existe deux sous types de l'ETB; l'ETB1 et l'ETB2 (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Grantcharova *et al.*, 2002; Horstmeyer *et al.*, 1996; Masaki *et al.*, 1994; Takasuka *et al.*, 1994). Ces deux sous types sont dérivés par épissage alternatif à partir du même gène. L'ETB possède quatre domaines de liaison (I, II, III et VII) de même que des domaines de signalisation localisés dans la région carboxyl terminale (Koshimizu *et al.*, 1995; Sakamoto *et al.*, 1993). Masaki et ses collègues ont été les premiers à identifier par mutagenèse dirigée, qu'une substitution de cysteines Cys 402/403/405 affectait la transduction du signal sans altérer la localisation membranaire ou l'internalisation de l'ETB (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Dupuis *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1997). La figure 7 illustre des mutations qui accompagnent l'apparition de certains cas de maladies comme la maladie de Hirschsprung's. Une mutation dans le premier domaine transmembranaire de l'ETB (Cys 109 → L-Arg) abolie la localisation transmembranaire du récepteur (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 1998). De plus, le substitution de Tyr 276 → Cys dans le cinquième domaine transmembranaire, un résidu extrêmement conservé, n'affecte pas la liaison du ligand au récepteur, mais réduit nettement l'entrée du Ca<sup>2+</sup> (Ponicke *et al.*, 1998). De plus, le remplacement de Ser 390 par un L-Arg dans la dernière boucle intracellulaire du RCPG n'affecte pas la liaison mais réduit nettement la capacité du complexe à augmenter le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Tanaka *et al.*, 1998). L'observation de Rose et al (1995) démontre qu'une mutation dans le résidu aspartate 147 révèle un rôle important dans la transduction du signal de l'ETB via la phospholipase C.



**Figure 7 :** Structure secondaire du récepteur ETB. Les sept domaines transmembranaires (TM) sont numérotés de 1 à 7 avec les domaines extra et intracellulaires du récepteur. Les flèches indiquent les sites des mutations qui accompagnent l'apparition de certaines maladies (voir le texte pour plus de détails), (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002).

Toutes ces études, et bien d'autres, identifient clairement les sites dans l'ETB qui jouent un rôle majeur dans la liaison du ligand, de même que dans la transduction du message extracellulaire. Le contexte cellulaire joue aussi un grand rôle dans la spécificité de la réponse finale produite par l'ET-1. Par exemple, les ETB qui se trouvent sur les cellules musculaires possèdent moins d'affinité pour les agonistes spécifiques à ce type de récepteur que les ETB super-sensible qui se trouvent sur les cellules endothéliales.

Le plus important rôle identifié pour l'ETB est celui de la clairance de l'ET-1 circulant. En effet, la concentration plasmatique de l'ET-1 circulant est d'environ 1 fmol/ml (Haynes *et al.*, 1993; Levin, 1995; Mayes, 2003; Ortega Mateo *et al.*, 1997).

Cette concentration augmente sous certaines conditions. Il a été montré par Brunner et ses collaborateurs (1996) que l'endothélium pulmonaire, l'organe contenant la plus grande densité en ETB, sert certainement à éliminer l'ET-1 de façon très efficace (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Nicol *et al.*, 2001). Cette hypothèse a aussi été vérifiée par Dupuis et ses collaborateurs (1999) confirmant que le poumon aide à éliminer 60% de l'ET-1 circulante à chaque passage pulmonaire. Cette capacité de dégagement pulmonaire est sélectif pour l'ETB, mais pas pour l'ETA. Ceci prouve que l'ETB a un rôle important dans l'homéostasie des niveau bas de l'ET-1 plasmatique (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; d'Uscio *et al.*, 2000; Dale *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 1993; Mawji *et al.*, 2003; Shichiri *et al.*, 2000). Bien que les autres organes tels que le rein et le foie, sont aussi impliqués dans le mécanisme de clairance de l'ET-1 circulante via l'ETB.

## **VII.2 - Le sous-type A du récepteur**

Le sous type A du récepteur à l'ET-1 est caractérisé par sa forte affinité à lier l'ET-1. Ce récepteur de 48 KDa est moins abondant que le sous-type B mais il joue un rôle très important au niveau des cellules musculaires et au niveau des cardiomyocytes. Dans ces types cellulaires sa concentration est trois à quatre fois supérieure à celle de l'ETB. Plusieurs études ont été faites pour caractériser les sites de liaison ainsi que les domaines actifs de l'ETA. Des études de mutagénèse dirigée avec l'ETA (Kalina *et al.*, 1992; Kubo *et al.*, 2001) ont démontré que le deuxième domaine transmembranaire (TM2) de l'ETA a une séquence d'acides aminés différente de celle de l'ETB (Lee *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1995). Ceci a ouvert les portes pour plusieurs autres équipes de recherche qui se sont intéressées à étudier l'importance de ce domaine dans la spécificité de la liaison du ligand. En effet, le remplacement du résidu Tyrosine 129 par un résidu alanine, glutamine, asparagine, histidine, lysine, sérine ou phénylalanine, résulte en une forme variante du récepteur qui possède une très forte affinité de liaison à l'ET-3, à la sarafotoxine (S6C), et une très faible affinité envers l'antagoniste sélectif à l'ETA, le BQ123. Par contre, l'échange du résidu histidine 150, qui est l'analogue du résidu Tyr 129 du domaine TM 2 de l'ETB, par un résidu alanine ou par un résidu tyrosine ne change pas l'affinité de l'ETB à lier ses ligand. Ceci indique que le domaine TM2



possède différents rôles selon le type de récepteur, et que cette région est importante dans la sélectivité de liaison du ligand à l'ETA. Dans un même ordre d'idées, d'autres expériences supportent la présence du site de liaison de l'ET-1 dans le domaine TM2 de l'ET-B, et que ce site chevauche celui de l'antagoniste BQ123 (Rose *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1999).

Receptor	ET-1	ET-2	ET-3	S6C	BQ123	IRL1620
WT hETA	0.018	0.058	6.35	222	13	>10,000*
Y129FhETA	0.012	0.012	0.031	2.95	76	105
Y129KhETA	0.016	0.016	0.041	2.59	2,400	ND
Y129AhETA	0.021	0.034	0.100	1.60	>10,000*	43
Y129NhETA	0.018	0.021	0.040	1.48	>10,000*	ND
Y129ShETA	0.017	0.016	0.016	0.68	>10,000*	20
Y129QhETA	0.019	0.023	0.037	0.82	1,240	ND
Y129HhETA	0.017	0.025	0.062	0.56	1,820	ND

**Table 1** : L'affinité de liaison ( $K_i$  apparent, nM) des ligands aux différents variants de l'ETA. Les substitutions des a.a. étaient faites dans le domaine TM 2 du récepteur.

## **VIII - LA PHYSIOLOGIE DE LIAISON D'ET-1 SUR L'ETR**

Il est bien évident que la liaison de la plupart de ligands aux RCPGs se fait de façon allostérique. Les exemples qui clarifient ce point sont ceux qui ont été effectués sur les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques (McCulloch *et al.*, 1996), les récepteurs muscariniques (Stephenson *et al.*, 1995), les récepteurs dopaminergiques D2 (Hoare *et al.*, 1996) et les récepteurs de l'adénosine A1 (Bruns *et al.*, 1990). Des études récentes montrent que l'acide salicylique, et l'aspirine, sont des inhibiteurs allostériques du récepteur ETA (Talbot *et al.*, 2000). L'effet de l'acide salicylique a été observé à une concentration de l'ordre de 100 mM, ce qui est une concentration très élevée. Suite à cette étude, plusieurs équipes de recherche se sont efforcées à trouver des composés plus puissants (Amann *et al.*, 2002; Kupferwasser *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1997). Un exemple est l'étude de Blandin et ses collaborateurs (2000) sur l'acide benzoïque et sur les dérivés de l'acide salicylique. Toutes ces études ont mené à l'identification des acide 3,5-

dibromosalicylique et acide 3,5-diiodosalicylique, des dérivées de l'AS qui sont environ de 50 fois plus puissants que l'aspirine.

Le récepteur ETA est le sous type dominant sur les cellules musculaires lisses, et sa stimulation par l'ET-1 induit une vasoconstriction en augmentant la concentration du calcium intracellulaire de la cellule par un mécanisme biphasique. La première phase transitoire se produit suite à l'augmentation de l'activité de la phospholipase C pour cliver la phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et en 1,2-diacylglycérol (DAG) (Gratton *et al.*, 1997; Mawji *et al.*, 2003; Mayes, 2003; Schiffrin, 2000; Shah *et al.*, 2003; Simonson *et al.*, 1990; Wanecek *et al.*, 2000). L'IP<sub>3</sub> cause rapidement le relâchement d'ions Ca<sup>2+</sup> de réserves intracellulaires (telles que le réticulum sarcoplasmique) via les canaux calciques sensibles à l'IP<sub>3</sub>. La deuxième phase de la réponse correspondant à l'augmentation soutenue du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est causée par l'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire via les canaux calciques, probablement suite à la liaison directe de l'ET-1 sur ses récepteurs et l'activation de l'IP<sub>3</sub> et l'IP<sub>4</sub>. De plus, il faut noter la diversité des cellules musculaires lisses. L'ET-1 peut parfois produire la vasodilatation en activant les canaux potassiques. En effet, suite à l'activation des récepteurs à l'ET-1, une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire peut provoquer l'activation de canaux potassiques menant à l'hyperpolarisation de la membrane (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Haynes *et al.*, 1993; Mawji *et al.*, 2003; Mayes, 2003; Neylon *et al.*, 1994). Cette hyperpolarisation se traduit par la vasodilatation des cellules musculaires. Les vaisseaux avec un grand nombre de ces types de cellules peuvent se dilater en réponse à l'ET-1. De même, l'ETB localisé sur les cellules musculaires lisses produit toujours la vasoconstriction (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; McCulloch *et al.*, 1996; Neylon *et al.*, 1994) alors que sa présence sur les cellules endothéliales provoque la vasodilatation en provoquant le relâchement de monoxyde d'azote (NO) (Hirata *et al.*, 1993) et la prostacycline (Filep *et al.*, 1991). En plus de tous ces effets physiologiques, cette petite protéine joue aussi plusieurs rôles biochimiques et génétiques très importants. Elle active la transcription de plusieurs gènes menant à la prolifération cellulaire. L'ET-1 est donc un agent mitogénique pour plusieurs types cellulaires (Thorin *et al.*, 1998). C'est aussi un agent pro-apoptotique, puisqu'il active le

phénomène d'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Iglarz *et al.*, 2003; Spinella *et al.*, 2002; Wanecek *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2001).

L'effet net de l'action de l'ET-1 dépend de l'état du tissu, puisque les deux types de récepteurs peuvent avoir une sensibilité variable suite à la déclaration des maladies. Dans le tissu normal, l'ETB produit une vasodilatation, mais sous les conditions pathologiques, la vasoconstriction prédomine (Haynes *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1989a; Levin, 1995; Mayes, 2003; Teder *et al.*, 2000). Ce renversement d'effet peut résulter d'une augmentation du niveau d'ET-1 ou par la régulation à la baisse de l'ETB localisé sur les cellules endothéliales ceci est souvent accompagné par une régulation à la hausse au niveau des cellules musculaires (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Kakoki *et al.*, 1999; Ortega Mateo *et al.*, 1997). Plusieurs études confirment l'absence de la régulation des récepteurs endothéliaux dans les maladies cardiaques. Par exemple, l'ETB de la membrane de cellules cardiaques est de 67% plus exprimé que l'ETA dans la défaillance chronique du coeur (Kobayashi *et al.*, 1999; Mawji *et al.*, 2003; Mayes, 2003). Un tel changement du ratio des récepteurs apparaît aussi dans autres conditions pathologiques, telles que le perfusion de myocarde (Yokoyama *et al.*, 2000) et l'hypertension (Cardillo *et al.*, 1999). Dans ce cas, le blocage du récepteur ETB produit une vasoconstriction chez les hommes normotendus mais une vasodilatation chez les sujets hypertendus. Ceci a aussi été observé dans le cas de "sclérodéma" associé aux fibronectines du tissu pulmonaire où le niveau du récepteur ETA était significativement réduit, alors que le niveau du récepteur ETB était quant à lui légèrement élevé en comparaison au tissu sain (Abraham *et al.*, 1997; Mawji *et al.*, 2003).

## **IX - LES ANTAGONISTES D'ETRs**

Le développement de bloqueurs spécifiques aux sous-types de récepteurs à l'ET-1, a beaucoup facilité l'étude de cette protéine, et de ses divers effets biologiques. En fait, plusieurs drogues semblent être capables de lier les ETRs, tels l'atrasentan, le bosentan, le darusentan, le sitaxsentan, le tezosentan, et l'homologue J-104132. Seul le bosentan, un antagoniste oralement actif, est actuellement approuvé pour l'usage médical. Certains de ces agents, tels que le bosentan et le tezosentan, par exemple, sont des antagonistes

doubles, (ils peuvent lier l'ETA et l'ETB ), cependant, les autres, tel que sitaxsentan, sont des antagonistes sélectifs aux ETA. Il n'est toutefois pas clair comment les antagonistes d'ETA diffèrent des antagonistes doubles. Malgré cette différence, des données préclinique et clinique de l'étude d'hypertension pulmonaire, montrent que l'efficacité de traitement est la même en présence des antagonistes sélectifs au sous-type ETA, ou en présence des antagonistes doubles.

L'identification des effets pharmacologiques spécifiques aux ETRs a aussi été facilitée par la disponibilité de plusieurs agonistes spécifiques, tels que l'IRL-1620 et la sarafotoxine 6C. L'IRL-1620 est extrêmement spécifique au sous-type B, alors que S6C a été rapporté pouvoir stimuler d'autres récepteurs que les ETRs, activant ainsi d'autres réponses pharmacologiques (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Sokolovsky, 1992). Le BQ788 est un antagoniste très sélectif à l'ETB. Il a été identifié la première fois par le groupe d'Ishikawa en 1994. Malgré la spécificité de la liaison de cet agent à l'ETB, sa combinaison avec l'ET-1 abolie son effet antagoniste. Ceci est causé par la très forte affinité d'ETB pour lier l'ET-1 plutôt que d'autres ligands. Il existe aussi des antagonistes qui sont de nature non-peptidique tel que A192621 qui est extrêmement sélectif et puissant pour inhiber l'ETB. Le tableau I (tiré de l'article de : D'Orleans-Juste *et al.*, 2002) est une compilation des antagonistes les mieux caractérisés d'un point de vue pharmacologique pour les ETR.

## **X - L'ACIDE SALICYLIQUE**

L'acide salicylique (AS), ou l'aspirine, est une des drogues les plus utilisées en clinique. Son substrat fondamental est la cyclooxygénase qui est acétylée sous action de l'aspirine, de façon irréversible et bloque ainsi la conversion de l'acide arachidonique en prostanoïde. L'aspirine peut être biotransformée en salicylate, un substrat très similaire avec une fonction anti-inflammatoire mais qui ne possède pas l'effet inhibiteur sur la cyclooxygénase. Il a été montré que le salicylate inhibe la biosynthèse des prostanoïdes, dans des cellules isolées, mais pas directement par des enzymes purifiées. Cet effet semble être prévenu en présence d'une forte concentration d'acide arachidonique. Ce dernier peut interférer l'inhibition de cyclooxygénase-2 en produisant la formation de

prostanoloïde. Une autre cible du salicylate a aussi été mise en évidence de façon indirecte. Ceci se fait via les voies de signalisation intracellulaires, telle que les voies des MAPKs. Dans la plupart des études effectuées à ce jour, le salicylate démontre un effet inhibiteur sur la voie p38 MAPK. Ceci peut être une raison directe de l'inhibition produite par le salicylate sur les facteurs de transcription tels que l'AP-1 (Activator Protein-1) et NF- $\kappa$ B (Nuclear transcription Factor kappa B) (Schwenger *et al.*, 1998).

### **X.1 – La pharmacologie de l'acide salicylique**

L'aspirine est un dérivé de plantes, utilisé en traitement thérapeutique depuis plus de 2000 ans. Dans la plante, l'acide salicylique est synthétisée à partir de l'acide *trans*-cinnamique par décarboxylation en acide benzoïque qui subit par la suite, une réaction d'hydroxylation.

L'AS est un médicament utilisé couramment en clinique. Une étude effectuée aux États-Unis a démontré que le taux de consommation d'aspirine dépasse 35,000 kg par jour (Zhang *et al.*, 1997). Suite à l'administration orale, environ 50 % de l'aspirine est déacétylée en salicylate immédiatement après l'absorption. La demi-vie de l'aspirine dans le plasma sanguin est de 15 minutes, alors que celle du salicylate est de 2 à 30 heures, selon la concentration consommée.

### **X.2 – La voie de signalisation de l'acide salicylique**

Une forte concentration d'AS peut influencer la signalisation de la cascade des MAPKs. L'AS peut bloquer la voie p38 menant probablement à l'inhibition de facteurs de transcription (Teder *et al.*, 2000).

Le NF- $\kappa$ B est considéré comme un élément clé dans l'acheminement des signaux produits par les stimuli pro-inflammatoires. Cette protéine forme un complexe homodimérique ou hétérodimérique (avec la protéine Rel), pour lier des sites appropriés sur l'ADN cible, en régulant ainsi la transcription. Dans la plupart des cellules, le NF- $\kappa$ B se trouve sous forme inactive dans le cytoplasme, en complexe avec son inhibiteur

spécifique I $\kappa$ B. Une stimulation pro-inflammatoire contribue à l'activation de la kinase d'I $\kappa$ B, l'IKK, qui résulte en la protéolyse de l'I $\kappa$ B et l'activation de NF- $\kappa$ B. Le NF- $\kappa$ B libéré se déplace du cytoplasme vers le noyau pour activer ses cibles incluant les enzymes pro-inflammatoires, les cytokines, les chemokines et les molécules d'adhésion cellulaire. L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B par l'aspirine et par le salicylate a été démontrée par Kopp et Ghosh (1994) et par plusieurs autres équipes (Hoche *et al.*, 1999; Love *et al.*, 1996; Stephen *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2003). Toutes ces études supportent l'hypothèse que l'inhibition de NF- $\kappa$ B contribue à l'action anti-inflammatoire de l'aspirine, suggérant ainsi que l'aspirine et le salicylate produisent aussi leur action pharmacologique via l'inhibition de la liaison des protéines sur "l'enhancer/CCAAT" des promoteurs ciblés.

Un autre facteur de transcription qui semble être affecté par l'aspirine est le facteur AP-1 (Teder *et al.*, 2000), celui-ci est formé du complexe de protéines oncogènes, appartenant à deux sous familles jun et fos. L'AP-1 est le médiateur de plusieurs stimulation en particulier par des signaux affectant la croissance cellulaire. Cette protéine est activée par des stimuli pro-inflammatoires, tel que le TNF- $\alpha$ . Ce facteur régule la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Cette voie peut être souvent chevaucher avec la voie du NF- $\kappa$ B.

### **X.3 – L'AS et le système cardiovasculaire**

Dans la thérapie cardiovasculaire, l'AS et le salicylate ne montrent aucune action, mais une forte dose peut diminuer la circulation sanguine (Leonhardt *et al.*, 2003). L'aspirine peut avoir un effet secondaire sur l'infarctus du myocarde. Ceci est probablement produit par l'inhibition irréversible de la cyclooxygénase plaquettaire qui résulte en l'inhibition de la formation de thromboxane A<sub>2</sub>.

L'AS inhibe la cyclooxygénase dans les plaquettes sanguines ainsi que dans les parois vasculaires (Saito *et al.*, 2004). Un mécanisme possible de cette action est en bloquant l'accès de l'acide arachidonique au site catalytique suite à l'acétylation irréversible par l'aspirine. Par contre, le salicylate ne peut pas prévenir la formation de thromboxane A<sub>2</sub> dans le plasma riche en plaquettes (McAdam *et al.*, 1996). D'autres

études prouvent aussi l'incapacité du salicylate à inhiber la cyclooxygénase dans les parois vasculaires (Eisele *et al.*, 2004). Par contre, le salicylate prévient l'effet inhibiteur de l'aspirine et de l'indométhacine sur la cyclooxygénase B2 (Komoike *et al.*, 2002).

## **XI - LA FAMILLE DES RCPGs**

Un récepteur membranaire comporte une partie extracellulaire où se trouve le site de reconnaissance de la molécule signal, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire. En général, pour activer un récepteur membranaire, la molécule informative n'a pas à pénétrer dans la cellule. L'activation des récepteurs membranaires par l'agoniste déclenche des modifications qui peuvent rester localisées à la membrane, s'étendre à l'ensemble du cytoplasme ou atteindre le noyau. Dans ces cas, l'activation met en jeu une cascade de réactions enzymatiques intracellulaires, se poursuivant jusqu'au noyau, pour modifier la transcription de l'ADN en ARN. L'ensemble des réactions qui se déroulent entre l'activation du récepteur membranaire et l'effet cytoplasmique ou nucléaire est généralement appelé transduction du signal.

Les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG) sont une classe de récepteurs membranaires ainsi appelés parce que leur activité nécessite la présence de protéines pouvant lier le guanosine diphosphate (GDP) et la guanosine triphosphate (GTP) (Hall *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2001).

Les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG) sont de nature polypeptidique et comportent une partie extracellulaire portant le site de liaison avec l'agoniste (bien que le signal peut se lier parfois aux parties intracellulaires du récepteur, entre les domaines TM), une partie transmembranaire à sept hélices (parce que la chaîne polypeptidique traverse la membrane sept fois) et une partie intracellulaire en contact avec les protéines-G qui assurent le transfert, et l'amplification du signal reçu par le récepteur (Clerk *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Lowes *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2002). Chaque protéine G est hétérotrimérique, c'est-à-dire constituée de trois sous-unités différentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), ces deux dernières formant un complexe hétérodimérique. Classiquement, la stimulation du récepteur conduit à leur dissociation. Le rôle de la sous-unité  $\alpha$  est le mieux caractérisé. En effet, la sous-unité  $\alpha$ , à l'état non actif, est lié à une

GDP et est liée au complexe  $\beta$ - $\gamma$ . Lors de la liaison de l'agoniste induit un changement dans la conformation du récepteur, ce qui facilite son interaction fonctionnelle avec la protéine G, plus précisément avec la sous unité  $G_\alpha$ . Ceci provoque la relâche du GDP et la liaison du GTP. Le complexe trimérique est ainsi déstabilisé, permettant à la sous-unité  $G_\alpha$  de se dissocier partiellement du dimère  $\beta\gamma$ . Les deux composantes  $G_\alpha$  et  $G_{\beta,\gamma}$  peuvent ainsi activer séparément différentes réponses intracellulaires (Chevalier *et al.*, 2000; Cramer *et al.*, 2001; D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Eto *et al.*, 2001; Kubo *et al.*, 2001; Ohkita *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 1996; Shichiri *et al.*, 2000).

Les substances susceptibles d'interagir avec les récepteurs couplés aux protéines G sont extrêmement nombreuses et diverses : les catécholamines, peptides et polypeptides, molécules odorantes ainsi que l'ion calcium et la lumière. L'effet observé dépend essentiellement de la nature de la sous unités  $\alpha$ . En effet, il existe différents types de sous-unités  $\alpha$ , notamment les  $\alpha_s$  et  $\alpha_i$ , qui sont présentes dans la quasi-totalité des cellules. L' $\alpha_s$  de la protéine  $G_s$  ("s" pour stimulant) provoque une activation de l'adénylcyclase avec une augmentation de la synthèse d'AMP cyclique. L' $\alpha_i$  de la protéine  $G_i$  ("i" pour inhibiteur) inhibe l'adénylcyclase et diminue la synthèse d'AMP cyclique (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2001; Lowes *et al.*, 2002).

Il est bien de noter qu'il existe un troisième sous type de la protéine  $\alpha$ ,  $\alpha_t$  ("t" pour transducine) qui active une phosphodiesterase détruisant ainsi le GMP cyclique. Et l' $\alpha_o$  (o pour other = autre) qui parmi lesquelles on peut distinguer des protéines Gq, Gk, G $\alpha$ .

Gq qui module l'activité de la phospholipase C est la principale protein-G d'ETRs

Gk qui module l'ouverture des canaux potassiques.

G $\alpha$  qui module l'ouverture des canaux  $Ca^{2+}$ .

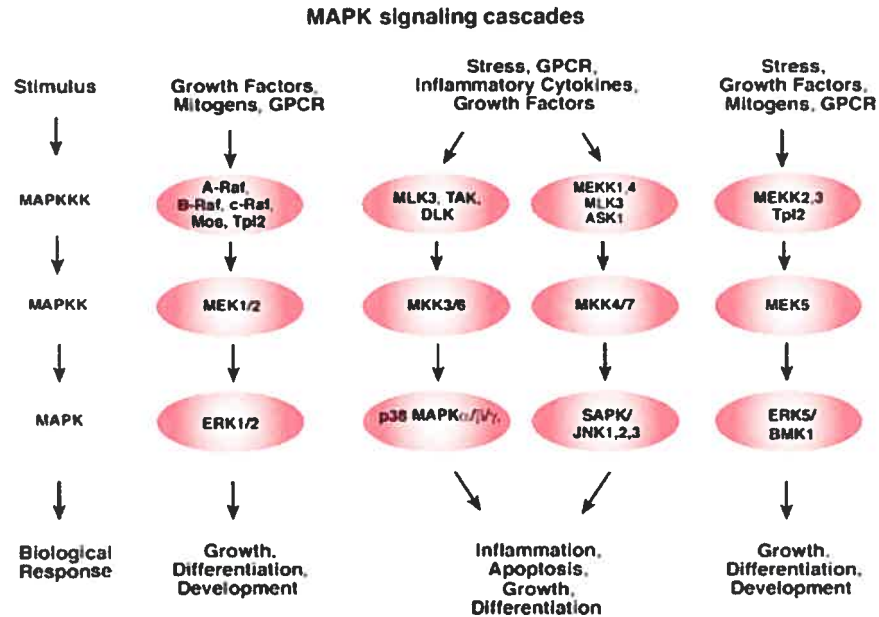
L'activité des protéines-G est de courte durée car une GTPase, partie intégrante des protéines G, hydrolyse l' $\alpha$ -GTP actif en  $\alpha$ -GDP inactif qui se lie aux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Par ailleurs, les récepteurs liés aux protéines G peuvent interagir avec des protéines appelées arrestines qui se fixent aux récepteurs et les désensibilisent en les decoupant de leur protéine-G (Claing *et al.*, 2002; Dale *et al.*, 2001; Fawcett, 1994; Luttrell *et al.*, 2002; Oakley *et al.*, 2000).



En résumé, les protéines-G assurent le transfert de l'information du récepteur à des enzymes dont elles régulent l'activité.

## **XII – LES VOIES DE MAP KINASES**

Le concept de signalisation par la voie MAPK est un des concepts les plus important de la biologie moderne. Les scientifiques de l'époque tentaient de s'expliquer la capacité qu'ont les cellules à discriminer les messages extracellulaires, (hormones et neurotransmetteurs), et à y répondre de façon spécifique et dans des compartiments intracellulaires comme le noyau. C'est finalement la grande découverte du concept de signalisation intracellulaire qui a permis d'y répondre: les hormones et les neurotransmetteurs se lient à leurs récepteurs membranaires — qui étaient connus depuis les années soixantes sans bien en comprendre le concept biochimique — et active des "effecteurs" intracellulaires qui induisent une cascade d'évènements intracellulaires par la génération de seconds messagers (Cardillo *et al.*, 1999; Clerk *et al.*, 1999; Kiemer *et al.*, 2002; Lowes *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001). C'est en 1989 et 1991 que la séquence de la première MAPK (ERK) était mise en évidence (Cardillo *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2001). Dès lors, les travaux de spécialistes en biochimie permirent d'analyser, d'identifier et d'établir les voies qui assemblent les composantes de cette cascade de signalisation (figures 8 et 9).

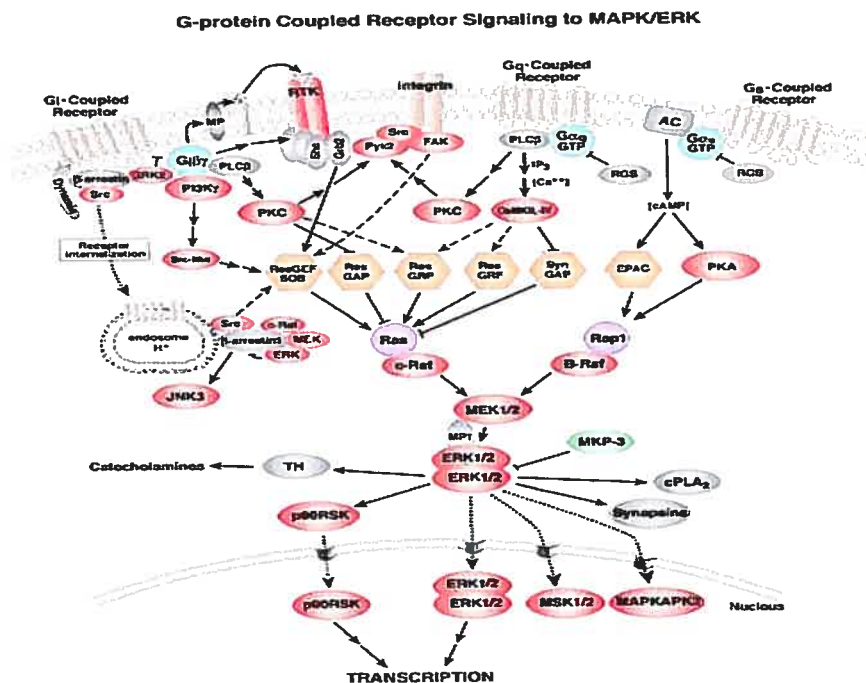


**Figure 8.** Une vue simplifiée des voies essentielles de la cascade des MAPK. Tirée du site internet : [www.cellsignal.com/retail/reference/pathway/GPCR.asp](http://www.cellsignal.com/retail/reference/pathway/GPCR.asp)

Les RCPGs représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires impliqués dans la transduction de signaux. Il existe au moins cinq voies MAPK connues mais trois d'entre elles sont les plus étudiées : la voie ERK, la voie JNK et la voie p38 MAPKs (figure 8). Bien que les enzymes de la voie MAPK aient été identifiées à l'origine comme étant des activateurs mitogéniques (Mitogen Activated Protein), il est maintenant assuré que les récepteurs contrôlent, *via* l'activation de ces cascades, un très grand nombre de processus physiologiques autre que la prolifération, comme le métabolisme cellulaire et (Clerk *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2001), la neurotransmission (Barron *et al.*, 2003; Kierner *et al.*, 2002), la différenciation cellulaire (Barker *et al.*, 2002; Murakami-Mori *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2001; Ravenhall *et al.*, 2000), ainsi que les réponses inflammatoire et immunitaire (Clerk *et al.*, 1999; Jijon *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 1999). La diversité des signaux externes qui leur sont destinés suite à l'activation des récepteurs membranaires spécifiques, est impressionnante allant de la lumière aux agents thérapeutiques tels que les analgésiques et les opiacés, en passant par les molécules gustatives et odorantes et bien d'autres stimuli.

Les protéines kinases de la superfamille MAPK possèdent des propriétés structurales et fonctionnelles communes avec d'autres protéines kinases — telles que les cdks (cyclin dependent kinases) — incluant la présence d'un insert de fonction inconnue entre les sous domaines X et XI du corps catalytique, ainsi que la présence d'un résidu sérine ou thréonine suivi par une proline dans leurs substrats. Mais les deux grandes caractéristiques qui les distinguent des autres protéines kinases cellulaires (Clerk *et al.*, 1999; Lowes *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2001) sont que les MAP kinases sont 1) directement activées par phosphorylation en absence d'un site régulateur dans ces protéines et 2) par la présence bien souvent de deux sites d'activation par phosphorylation dans la boucle destinée à cette fonction (une tyrosine et une thréonine séparées par un a.a. quelconque). Deux protéines kinases en amont doivent être activées en série pour produire l'activation de la MAPK (figure 8). Ce cas représente une vue simplifiée de l'évènement qui peut bien souvent faire intervenir d'autres protéines kinases, et des chevauchements entre les kinases de deux (ou plusieurs) voies différentes (Chevalier *et al.*, 2000; Clerk *et al.*, 1999; Lowes *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2002). Dans toutes les voies MAPKs connues, la protéine kinase qui vient immédiatement en amont de la MAPK est un membre de famille MAPK kinase (MKK ou MEK) (Chevalier *et al.*, 2000; Clerk *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2001). Ce sont des enzymes spécifiques qui peuvent phosphoryler les groupements hydroxyles des résidus sérine/thréonine et tyrosine dans leurs substrats MAPK. Malgré leur capacité à activer des résidus aromatiques et aliphatiques dans un contexte approprié, les substrats de ces kinases sont restreints: chaque MEK phosphoryle une MAPK bien désignée (Clerk *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2001). Dans le cas de l'activation de la protéine ERK1/2, cette protéine kinase est phosphorylée sur le résidu tyrosine avant le résidu thréonine *in vitro* et aussi dans la cellule. L'état transitoire — où la protéine est mono-phosphorylée — est une forme inactive de la kinase. Ce phénomène joue un rôle positif en augmentant la coopérativité de la signalisation et permettant la modulation de la réponse par un autre évènement de signalisation — les chevauchement entre les voies (Pearson *et al.*, 2001). En ajout à ce phénomène, la réponse MAP kinase est aussi modulée par le processus d'amplification de signal (Lowes *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2001). L'amplification peut se réaliser si chaque protéine kinase de la cascade est plus abondante que la kinase

régulatrice. Ceci est vrai pour une ou deux étapes de la cascade. Dans la voie ERK 1/2 MAPK, par exemple, l'amplification a lieu à l'étape Raf-MEK, car MEK existe en très grande quantité dans la cellule par rapport à Raf. Mais ce n'est pas le cas à l'étape MEK-ERK où les deux protéines sont présentes en quantité égale dans la cellule (Chiloeches *et al.*, 1999; Lowes *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2001).



**Figure 9 :** Les connexions possibles entre les composantes qui mènent à l'activation de la voie ERK MAPK. Tirée du site internet [www.cellsignal.com/retail/reference/pathway/GPCR.asp](http://www.cellsignal.com/retail/reference/pathway/GPCR.asp)

La protéine MEK, comme tout autre protéine kinase de cette famille, est aussi activée par phosphorylation sur deux résidus (serine et thréonine) dans la boucle d'activation. Mais dans ce cas, la phosphorylation d'un seul résidu peut être suffisant pour activer la protéine kinase (Johnson *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2001). Une fois activées, les MAPKs subissent une translocation vers le noyau où elles activent dans certains cas des substrats cytoplasmiques qui se déplacent et activent des substrats

nucléaires. En plus de rôles cytoplasmiques régulateurs des plusieurs processus cellulaires, les MAPK ont donc aussi des fonctions nucléaires fondamentales (Andoh *et al.*, 2002; Horstmeyer *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2002; Kiemer *et al.*, 2002; Masaki, 1998; Pearson *et al.*, 2001; Ravenhall *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003). En effet, les facteurs de transcription sont les plus importantes cibles qui acheminent souvent la réponse finale des messagers extracellulaires en activant la transcription de gènes de protéines ayant une fonction biologique essentielle telle la croissance ou la survie cellulaire (figure 8, 9).

La façon par laquelle la voie MAPK pourrait être régulée par les GPCR n'est toutefois pas encore réellement comprise. Certaines études ont néanmoins permis de comprendre que cette signalisation pouvait aussi être dissociée de la régulation des effecteurs classiques de la protéine G, comme la phospholipase C ou l'adénylate cyclase. Il semblerait qu'une transduction du signal via les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Une multitude de pistes ont été proposées pour tenter d'expliquer ce nouveau type de signalisation (Lowe *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001). Les analyses séquentielles des MAPK reflètent la présence de 14 MKKK, 7 MKK et 12 MAPK dans les cellules de mammifères. Ces MAPKs interagissent ensembles dans une multitude d'interactions dépendantes du type de stimulus et du type cellulaire (la figure 9 schématise un exemple de connexions possibles entre les composantes menant à l'activation de ERK MAPK). Nous ne les décrivons pas toutes puisqu'elles sont résumées dans des revues récentes (Clerk *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2002; Lowe *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2002). Nous allons nous pencher plus spécifiquement sur celles qui sont plus particulièrement intéressantes dans le cadre de cette étude et d'une façon simple.

## HYPOTHÈSE ET BUT DE L'ÉTUDE

---

Comme on peut le constater, les études effectuées depuis les dix dernières années ont mis en évidence les divers rôles biologiques de l'ET-1. Ce peptide joue un rôle critique dans la régulation du tonus vasculaire et aussi dans la régulation de plusieurs processus physiologiques essentiels. L'action de l'ET-1 sur ses récepteurs membranaires est directement liée à l'apparition des maladies cardiaques, pulmonaires et rénales, d'où l'intérêt d'étudier la spécificité de cette liaison et de contrôler le mode d'action de l'ET-1. En d'autres termes et compte tenu que l'ET-1 lie ses récepteurs de façon quasi-irréversible, ceci rend la compréhension de la liaison ET-1/ETR (activation versus désensibilisation) est essentielle pour définir les effets physiologiques et plutôt pathophysiologiques joués par cette protéine. De plus, la possibilité de trouver des agents qui pourraient déplacer et compenser la réponse de l'ET-1 serait un traitement clinique pour plusieurs maladies cardiovasculaires. La volonté d'étudier la liaison de l'ET-1 sur ses récepteurs membranaires et le déplacement de cette liaison par l'AS, au niveau des myocytes cardiaques du rat adulte, est fondée sur les faits suivants: 1) notre étude précédente démontre que les cardiomyocytes expriment les deux types de récepteurs à l'endothéline, l'ETA et l'ETB, 2) la même étude prouve aussi que l'ET-1 lie ses récepteurs avec une forte affinité au niveau du cardiomyocyte et 3) plusieurs RCPG sont régulés par des ligands allostériques dont l'aspirine et l'AS ( $K_i = 10 \text{ mM}$ ). En se basant sur cette propriété, nous avons étudié l'effet de l'AS sur la liaison de l'ET-1 aux deux sous-types de récepteurs à l'ET-1. Ces éléments nous ont fait envisager que les récepteurs de l'ET-1 qui se trouvent sur les cardiomyocytes étaient des bons candidats pour étudier le type de liaison ET-1/ETR et l'effet de l'AS sur cette liaison.

Pour faire de l'action de l'AS sur la liaison d'ET-1/ETR une histoire complète en comprenant l'effet secondaire qui l'accompagne, nous devons d'abord vérifier l'effet de l'AS sur l'activation des voies MAPK par l'ET-1. En effet, depuis quelques années, des études font état d'une implication de certains RCPG, dont les récepteurs à l'ET-1 et les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, dans l'hypertrophie du cardiomyocyte. Il est évident que les voies des MAPKs sont impliquées dans la régulation et la transmission de cette

réponse. Bien que les composantes de cette activation ne soient pas encore très bien déterminées, nous avons voulu explorer ces voies et vérifier si elles pouvaient transmettre la réponse de l'ET-1 même en présence de l'AS (quand la liaison d'ET-1 est incomplète) ou bien si ces voies sont activées par l'AS elle même.

**CHAPITRE 2. ARTICLE :**

**Salicylic Acid Alters Endothelin-1 Binding in Intact Adult Rat**

**Ventricular Myocytes**



**ACCORD DES COAUTEURS****Identification de l'étudiante**

Hala Farhat  
M.Sc. Biochimie

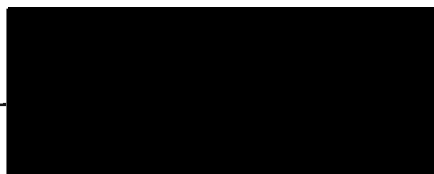
**Description de l'article**

Auteurs : Hala Farhat et Bruce G. Allen  
Titre : Salicylic Acid Alters Endothelin-1 Binding in Intact Adult Rat Ventricular Myocytes  
Revue : Biochemistry and Cell Biology 2004, 82: 728-738.

**Déclaration des coauteurs**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Hala Farhat inclut cet article dans sa thèse de maîtrise qui a pour titre "L'acide salicylique prévient la liaison de l'endothéline dans les myocytes de rat adulte".

Bruce G. Allen  
Coauteur



23-08-2005  
Date



**Salicylic Acid Alters Endothelin-1 Binding in Intact Adult Rat Ventricular  
Myocytes<sup>‡</sup>**

**Hala Farhat<sup>‡</sup> and Bruce G. Allen<sup>‡§</sup>**

‡ Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, PQ, Canada, H3C 3J7  
and Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche, 5000 rue Bélanger,  
Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

§ Department of Medicine and the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux  
Autonome, Université de Montréal, Montréal, PQ, Canada, H3C 3J7

Address for Correspondence: Bruce G. Allen, Centre de Recherche, Institut de  
cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger, Montréal, PQ, Canada, H1T 1C8. Tel:  
(514) 376-3330 (3591). Fax: (514) 376-1355. XXXXXXXXXX

Running Title: Salicylic Acid Alters Endothelin-1 Binding

Key Words: cell communication, endothelin, endothelin receptor, inotropic agents, signal  
transduction, heart, ventricular myocyte

Endothelin receptors,  $ET_A R$  and  $ET_B R$ , form tight receptor-ligand complexes that complicate our understanding of the physiological, pharmacological, and biochemical properties of these receptors. Although radioligand binding studies have demonstrated the binding of endothelin-1 (ET-1) to  $ET_A R$  to be essentially irreversible,  $ET_A R$  internalize in a ligand-dependent manner, release ET-1, and then recycle to the cell surface. Salicylic acid (SA) reduces ET-1 binding ( $IC_{50} = 10 \text{ mM}$ ) to recombinant  $ET_A R$  in isolated membranes by promoting dissociation of [ $^{125}I$ ]ET-1 (Blandin *et al.*, Mol. Pharmacol. 58:1461-1469, 2000). In the present study, SA (5 mM) did not alter [ $^{125}I$ ]ET-1 binding intact adult rat ventricular myocytes. The lack of effect was not due to internalization of receptor-ligand complexes. However, 100 mM SA significantly reduced [ $^{125}I$ ]ET-1 binding to both intact myocytes and isolated membranes. SA induced the phosphorylation p42/44 ERK MAP kinase, plus an unidentified 40-kDa protein, on the activating T-E-Y motif. ERK phosphorylation was reduced by a MEK inhibitor, PD98059. Phosphorylation of p40 was reduced by the p38 MAP kinase inhibitor SB203580, but not PD98059. However, inhibition of ERK or p38 MAP kinases did not alter the ability of 100 mM SA to induce dissociation of [ $^{125}I$ ]ET-1. These results suggest that, in the ventricular myocyte, salicylic acid does alter the kinetics of ET-1 binding and suggest the possible presence of an allosteric binding site that modulates the dissociation of ET-1 receptor-ligand complexes in response to an as of yet unidentified mediator.

## Introduction

Endothelins (ETs) are a family of 21-amino acid peptides with three distinct isoforms, ET-1, ET-2, and ET-3 (Inoue *et al.*, 1989). The three ET receptors, ET<sub>A</sub>R, ET<sub>B</sub>R, and ET<sub>C</sub>R (Rubanyi and Polokoff, 1994), are G protein-coupled receptors (GPCRs). ET<sub>C</sub>R has been cloned from *Xenopus Laevis* (Karne *et al.*, 1993); however, a mammalian homolog has yet to be identified. ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R are distinguishable pharmacologically by their affinities for ET isoforms. Irreversible binding of [<sup>125</sup>I]ET-1 is a general property of endothelin receptors and has been observed in membranes from human cardiac myocytes (Modesti *et al.*, 1999), intact adult (Allen *et al.*, 2003) and neonatal rat myocytes (Hilal-Dandan *et al.*, 1997). The slowly dissociating receptor-ligand complex is rapidly formed, being detectable following incubation times as short as 5 min (Hilal-Dandan *et al.*, 1997), and unaffected by performing the binding at 4 °C suggesting that this is not a result of cellular uptake of the ligand-receptor complex (Allen *et al.*, 2003; Hilal-Dandan *et al.*, 1997). The nature of the slowly dissociating receptor-ligand complex formed between ET-1 and its receptors is currently poorly understood and fundamental differences exist in the interaction of ET-1 with ET<sub>A</sub>R versus ET<sub>B</sub>R. Human (Takasuka *et al.*, 1992a; Takasuka *et al.*, 1994) and canine (Takasuka *et al.*, 1992b) ET<sub>B</sub>R form a complex with ET-1 that is stable, at reduced temperatures, in the presence of SDS whereas the ET<sub>A</sub>-ET-1 complex dissociates under these conditions. Similarly, in acidic conditions human ET<sub>A</sub>R, but not human ET<sub>B</sub>R, releases ET-1 (Takasuka *et al.*, 1992a). These long-lasting receptor-ligand complexes do not appear to continue to mediate signalling events as within 4 minutes of ligand binding, both ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R undergo phosphorylation, mediated by G protein activated kinases (GRKs), and desensitization (Freedman *et al.*, 1997). In addition, ET<sub>A</sub>R internalize in a ligand-dependent manner (Chun *et al.*, 1995). Once internalized, ET<sub>A</sub>R follow the recycling pathway through the pericentriolar recycling compartment and then back to the plasma

membrane (Bremnes *et al.*, 2000). In contrast, ET<sub>B</sub>R internalize constitutively, without a requirement for ligand binding, and the internalized receptor is targeted to the lysosomes for degradation (Bremnes *et al.*, 2000; Oksche *et al.*, 2000). In adult ventricular myocytes, ET<sub>A</sub>R distribute primarily on surface membranes whereas ET<sub>B</sub>R are primarily on the nuclear membrane (Boivin *et al.*, 2003; Robu *et al.*, 2003). The fate of each receptor subtype is under the control of specific elements regulating protein trafficking. Chimeric ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R constructs, where the C-terminal tails have been exchanged, reveal that the cytoplasmic C-terminal domain of ET<sub>A</sub>R is sufficient to specify the receptor be recycled whereas the comparable domain in ET<sub>B</sub>R specifies delivery to lysosomes (Abe *et al.*, 2000; Paasche *et al.*, 2001). It is difficult to reconcile results from radioligand binding studies, indicating ET<sub>A</sub>R form a receptor ligand complex that is essentially irreversible, with studies of receptor trafficking, demonstrating that ET<sub>A</sub>R-ET-1 complexes internalize and then ET<sub>A</sub>R recycle to the cell surface.

One interesting difference between the ET<sub>A</sub>R-ET-1 complex and the ET<sub>B</sub>R-ET-1 complex has been the observation that acetyl salicylic acid or salicylic acid reduce ET-1 binding, with an IC<sub>50</sub> of 10<sup>-2</sup> M, by promoting the dissociation of the ET<sub>A</sub>R-ET-1 complex whereas the ET<sub>B</sub>R-ET-1 complex is unaffected (Blandin *et al.*, 2000; Talbodec *et al.*, 2000). Salicylates are currently thought to act via an allosteric binding site within the ET<sub>A</sub>R. These studies employed membranes isolated from stable transfectant CC139 fibroblasts expressing functional rat ET<sub>A</sub>R or ET<sub>B</sub>R. As apparent differences have been noted in ET-1 binding between intact cells and isolated membranes (Desmarests *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 1998), the aim of the present study was to determine if salicylic acid alters the binding of ET-1 to endothelin receptors on intact ventricular myocytes freshly isolated from adult rat heart. We show here that, in both intact cardiac ventricular myocytes and membranes isolated from myocytes, ET-1 binding was reduced significantly by 100 mM salicylic acid but not by lower concentrations that were effective in membranes isolated from transfected fibroblasts. SA also increased the T-E-Y

phosphorylation of p42/44 ERK MAP kinases and of an unidentified 40 kDa protein. Interestingly, p40 phosphorylation was unaffected by the MEK inhibitor PD98059, but inhibited by SB203580, an inhibitor of p38 $\alpha$  and p38 $\beta$  MAP kinases. Neither PD98059 nor SB203580 altered the ability of SA to induce ET-1 dissociation and thus ERK and p40 were not implicated in the ability of SA to modify the dissociation constant for the ET-1 receptor-ligand complex.

## Materials and Methods

*Materials.* [<sup>125</sup>I]Endothelin-1 (2000 Ci/mmol) was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Oakville, Ontario). Non-labeled endothelin-1 (ET-1), BQ610, and BQ788 were from American Peptides Co. (Sunnyvale, CA). Salicylic acid was ACS grade from EM Science. Essentially fatty acid-free BSA was from Sigma Chemical Co (Mississauga, Ontario). Membrane grade (reduced) Triton X-100, leupeptin, and PMSF were from Roche Molecular Biochemicals (Laval, Québec). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) reagents, nitrocellulose, and Bradford protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd. (Mississauga, Ontario). Microcystin LR was from Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA). Antibodies recognizing both ERK1 (p44) and ERK2 (p42), raised against a synthetic peptide, CGGPFTFDMELDDLDPKERLKERLIFQETARFQPGAPEAP, which corresponds to residues 333-367 of rat ERK1 MAP kinase, were from Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY). Anti-phospho-ERK1/2 (T-E-Y) and p38 MAP (T-G-Y) kinases were from New England BioLabs (Mississauga, Ontario). Unless otherwise stated, all reagents were of analytical grade and were purchased from VWR Canlab (Ville Mont-Royal, Quebec) or Fisher Scientific (Mississauga, Ont.). NanoPure-grade water was used throughout these studies.

*Isolation of Ventricular Myocytes.* Animals were cared for in accordance with the principals and guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (150-180 g) were injected intraperitoneally with 500 U of heparin and anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg). The hearts were then rapidly removed. Calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated as described previously (Allen *et al.*, 2003; Rodrigues and Severson, 1997). Briefly, hearts were rinsed (6-7 ml/min, retrograde perfusion) for 4 min at 37 °C in Joklik MEM buffer supplemented with 25 mM NaHCO<sub>2</sub>,



1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 mM DL-carnitine (Buffer A). Hearts were then perfused for 15 min at 6-7 ml/min with Buffer A containing collagenase (Worthington CLS2, 160 U/ml), 25 μM CaCl<sub>2</sub>, plus 0.1% fatty acid-free BSA (Buffer B). With atria and vessels removed, the ventricles were cut open, transferred into Buffer A containing 0.5% fatty acid-free BSA (Buffer C) plus 25 μM CaCl<sub>2</sub>, and incubated at 37 °C in an shaking water bath (100 rev/min) for 10 min under an atmosphere of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The medium was then removed by aspiration, replaced with 13 ml of buffer B, and the incubation continued. After 7 min, dissociated myocytes were decanted into a 50-ml Falcon centrifuge tube. The residual tissue pieces were washed twice with 10 ml of Buffer C/250 μM CaCl<sub>2</sub> and the myocytes pooled in the centrifuge tube. The cell suspension was centrifuged for 1 min at 45 x g, the supernatant aspirated, and the cell pellet gently resuspended into 10 ml of Buffer C/250 μM CaCl<sub>2</sub>. Following centrifugation for 1 min at 45 x g, cells were resuspended in 15 ml of Buffer C/500 μM CaCl<sub>2</sub> and filtered through a 200 μm nylon mesh. The cell suspension was allowed to sediment for 15 min at 1 x g under 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The supernatant was removed by aspiration and the cardiomyocytes resuspended into 10 ml of Buffer C/500 μM CaCl<sub>2</sub>. The preparation provided 4 to 8 million cells/heart with 70 to 85% viability, as assessed by quiescent cells with rod-shaped morphology. No cells other than ventricular myocytes were observed.

*Isolation of Membranes from Ventricular Myocytes.* Membranes were prepared from freshly isolated cardiac ventricular myocytes as previously described (Boivin and Allen, 2003). Briefly, myocytes were suspended in ice-cold homogenization buffer (10 mM Na-HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% β-mercaptoethanol, 25 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 25 μg/ml leupeptin, and 5 mM DTT) and disrupted by sonication (3 x 10 sec at an amplitude of 15% using a microprobe) with a Sonic & Materials Inc. sonicator (Model VCX 400). Nuclei and unbroken cells were sedimented by centrifugation at 600 x g and 5 °C for 5 min.

Membrane and cytosolic fractions were then separated by centrifugation at 100,000 x g and 5 °C for 60 min in a Beckman Ti 90 rotor. The resulting pellets, containing the cell membranes, were resuspended in 250 µl of homogenization buffer.

*Receptor Binding Assays.* Radioligand binding assays were performed in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 40 pM [<sup>125</sup>I]ET-1 (2000 Ci/mmol), 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) at 4 °C, 24 °C, or 37 °C (Allen *et al.*, 2003). Incubation times were as indicated in the figure legends. The reaction volume was 250 µl and contained 50,000 cells. Non-radioactive ET-1, BQ610, and BQ788 were prepared as 10 mM stocks in 100% DMSO. Salicylic acid was prepared fresh daily as a stock solution in Buffer D and the pH readjusted to 7.45 unless otherwise indicated. Buffer, ligand and antagonists were combined in the tubes (12 x 75 mm polypropylene) and binding was initiated by the addition of a 100 µl aliquot of cells suspended at 500,000 cell/ml in buffer D. Where indicated, isolated membranes (10 µg/tube) were used in place of intact cells. Preliminary experiments were performed to ensure that specific ET-1 binding was linear with protein concentration and that less than 5% of the total [<sup>125</sup>I]ET-1 was bound. Non-specific binding was measured as the binding obtained in the presence of 10<sup>-7</sup> M non-labeled ET-1. Binding was terminated by rapid filtration under reduced pressure through Whatman glass microfiber filters (GF/C) with a cell harvester (Brandel). Tubes and filters were rinsed three times with cold 25 mM Tris-HCl, pH 7.5. Before filtration, filters were blocked by incubation for 60 min in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 5% (w/v) dry skim milk powder (Carnation). Radioactivity on the filters was quantified using a gamma counter (LKB Wallac). To determine the specific activity of the [<sup>125</sup>I]ET-1 solution, 10 µl aliquots were quantified in quadruplicate by gamma counting during each binding assay. Data was analyzed by iterative curve-fitting using a non-linear-fitting program (Prism 3.0cx, GraphPad Software).

*Determination of Phospho-MAP Kinases.* Phospho-ERK1/2 and p38 MAP kinase were determined in lysates using phospho-specific antibodies following the procedure described by the manufacturer. Stimulation and lysate preparation was as described previously (Chevalier and Allen, 2000; Chevalier *et al.*, 2000). Briefly, myocytes were divided into aliquots in 1.5 ml microcentrifuge tubes and used immediately after isolation. Cells were incubated in the presence or absence of various concentrations of SA and the presence or absence of 100 nM ET-1 for 5 min at 24 °C. Where employed, SB203580 and PD98059 were added to a final concentration of 10 mM from 10 mM stock solutions and incubations were for 5 min at 24 °C. To terminate the incubation, cells were chilled to 0 °C for 1 min, pelleted in a microcentrifuge at 3,000 rpm and 5 °C for 5 min, and resuspended in 0.5 ml of ice-cold lysis buffer that comprised 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 5 °C), 20 mM b-glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 5 mM DTT, 1 mM microcystin LR, and 1% (v/v) Triton X-100 (reduced). Cells were extracted by mixing for 15 min at 5 °C using a clinical rotator, centrifuged at 13,000 x g and 5 °C for 15 min, and the soluble fraction retained. Aliquots (100 mg) of each lysate were resolved by electrophoresis on 10-20% acrylamide-gradient SDS-PAGE. Following SDS-PAGE, samples were transferred at 100 V and 5 °C for 90 min onto 0.2 mm reinforced nitrocellulose membranes in 25 mM Tris base, 192 mM glycine, and 5% methanol. Membranes were blocked for 2 hr in a solution of 5% (w/v) skimmed milk powder (Carnation) in 25 mM Tris (pH 7.5 at 20 °C), 150 mM NaCl (TBS), and 0.05% (v/v) Tween-20 (TBST) then incubated with primary antibodies, diluted 1:1000 with 1% BSA plus 0.04% (w/v) sodium azide in TBST, for 16 hr at 5 °C. After washing with TBST, membranes were reblocked for 10 min with TBST containing 5% skimmed milk powder and then incubated in the presence of horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit immunoglobulin, diluted 1:20,000 in blocking buffer, for 2 hr at room temp. Immune complexes were detected by the ECL Western blotting detection method (Renaissance

Plus, NEN Life Sciences, Boston, MA) according to the manufacturer's instructions and visualized using Kodak BioMax ML or MR film. Immunoblots were quantified by digitizing on a flat bed scanner and analyzed with Quantity One software (Version 4.4, Bio-Rad Laboratories, Inc.). In order to reprobe the nitrocellulose membranes, they were stripped by incubating twice for 15 min at room temperature in 0.2 M NaOH, with constant mixing, followed by a brief rinse with TBST (Suck and Krupinska, 1996; Wang *et al.*, 1999). Membranes were subsequently blocked and incubated with primary antibodies against total ERK1/2, as described above, to ensure equal sample loading.

*Statistical Analysis.* Data are represented as the mean  $\pm$  the standard error (SE) of the mean. The significance of differences between groups was estimated using unpaired T tests or one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc analysis (Prism 3.0cx, GraphPad Software) as described in figure legends. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Protein concentrations were measured according to the method of Bradford (Bradford, 1976) using bovine  $\gamma$ -globulin as a standard.

## Results

Formation of the ET-1 receptor-ligand complex is essentially irreversible and this may represent a serious limitation with respect to the effectiveness of ET receptor antagonists. Acetyl salicylic acid and salicylic acid (SA) were recently shown to reduce [ $^{125}$ I]ET-1 binding by promoting the dissociation of [ $^{125}$ I]ET-1 from recombinant rat ET<sub>A</sub>R in membranes isolated from CC139 fibroblasts (Talbot *et al.*, 2000). Under similar experimental conditions, binding to recombinant rat ET<sub>B</sub>R was unaffected. To determine if SA is also capable of producing this effect in intact cardiac myocytes, the binding of ET-1 to freshly isolated intact myocytes was determined in the absence or presence of SA. In the present studies SA was employed at a concentration of 5 mM and binding determined under previously established conditions (Allen *et al.*, 2003): in isolated membranes, 10 mM SA produced a 50% reduction in specific [ $^{125}$ I]ET-1 binding (Talbot *et al.*, 2000). Association was followed for 1 hr, in the presence or absence of SA, and SA did not modify the binding of ET-1 (Fig. 1). To study dissociation, binding of [ $^{125}$ I]ET-1 was initiated, in the presence or absence of SA, and allowed to proceed for 60 min at room temperature, at which time non-labeled ET-1 was added to a concentration of 0.1  $\mu$ M, representing a 2,500-fold excess, to prevent further binding of [ $^{125}$ I]ET-1. As reported previously (Allen *et al.*, 2003), a component (ca 15%) of total specific bound [ $^{125}$ I]ET-1 dissociated within 30 minutes whereas the remaining 85% remained bound for the duration of the experiment (Fig. 1). In this experiment, the pH of SA stock solution was adjusted to 7.45 to be compatible with the cell isolation and binding media. As acidic conditions induce human ET<sub>A</sub>R, but not human ET<sub>B</sub>R, to release ET-1 (Takasuka *et al.*, 1992a), the effect of SA upon the association and dissociation of ET-1 was determined following the addition of SA from a stock solution where the pH had not been adjusted to 7.45; however, no effect of SA upon [ $^{125}$ I]ET-1 binding was observed (Not shown).

Based upon [ $^{125}$ I]ET-1 binding, the ratio of  $ET_A R$  :  $ET_B R$  on the surface of intact adult rat ventricular myocytes is 4 : 1 (Allen *et al.*, 2003). In order to determine if there were any receptor subtype-specific effects of SA in these cells, 1  $\mu$ M BQ610 or BQ788 were employed to block, respectively,  $ET_A R$  and  $ET_B R$  and the association and dissociation of [ $^{125}$ I]ET-1 studied as described above. No effect of SA was observed upon [ $^{125}$ I]ET-1 binding to either receptor subtype (Not Shown). Another possible explanation for the lack of observed effect of SA in intact myocytes is internalization of the  $ET R$ -[ $^{125}$ I]ET-1 complexes. However, neither association (Fig. 2A) nor dissociation (Fig. 2B) were effected by SA when binding was performed at 4°C, 24°C, or 37°C. Receptor internalization would occur at 4°C. Hence, receptor internalization was not preventing SA from modifying the kinetic parameters of the ET receptor-ligand complexes and at a concentration of 5 mM, SA did not alter [ $^{125}$ I]ET-1 binding in intact myocytes.

In light of the above results we examined the concentration-dependency of SA for reducing ET-1 binding in order to determine if the  $IC_{50}$  for SA in intact myocytes differed from values previous obtained using membranes isolated from fibroblasts transfected with rat  $ET_A R$ . Following 1 hr of incubation, ET-1 binding was reduced significantly ( $p < 0.001$ , ANOVA) from  $4.13 \pm 0.39$  to  $1.75 \pm 0.17$  fmol/50,000 cells in the presence of 100 mM SA (Fig. 3A). Although binding was reduced in the presence of 10 mM SA, a concentration equivalent to the  $IC_{50}$  for SA in fibroblast membranes, this difference was not statistically significant in intact myocytes. To examine the effect of SA concentration upon dissociation, following binding for 1 hr, excess ET-1 (0.1  $\mu$ M) was added and incubation was continued for 2 additional hours (Fig. 3B). SA reduced [ $^{125}$ I]ET-1 binding, but this inhibition was significant only at a concentration of 100 mM. Interestingly, an examination of the ratio of [ $^{125}$ I]ET-1 bound following 2 hr in the presence of excess non-labeled ET-1 versus [ $^{125}$ I]ET-1 bound following 1 hr incubation with [ $^{125}$ I]ET-1 alone revealed that dissociation was increased in the presence on 100 mM SA (Fig. 3C). In order to determine if the effect of SA upon the kinetics of ET-1 binding required

cytosolic elements, the effect of SA upon [<sup>125</sup>I]ET-1 binding was determined in membranes isolated from myocytes. Similar results were observed when binding was performed upon membranes isolated from ventricular myocytes (Fig. 4A & B). However, the ratio of [<sup>125</sup>I]ET-1 bound following 2 hr in the presence of excess non-labeled ET-1 versus [<sup>125</sup>I]ET-1 bound following 1 hr incubation with [<sup>125</sup>I]ET-1 was unaffected by SA in isolated membranes (Fig. 4C). Hence, in both cardiac myocytes, and membranes isolated from myocytes, SA reduced ET-1 binding, but at much higher concentrations than observed using membranes isolated from fibroblasts transfected with rat ET<sub>A</sub>R.

We then examined if the concentration of SA required to inhibit post receptor signalling events corresponded with that required induce ET-1 dissociation from ETR. One of the signalling processes activated by ET-1 in ventricular myocytes is the ERK MAP kinase cascade. Hence, the ability of SA to inhibit ET-1-induced ERK1/2 phosphorylation, an index of activation, was examined. As ET-1-mediated ERK activation reaches its maximum within 3-5 min and returns to baseline following 10 min of stimulation<sup>1</sup> with 100 nM ET-1, a stimulation time of 5 minutes was employed. Phosphorylation was determined using antisera specific for the dual-phosphorylated form of the T-E-Y motif located in the activation loop of ERK1/2. ET-1 increased levels of both phospho-ERK1 (p44) and phospho-ERK2 (p42) (Fig. 5A,B). SA induced a modest, but incomplete, reduction in ET-1-induced ERK phosphorylation. An examination of the effect of SA alone, in the absence of ET-1, revealed that at elevated concentrations, SA induced ERK phosphorylation (Fig. 5). Interestingly, following incubation with 100 mM SA, in the presence or absence of ET-1, a 40-kDa band (p40) was detected using the anti phospho-ERK antibodies. No band of this electrophoretic mobility was detected using antisera to total ERK1/2 (not shown). PD98059, an inhibitor of MEK activation, produced a small, but not significant reduction in SA-mediated ERK phosphorylation. In contrast, the p38 MAP kinase inhibitor SB203580 (Fig. 6) further increased the phosphorylation of both p42 and p44 ERK and this increase differed significantly from

both control levels and those in the presence of SA+PD. Phosphorylation of p40 was unaffected by PD98059 but markedly reduced by SB203580 (Fig. 7). To determine if these post receptor signaling events play a role in the SA-induced alteration in the kinetics of ET-1 binding, the effect of SB203580 and PD98059 were examined in radioligand binding assays. However, neither inhibitor altered the ability of 100 mM SA to alter ET-1 binding in intact myocytes (Fig. 8A,B).



## Discussion

The irreversible nature of the ET-1 receptor-ligand complex presents potential problems with respect to the effectiveness of endothelin receptor antagonists as therapeutic agents. In this study we show that the binding of [<sup>125</sup>I]ET-1 to its receptors on adult rat ventricular myocytes was altered by salicylic acid (SA). However, whereas the IC<sub>50</sub> of SA was 10 mM SA in studies employing recombinant rat ET<sub>A</sub>R in membranes isolated from CC139 fibroblasts (Talbot *et al.*, 2000), concentrations on the order of 100 mM were required in order to produce a significant reduction in ET-1 binding in myocytes or membranes isolated from these cells. As IC<sub>50</sub> values of 2 mM (salicylic acid) and 3 mM (acetyl salicylic acid) were obtained for inhibition of ET<sub>A</sub>R-mediated mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cerebral vascular endothelial cells (Talbot *et al.*, 2000), it is unlikely that the reduced sensitivity to SA observed in intact myocytes reflected differences in the accessibility of SA to binding sites on the ET<sub>A</sub>R in intact cells versus isolated membranes. Similar concentration of SA were required to alter the dissociation properties of the ETR, activate p42 and p44 ERK MAP kinases, and induce the phosphorylation of a 40 kDa protein. Although the mechanism whereby SA acts upon ET<sub>A</sub>R has been shown to be via allosteric regulation, and this effect is a characteristic of numerous derivatives of benzoic acid and salicylic acid (Blandin *et al.*, 2000), the site of action of SA within the ET<sub>A</sub>R and its orientation with respect to the cell interior remains to be determined. Interestingly, an allosteric role, in addition to its direct action as a competitive ETAR antagonist, has been proposed for BQ123 (Sokolovsky, 1993).

ET<sub>A</sub>R localize primarily to the plasma membrane (Abe *et al.*, 2000; Boivin *et al.*, 2003; Robu *et al.*, 2003) and internalize in a ligand-dependent manner (Chun *et al.*, 1995), in a process thought to be clathrin-mediated, passing through early endosomes for subsequent sorting (Bremnes *et al.*, 2000). ET<sub>A</sub>R have also been shown to localize to caveolae and internalize with caveolin (Chun *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 2000).

However, the reported differences in ET<sub>A</sub>R internalization may depend upon cell type as well as other factors underlying pathway selection. Once internalized, whether via clathrin or caveolin, ET<sub>A</sub>R pass through the pericentriolar recycling compartment and then back to the plasma membrane (Bremnes *et al.*, 2000). In light of the long half-life of the receptor-ligand complex, it remains to be explained how the ET<sub>A</sub>R-ET-1 complexes dissociate upon internalization, allowing ET<sub>A</sub>R to return to the cell surface in order to participate in another round of ligand binding, signal initiation, and internalization. Perhaps the time required for recycling of the ET<sub>A</sub>R is greater than the half-life of the receptor ligand complex. Alternatively, there may exist an intracellular ligand that interacts with the internalized ET<sub>A</sub>R-ET-1 complex and induces its dissociation. If so, both the allosteric site and its ligand represent important potential targets for therapeutic intervention.

SA-mediated relaxation of ET-1-induced contractions are faster than SA-induced dissociation of ET-1 receptor complexes (Talbot *et al.*, 2000). This suggests SA has more than one target within the cell. In the present study SA activated the ERK MAP kinase cascade. Similarly, effects of salicylate and/or salicylate derivatives have been reported on other MAP kinases cascades. In human FS-4 fibroblasts, salicylate (20 mM) inhibits TNF-induced ERK and JNK activation while activating p38 MAP kinase (Schwenger *et al.*, 1997; Schwenger *et al.*, 1996). However, ERK and JNK activation in response to EGF stimulation is much less sensitive to inhibition by SA in these cells (Schwenger *et al.*, 1997; Schwenger *et al.*, 1996). In COS-1 and HT-29 cells, SA alone activates JNK whereas it inhibits the more potent activation of JNK produced by TNF (Schwenger *et al.*, 1999). In the present study, SA reduced ET-1 binding in both intact cells and isolated membranes and this effect was not altered by inhibitors of the p38 or ERK MAP kinase pathways. However, the effects of SA upon dissociation appeared to differ in that in intact cells, but not isolated membranes, a clear effect upon dissociation was detected in the presence of 100 mM SA. Hence, SA may be influencing cellular

responses to ET-1 via stimulatory and/or inhibitory effects upon other signalling pathways in addition to its direct effects upon the ETR and these effects are dependent upon the type of cell employed, the study of recombinant versus endogenous receptors, and the use of intact tissue and cells versus isolated membranes.

In conclusion, the present study demonstrates that, in the intact rat ventricular myocytes, ET-1 binding was reduced by salicylic acid; however, higher concentrations were required in intact myocytes than described previously for recombinant rat ET<sub>A</sub>R in isolated membranes. Studies are currently underway to explain the apparent differences between fibroblasts and ventricular myocytes and to identify the 40 kDa protein that underwent phosphorylation at a T-E-Y motif in response to 100 mM SA.

### **Acknowledgements**

We thank Dominique Chevalier for technical assistance. This work was supported by grants from the Quebec Heart and Stroke Foundation and the Fonds de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (FRICM). BGA was a New Investigator of the Heart and Stroke Foundation of Canada is currently holds a Senoir Scientist Award from the Fonds de la recherche en Santé du Québec (FRSQ).

## References

- Abe, Y., Nakayama, K., Yamanaka, A., Sakurai, T., and Goto, K. 2000. Subtype-specific trafficking of endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **275**: 8864-8671.
- Allen, B.G., Farhat, H., Phuong, L.L., and Chevalier, D. 2003. Both endothelin-A and endothelin-B receptors are present on adult rat cardiac ventricular myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**: 95-104.
- Blandin, V., Vigne, P., Breittmayer, J., and Frelin, C. 2000. Allosteric inhibition of endothelin ETA receptors by 3, 5-dibromosalicylic acid. *Mol. Pharmacol.* **58**: 1461-1469.
- Boivin, B., and Allen, B.G. 2003. Regulation of the plasma membrane-bound PKC in adult cardiac ventricular myocytes. *Cell Signal.* **15**: 217-224.
- Boivin, B., Chevalier, D., Villeneuve, L.R., Rousseau, E., and Allen, B.G. 2003. Localization of functional endothelin receptors on the nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **278**: 29153-19163.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bremnes, T., Paasche, J.D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B., and Attramadal, H. 2000. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **275**: 17596-17604.
- Chevalier, D., and Allen, B.G. 2000. Two distinct forms of MAPKAP kinase-2 in adult cardiac ventricular myocytes. *Biochemistry* **39**: 6145-6156.
- Chevalier, D., Thorin, E., and Allen, B.G. 2000. Simultaneous measurement of ERK, p38, and JNK MAP kinase cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **44**: 429-439.

- Chun, M., Lin, H.Y., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. 1995. Endothelin-induced endocytosis of cell surface ET<sub>A</sub> receptors. Endothelin remains intact and bound to the ET<sub>A</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 10855-10860.
- Chun, M., Liyanage, U.K., Lisanti, M.P., and Lodish, H.F. 1994. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11728-11732.
- Desmarets, J., Gresser, O., Guedin, D., and Frelin, C. 1996. Interaction of endothelin-1 with cloned bovine ETA receptors: biochemical parameters and functional consequences. *Biochemistry* **35**: 14868-14875.
- Freedman, N.J., Ament, A.S., Oppermann, M., Stoffel, R.H., Exum, S.T., and Lefkowitz, R.J. 1997. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J. Biol. Chem.* **272**: 17734-17743.
- Hara, M., Tozawa, F., Itazaki, K., Mihara, S., and Fujimoto, M. 1998. Endothelin ET<sub>B</sub> receptors show different binding profiles in intact cells and cell membrane preparations. *Eur. J. Pharmacol.* **345**: 339-342.
- Hilal-Dandan, R., Villegas, S., Gonzalez, A., and Brunton, L.L. 1997. The quasi-irreversible nature of endothelin binding and G protein-linked signaling in cardiac myocytes. *J. Pharm. Exp. Ther.* **281**: 267-273.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, T., and Masaki, T. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2863-2867.
- Karne, S., Jayawickreme, C.K., and Lerner, M.R. 1993. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET<sub>C</sub> receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **268**: 19126-19133.

- Modesti, P.A., Vanni, S., Paniccia, R., Perma, A., Maccherini, M., Lisi, G., Sani, G., and Seneri, G.G.N. 1999. Endothelin receptors in adult human and swine isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem. Pharmacol.* **58**: 369-374.
- Okamoto, Y., Ninomiya, H., Miwa, S., and Masaki, T. 2000. Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 6439-6446.
- Oksche, A., Boese, G., Horstmeyer, A., Furkert, J., Beyermann, M., Bienert, M., and Rosenthal, W. 2000. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol. Pharmacol.* **57**: 1104-1113.
- Paasche, J.D., Attramadal, T., Sandberg, C., Johansen, H.K., and Attramadal, H. 2001. Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J. Biol. Chem.* **276**: 34041-34050.
- Robu, V.G., Pfeiffer, E.S., Robia, S.L., Balijepalli, R.C., Pi, Y., Kamp, T.J., and Walker, J.W. 2003. Localization of functional endothelin receptor signaling complexes in cardiac transverse tubules. *J. Biol. Chem.* **278**: 48154-48161.
- Rodrigues, B., and Severson, D.L. (1997). Preparation of cardiomyocytes. In *Biochemical Techniques in the Heart*. ed McNeill, J.H. pp. 101-115. New York: CRC Press.
- Rubanyi, G.M., and Polokoff, M.A. 1994. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**: 325-415.
- Schwenger, P., Alpert, D., Skolnik, E.Y., and Vilcek, J. 1999. Cell-type-specific activation of cJun N-terminal kinase by salicylates. *J. Cell. Physiol.* **179**: 109-114.
- Schwenger, P., Bellosta, P., Vietor, I., Basilico, C., Skolnik, E.Y., and Vilcek, J. 1997. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2869-2873.

- Schwenger, P., Skolnik, E.Y., and Vilcek, J. 1996. Inhibition of tumor necrosis factor-induced p42/p44 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate. *J. Biol. Chem.* **271**: 8089-8094.
- Sokolovsky, M. 1993. BQ-123 identifies heterogeneity and allosteric interactions at the rat heart endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**: 32-38.
- Suck, R.W., and Krupinska, K. 1996. Repeated probings of western blots obtained from Coomassie brilliant blue-stained or unstained polyacrylamide gels. *Biotechniques* **21**: 418-422.
- Takasuka, T., Adachi, M., Miyamoto, C., Furuichi, Y., and Watanabe, T. 1992a. Characterization of endothelin receptor ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> expressed in COS cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **112**: 396-400.
- Takasuka, T., Akiyama, N., Horii, I., Furuichi, Y., and Watanabe, T. 1992b. Different stability of ligand-receptor complex formed with two endothelin receptor species, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**: 748-753.
- Takasuka, T., Sakurai, T., Goto, K., Furuichi, Y., and Watanabe, T. 1994. Human endothelin receptor ET<sub>B</sub>. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand. *J. Biol. Chem.* **269**: 7509-7513.
- Talbodec, A., Berkane, N., Blandin, V., Breittmayer, J.P., Ferrari, E., Frelin, C., and Vigne, P. 2000. Aspirin and sodium salicylate inhibit endothelin ET<sub>A</sub> receptors by an allosteric type of mechanism. *Mol. Pharmacol.* **57**: 797-804.
- Wang, X., Bruderer, S., Rafi, Z., Xue, J., Milburn, P.J., Krämer, A., and Robinson, R.J. 1999. Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly. *EMBO J.* **18**: 4549-4559.



<sup>1</sup> Farhat, H. and Allen, BG., In Preparation

## Legends

**Figure 1. Effect of salicylic acid upon the binding and dissociation of ET-1.** Myocytes were incubated with [ $^{125}$ I]ET-1 (40 pM) in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) in the absence (solid) or presence (open) of 5 mM salicylic acid. After 60 min, excess non-radioactive ET-1 (0.1  $\mu$ M) was added. At the indicated times, binding of [ $^{125}$ I]ET-1 was assessed as described in Methods. Salicylic acid stock solutions were adjusted to pH 7.45. Data shown are means ( $\pm$ SE) of 5 independent experiments using separate cell isolations. Each experiment was performed in quadruplicate.

**Figure 2. Effect of temperature on [ $^{125}$ I]ET-1 binding in the presence and absence of salicylic acid.** Myocytes were incubated with [ $^{125}$ I]ET-1 (40 pM) in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) in the absence (open) or presence (solid) of 5 mM salicylic acid at 4 °C, 24 °C, or 37 °C. (A) To study the association of ET-1, cells were incubated at the indicated temperature in the presence of [ $^{125}$ I]ET-1 for 60 min and then binding terminated by rapid filtration. (B) To study the dissociation of ET-1, cells were incubated at the indicated temperature in the presence of [ $^{125}$ I]ET-1 for 60 min at which time excess non-radioactive ET-1 (0.1  $\mu$ M) was added and the incubation continued for an additional 2 hrs. Binding was terminated by rapid filtration and [ $^{125}$ I]ET-1 binding was assessed as described in Methods. Data shown are means ( $\pm$ SE) of 3 independent experiments using separate cell isolations. Each experiment was performed in quadruplicate.

**Figure 3. High concentrations of salicylic acid reduce ET-1 binding in intact myocytes.** Myocytes were incubated with [ $^{125}$ I]ET-1 (40 pM) in Buffer D (Joklik MEM

supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) and either the absence (-) or presence of the indicated concentration of salicylic acid. (A) To study the effect of salicylic acid upon the association of ET-1, cells were incubated at room temperature in the presence of [<sup>125</sup>I]ET-1 for 60 min and then binding terminated by rapid filtration. (B) To study the effect of salicylic acid upon the dissociation of ET-1, cells were incubated in the presence of [<sup>125</sup>I]ET-1 for 60 min at which time, excess non-radioactive ET-1 (0.1 µM) was added and the incubation continued for an additional 2 hrs. Binding was terminated by rapid filtration and [<sup>125</sup>I]ET-1 binding was assessed as described in Methods. (C) To determine if salicylic acid altered the rate of dissociation the ratio of [<sup>125</sup>I]ET-1 bound after 1 hr (A) versus that remaining after 2 hour incubation in the presence of excess non-labeled ET-1 (B) was determined for each SA concentration. Data shown are means (±SE) of 4 independent experiments using separate cell isolations. Each experiment was performed in quadruplicate. \*  $p < 0.05$  vs. control (-), \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (-) (ANOVA with Dunnett's posthoc analysis).

**Figure 4. Effect of salicylic acid upon ET-1 binding in isolated membranes.** Myocytes were isolated and membranes prepared as described in 'Methods'. Isolated membranes (10 µg/tube) were incubated with [<sup>125</sup>I]ET-1 (40 pM) in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) and either the absence (-) or presence of the indicated concentration of salicylic acid. (A) To study the effect of salicylic acid upon the association of ET-1, membranes were incubated in the presence of [<sup>125</sup>I]ET-1 for 60 min and then binding terminated by rapid filtration. (B) To study the effect of salicylic acid upon the dissociation of ET-1, membranes were incubated in the presence of [<sup>125</sup>I]ET-1 for 60 min at which time, excess non-radioactive ET-1 (0.1 µM) was added and the incubation continued for an additional 2 hrs. Binding was terminated

by rapid filtration and [ $^{125}$ I]ET-1 binding was assessed as described in Methods. (C) To determine if salicylic acid altered the rate of dissociation the ratio of [ $^{125}$ I]ET-1 bound after 1 hr (A) versus that remaining after 2 hour incubation in the presence of excess non-labeled ET-1 (B) was determined for each SA concentration. Data shown are means ( $\pm$ SE) of 4 independent experiments using membranes prepared from different cell isolations. Each experiment was performed in quadruplicate. \*  $p < 0.05$  vs. control (-) (unpaired T-test).

**Figure 5. Effect of salicylic acid upon ERK phosphorylation.** Myocytes were isolated and incubated for 5 min at 37 °C in the presence (+) or absence (-) of ET-1 (100 nM) in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) and either the absence (-) or presence of the indicated concentration of salicylic acid. Cells were then chilled to 0 °C for 1 min, pelleted in a microcentrifuge at 3,000 rpm and 5 °C for 5 min. Lysates were prepared and phospho-ERK1 (p44) and ERK2 (p42) levels determined as described in 'Methods'. Panel A shows a representative experiment whereas quantification of p42 (solid) and p44 (open) phosphorylation in response to the indicated concentrations of SA and in the presence or absence of ET-1 are shown in panels B and C, respectively. Data shown are means ( $\pm$ SE) of 4 independent experiments using separate cell isolations.

**Figure 6. Effect of MAP kinase inhibitors upon p42 and p44 ERK phosphorylation.** Myocytes were isolated and incubated for 5 min at 37 °C in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) and either the absence (C) or presence of salicylic acid (100 mM, SA), salicylic acid plus PD98059 (10  $\mu$ M, SA+PD), or salicylic acid plus SB203580 (10  $\mu$ M, SA+SB). Preincubations with SB203580 or PD98050 were for 5 min. Cells were then chilled to 0 °C for 1 min, pelleted

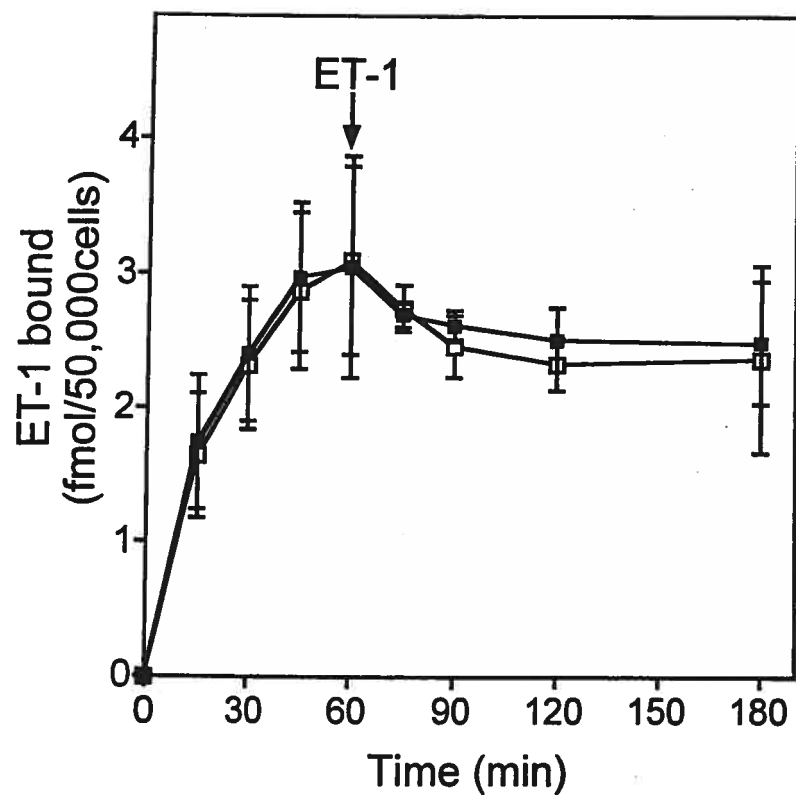
in a microcentrifuge at 3,000 rpm and 5 °C for 5 min. Lysates were prepared and T-E-Y phosphorylation of p42 (solid) and p44 (open) was determined by immunoblotting as described in 'Methods'. Data shown are means ( $\pm$ SE) of 4 independent experiments using separate cell isolations. \*  $p < 0.05$  vs. control (C), \*\*  $p < 0.01$  vs. control (C), ‡  $p < 0.05$  vs. SA+PD (ANOVA with Dunnett's posthoc analysis).

**Figure 7. Effect of MAP kinase inhibitors upon p40 phosphorylation.** Myocytes were isolated and incubated for 5 min at 37 °C in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C) and either the absence (C) or presence of salicylic acid (100 mM, SA), salicylic acid plus PD98059 (10 µM, SA+PD), or salicylic acid plus SB203580 (10 µM, SA+SB). Preincubations with SB203580 or PD98059 were for 5 min. Cells were then chilled to 0 °C for 1 min, pelleted in a microcentrifuge at 3,000 rpm and 5 °C for 5 min. Lysates were prepared and T-E-Y phosphorylation of p40 was determined by immunoblotting as described in 'Methods'. Data shown are means ( $\pm$ SE) of 4 independent experiments using separate cell isolations. \*\*  $p < 0.01$  vs. SA (ANOVA with Dunnett's posthoc analysis).

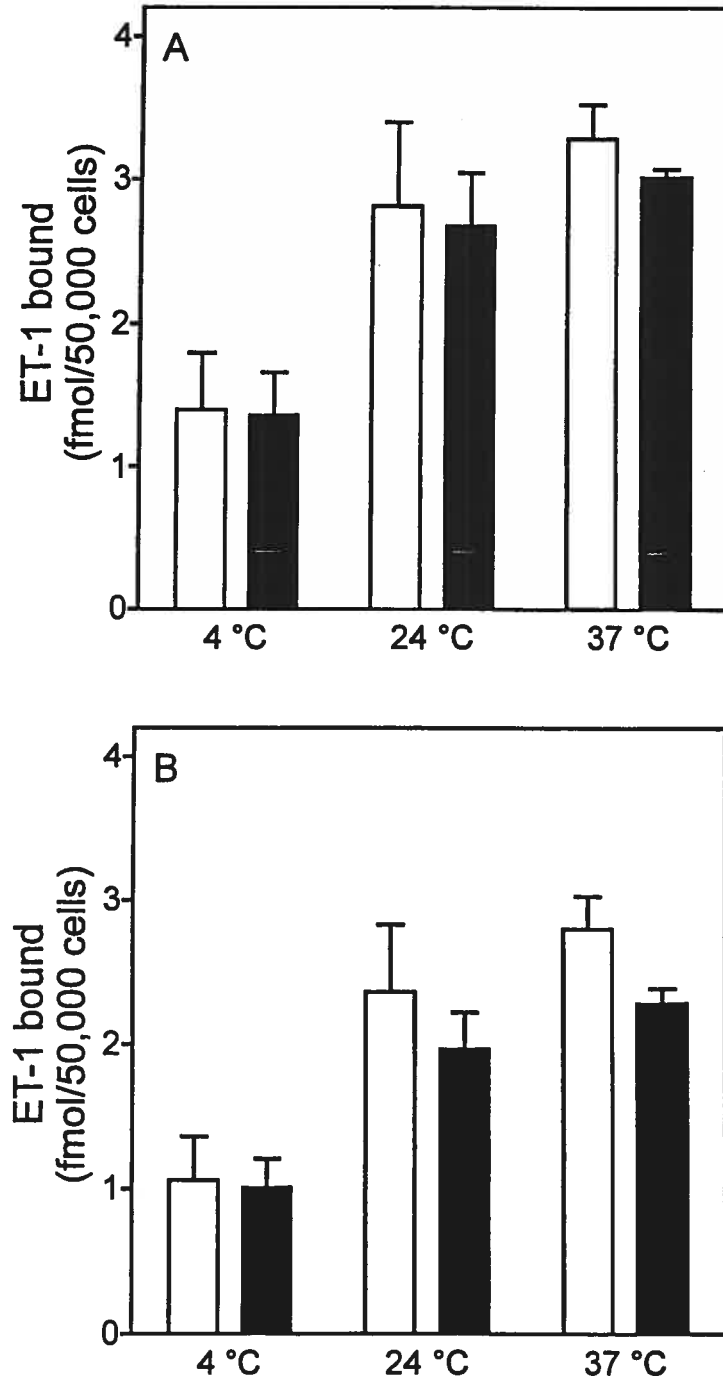
**Figure 8. Effect of PD98059 and SB203580 upon the binding and dissociation of ET-1.** Myocytes were incubated with [<sup>125</sup>I]ET-1 (40 pM) and in the presence or absence or SA (100 mM) plus BQ610 (1 µM), BQ788 (1 µM), PD98059 (10 µM), or SB203580 (10 µM), as indicated, in Buffer D (Joklik MEM supplemented with 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 1 mM DL-carnitine, 10 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 500 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 at 24 °C). (A) To study the effect of MAP kinase inhibitors and SA upon the association of ET-1, cells were incubated at room temperature in the presence of [<sup>125</sup>I]ET-1 for 60 min and then binding terminated by rapid filtration. (B) To study the effect upon the dissociation of ET-1, cells were incubated in the presence of [<sup>125</sup>I]ET-1 for 60 min at which time, excess non-radioactive ET-1 (0.1 µM) was added and the

incubation continued for an additional 2 hrs. Binding was terminated by rapid filtration and [<sup>125</sup>I]ET-1 binding was assessed as described in Methods. Data shown are means ( $\pm$ SE) of 4 independent experiments using separate cell isolations. Each experiment was performed in quadruplicate.

Farhat and Allen  
Figure 1

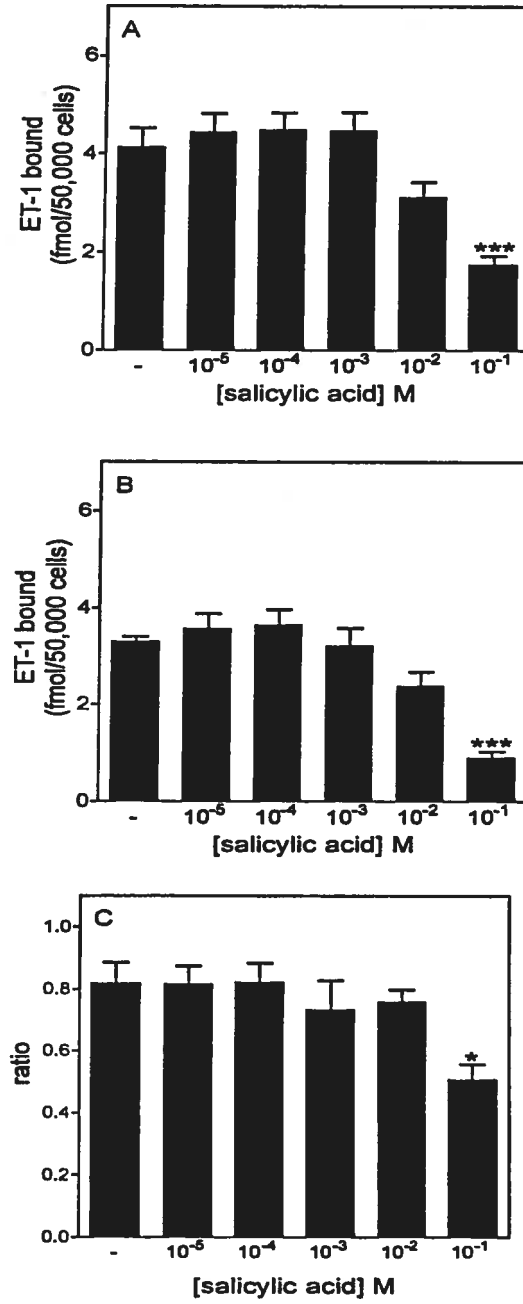


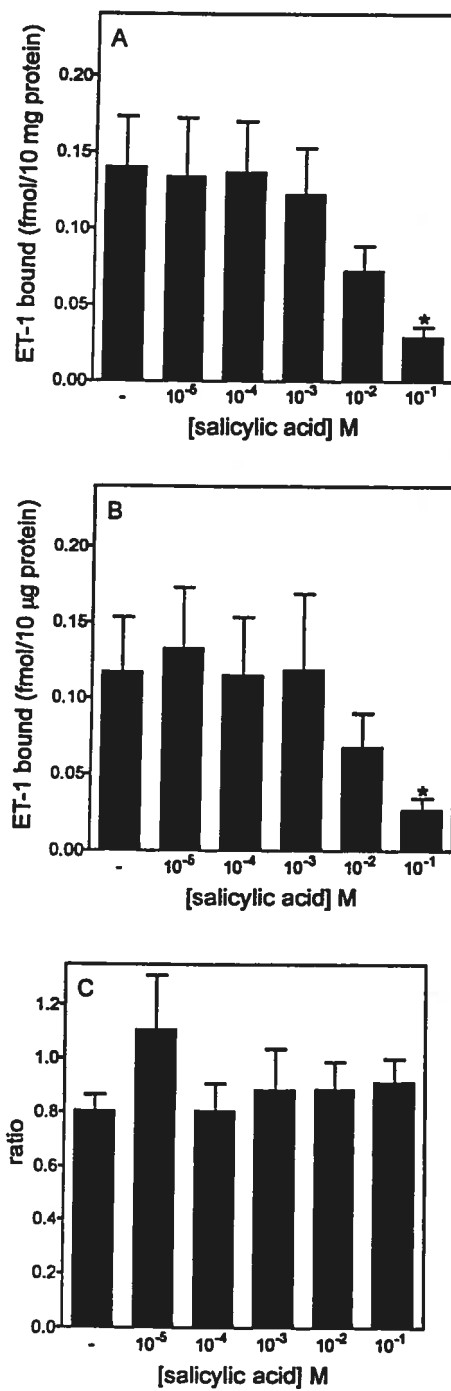
Farhat and Allen  
Figure 2



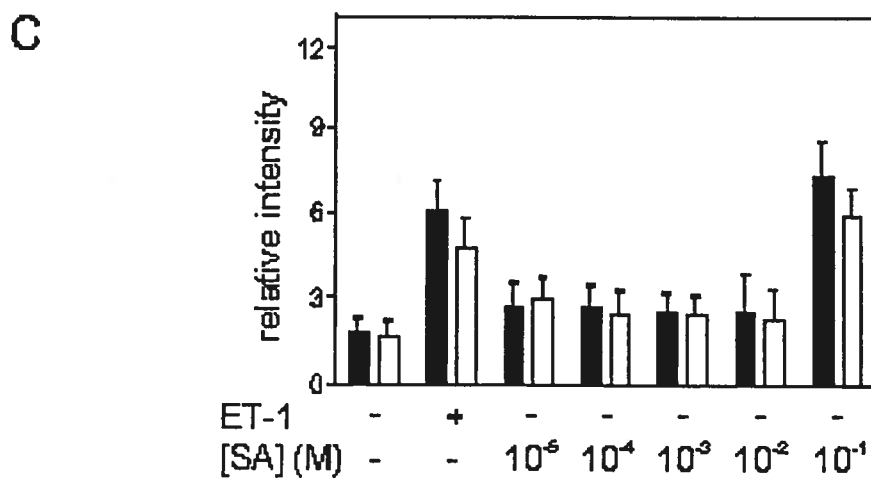
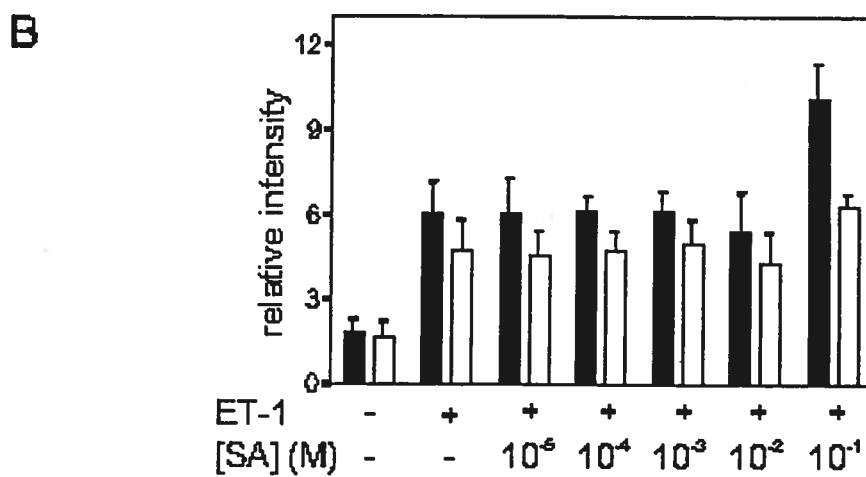
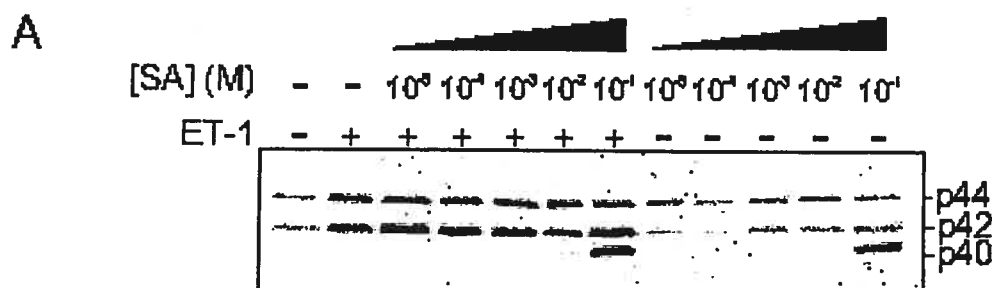


Farhat and Allen  
Figure 3

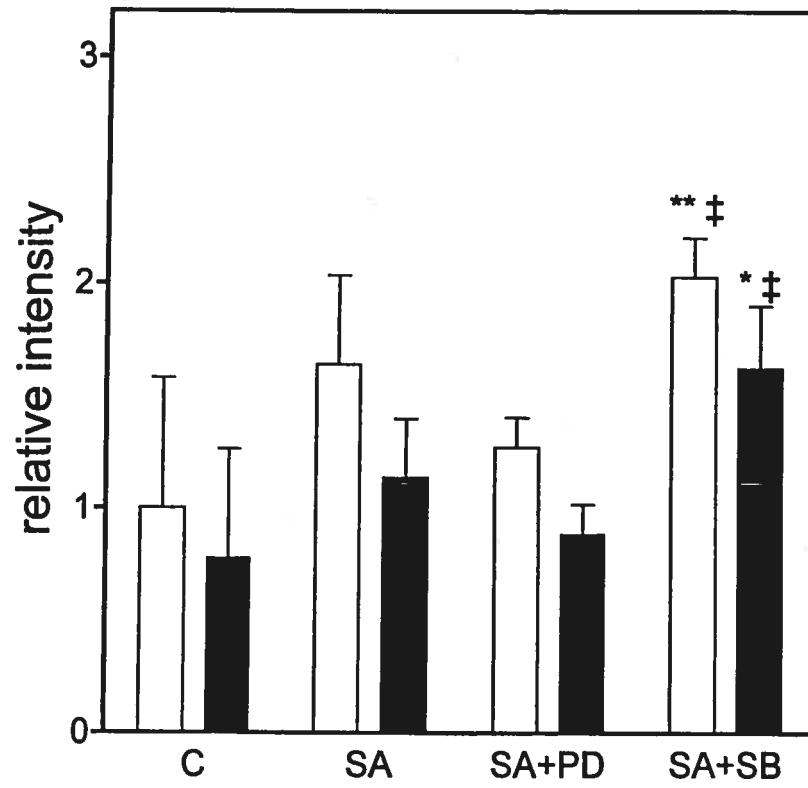


Farhat and Allen  
Figure 4

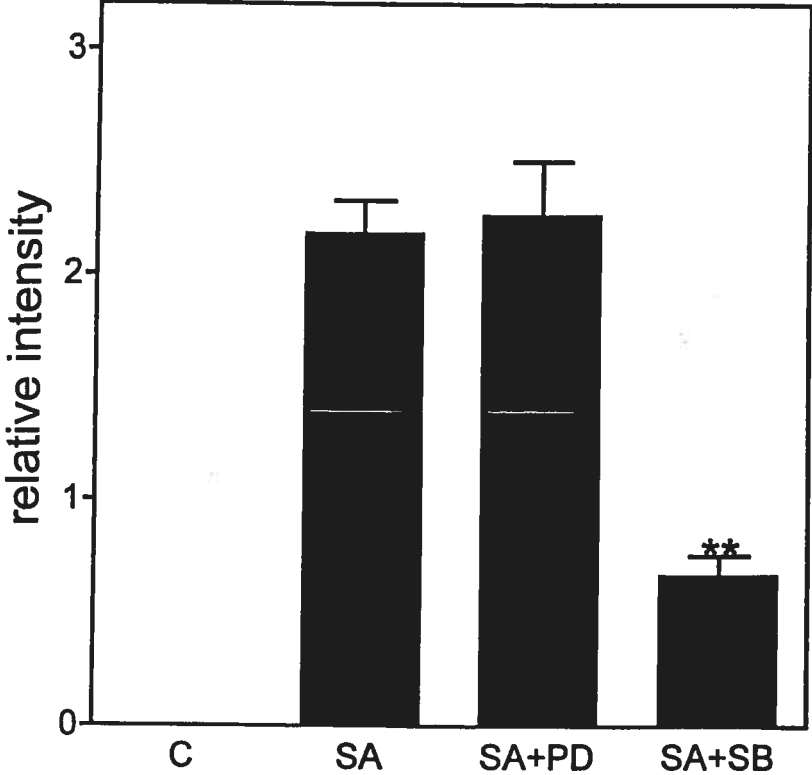
Farhat and Allen  
Figure 5



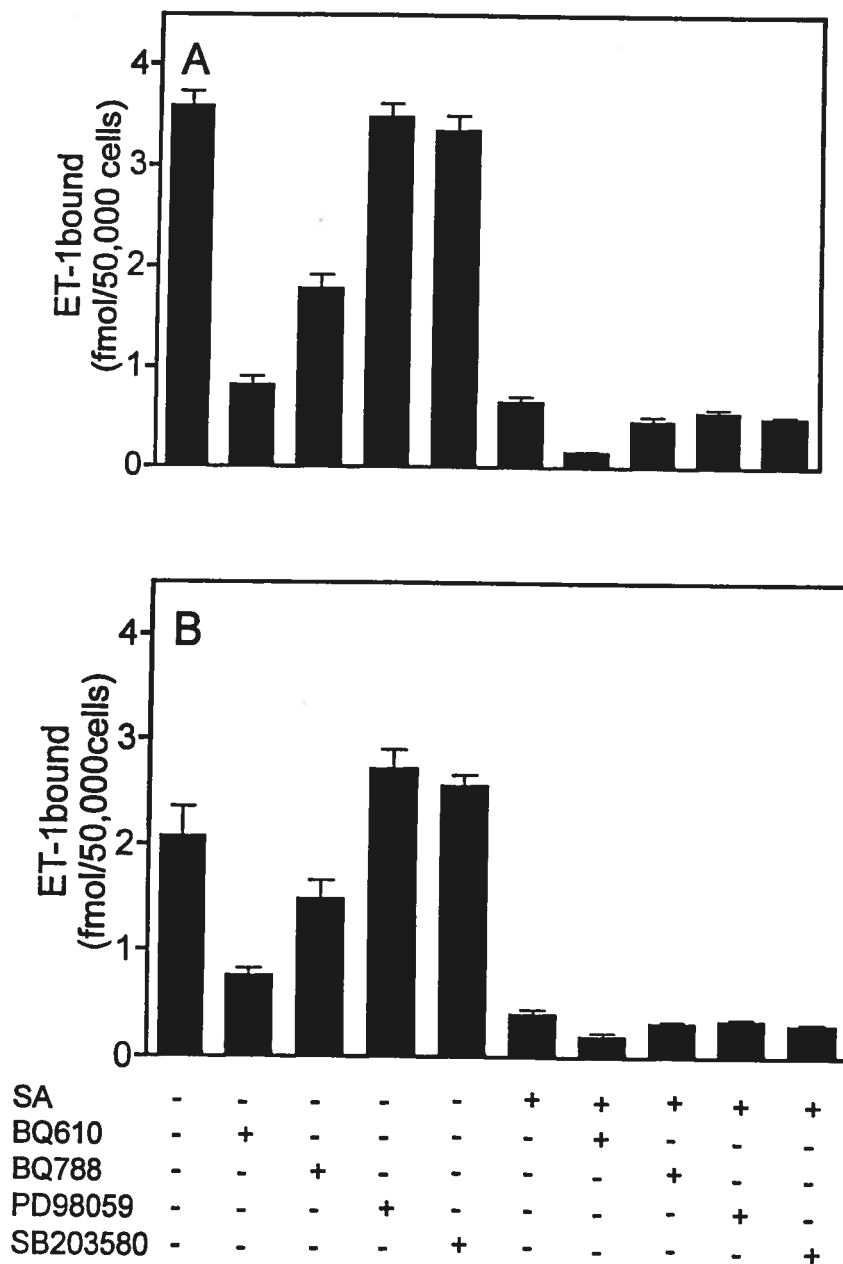
Farhat and Allen  
Figure 6



Farhat and Allen  
Figure 7



Farhat and Allen  
Figure 8



**CHAPITRE 3. DISCUSSION GÉNÉRALE**

## DISCUSSION

---

La liaison quasi-irréversible est une propriété unique et très spécifique aux récepteurs à l'ET-1 (Allen *et al.*, 2003; Blandin *et al.*, 2000; Waggoner *et al.*, 1992). La caractérisation du mode d'interaction ET-1/ETR peut être la clé pour accéder à la compréhension des rôles physiologiques et pathophysiologiques joués par cette protéine.

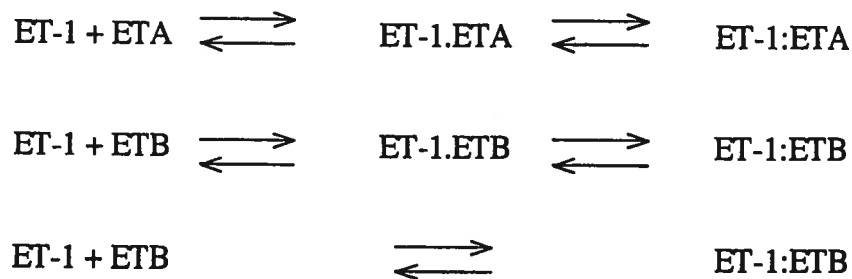
Tout d'abord et avant de commencer à tester notre hypothèse, il était important de savoir exactement quel(s) type(s) de récepteur à l'ET-1 se trouve(nt) sur les cardiomyocytes ventriculaires adultes?

L'ET-1 produit ses réponses via deux types de récepteurs, ETA et ETB. Le type B du récepteur se divise en deux sous types avec une légère variation dans la séquence primaire de la protéine: ETB1 et ETB2 (Arai *et al.*, 1990; Clozel *et al.*, 1992; Davenport *et al.*, 1993; Haynes *et al.*, 1995; Hirata *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1991; Sakurai *et al.*, 1990; Seo *et al.*, 1994; Spieker *et al.*, 2001; Sumner *et al.*, 1992). Notre étude précédente confirmait la présence des sous-types A et B sur les cardiomyocytes ventriculaires adultes (Allen *et al.*, 2003). En effet, les cardiomyocytes fraîchement isolés à partir des ventricules de cœur de rat adulte ont été utilisés dans cette étude, et il a pu être démontré que l'ET-1 lie son récepteur ( $K_d = 0.52 \pm 0.13$  nM) avec un  $B_{max}$  de  $2.10 \pm 0.25 \times 10^5$  sites par cellule. L'expérience de compétition de liaison en utilisant un antagoniste spécifique du récepteur de type A (BQ610) déplaçait la liaison d'[<sup>125</sup>I]ET-1 de plus de 80%, alors que l'antagoniste d'ETB (le BQ788), seul déplaçait la liaison d'environ 15%. Ceci suggère que l'ETA domine avec une portion d'environ quatre fois plus que celle de l'ETB (ETA:ETB, 80:20) sur les cardiomyocytes ventriculaires de cœur de rat adulte (Allen *et al.*, 2003). De plus, nous avons soulevé la possibilité d'avoir les deux sous-types du récepteur ETB (ETB1, ETB2) dans notre modèle cellulaire. Des études antérieures prouvent aussi la présence d'ETA et d'ETB sur les myocytes humains avec un ratio très similaire à celui trouvé chez le rat (85% ETA; 15% ETB, (Thibault *et al.*, 1995)). De plus, une étude précédente effectuée dans notre laboratoire prouve la présence de deux types de récepteurs sur la membrane nucléaire des cardiomyocytes dans une proportion 70-80% ETA vs 20-30% ETB (Boivin *et al.*, 2003).



L'irréversibilité de la liaison d'ET-1 sur son récepteur est connue depuis longtemps (Levin, 1995; Mayes, 2003; Ortega Mateo *et al.*, 1997), mais les conséquences de cette interaction ne sont pas totalement claires. Lewagger et ses collègues ont été les premiers à montrer que la dissociation du complexe ET-1/récepteur est très faible, avec une valeur de  $k_d$  dans l'ordre de pM. Pareillement, Hilal Dandan *et al.*, démontrent cette irréversibilité de liaison dans les cardiomyocytes néonatales (Allen *et al.*, 2003; Hilal-Dandan *et al.*, 1997) et Modesti et ses collaborateurs détectent ce type de liaison sur des fractions membranaires de cardiomyocytes humains (Allen *et al.*, 2003; Modesti *et al.*, 1999). D'autres études ont permis de démontrer que l'ET-1 forme un complexe très stable avec le récepteur ETB, même à basse température (4°C) et/ou en présence du SDS (Takasuka *et al.*, 1992a; Takasuka *et al.*, 1992b; Takasuka *et al.*, 1994). Sous ces conditions, le complexe ET-1/ETA est moins stable (Boscoe *et al.*, 2000; D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Goraca, 2002; Takasuka *et al.*, 1992a; Waggoner *et al.*, 1992).

La nature de la liaison ET-1/ETA semble variée avec l'espèce étudiée. En effet, une étude effectuée par Hilal Dandan et ses collaborateurs montre qu'au niveau des cardiomyocytes ventriculaires chez des rats néonataux n'exprimant que l'ETA, le traitement à l'acide ne libère qu'une petite fraction de l'ET-1 (Hilal-Dandan *et al.*, 1997). Ceci suggère qu'une différence dans le mécanisme d'interaction ET-1/ETR peut exister entre l'humain et le rat. Des plus, notre étude précédente supporte l'idée qu'un complexe intermédiaire réversible peut précéder la formation du complexe quasi-irréversible entre l'ET-1 et le sous-type A du récepteur. Ceci explique le fait qu'une fraction du complexe ET-1/ETA, et non pas la totalité est dissociée. Dans le cas de l'ETB, deux mécanismes sont possibles 1) l'état transitoire est très rapide ceci pourrait expliquer pourquoi nous ne pouvons le détecter, 2) le complexe réversible peut ne pas exister (figure 10)



**Figure 10** : Une représentation schématique des états intermédiaires menant à l'état irréversible du complexe ET-1/ETR. Dans le cas de la liaison sur l'ETA, deux complexes peuvent se former. Un complexe intermédiaire détectable menant à l'état final du complexe stable, alors que dans le cas d'ETB, ce complexe intermédiaire n'est pas détectable.

En plus de la forte affinité de l'ET-1, l'antagoniste lie les récepteurs par un mode d'oscillation (association/dissociation). Ceci renforce la possibilité d'avoir une étape transitoire réversible dans le cas des deux récepteurs. L'affinité de l'ET-1 envers ses récepteurs est surestimée dans la plupart des études de liaison, due à la rapidité de la liaison pouvant nécessiter moins d'une seconde (Blandin *et al.*, 2000; Desmarests *et al.*, 1996). Ceci rend l'action autocrine de l'ET-1 favorisée à courte distance par rapport à l'action paracrine. Une autre conséquence de la forte liaison d'ET-1 c'est que le niveau circulant ne représente pas la quantité réelle de l'ET-1 tissulaire (Ferrari *et al.*, 1998). Finalement, la quasi-irréversibilité de la liaison diminue aussi la possibilité de compétition entre l'ET-1 et ses antagonistes formant ainsi un obstacle dans le traitement pharmacologique de certaines pathologies.

Des évidences récentes nous ont amené à vouloir étudier la nature de la liaison ET-1/ETR plus précisément. Plusieurs RCPGs sont régulés par des ligands allostériques. Parmi les récepteurs les mieux étudiés, on cite les récepteurs D2-dopamine (Hoare *et al.*, 1996) et les récepteurs A<sub>1</sub> adénosine (Bruns *et al.*, 1990). Il a aussi récemment été démontré que l'aspirine et l'AS pouvaient être des inhibiteurs allostériques pour les récepteurs à l'ET-1 (avec un K<sub>i</sub> = 10 mM) (Blandin *et al.*, 2000; Talbodec *et al.*, 2000).

Ces études étaient effectuées avec des extractions membranaires isolées à partir des cellules de rat exprimant l'ETA ou l'ETB. En se basant sur cette propriété, nous avons étudié l'effet de l'acide salicylique sur la liaison de l'ET-1 aux deux types de récepteurs, dans les cardiomyocytes intacts fraîchement isolés du ventricule de cœur de rat adulte. Nos résultats ont montré que la liaison de l'ET-1 était déplacée par l'AS. Tout d'abord, nous avons commencé notre étude avec une faible concentration d'AS (5 mM) en se basant sur l'étude effectuée par le groupe de Talbodec (1999). Cette concentration était insuffisante pour compétitionner la forte affinité de l'ET-1 (fig. 1), à pH acide (puisque l'AS lui-même est un agent acide et que ceci n'est pas un effet de l'acidité du milieu) ou neutre. Par la suite, nous avons testé la spécificité de l'action d'AS sur chaque sous-type de récepteur, et ceci a été effectué en présence de BQ788 (un antagoniste spécifique au ETB) ou de BQ610 (un antagoniste spécifique au ETA). Les résultats obtenus ont démontré que 5 mM d'AS était capable de causer la dissociation d'une faible portion du complexe ETA/ET-1 (15 %), alors que cette concentration n'avait aucun effet sur la dissociation du complexe ETB/ET-1. De plus, nous avons testé l'effet d'une plus grande concentration d'AS sur la dissociation de la liaison du complexe ET-1/ETR. Nous avons trouvé qu'une concentration de 100 mM était nécessaire afin de produire une réduction significative de la liaison d'ET-1. Une étude similaire réalisée sur des fractions membranaires isolées à partir de fibroblastes montrait que l'IC<sub>50</sub> de l'AS était de l'ordre de 10 mM dans ce type cellulaire (Talbodec *et al.*, 2000). Cette variabilité des concentrations exigées pour avoir une réponse significative peut être simplement due à la différence des modèles utilisés. En d'autres termes, ceci peut être expliqué par la différence dans la sensibilité des systèmes utilisés (cellules vivantes versus membranes isolées) et par la différence d'accessibilité de l'AS aux récepteurs d'ET-1. De plus, ceci peut aussi être dû à une différence de stochiométrie entre les deux systèmes (lien entre récepteur/effecteur/protéine G).

Dans la littérature, plusieurs exemples révèlent la possibilité de déplacer la forte liaison d'ET-1 sur le récepteur. En effet, Wong *et al.*, montrent qu'une forte concentration des antagonistes aux récepteurs ETB (qui est la forme dominante sur leur modèle d'étude) déplace la liaison d'ET-1 de 80%. Cette dissociation diminue en fonction du temps (Wu-Wong *et al.*, 1994), supportant ainsi l'idée que la liaison des antagonistes est

plus réversible que celle de l'ET-1. De même, dans le cortex surrénalien chez l'humain, la sarafotoxine, déplace la liaison d'ET-1 de 70% et le BQ123, inhibe la liaison d'ET-1 de 30%. Il est à noter que sur le cortex surrénalien, le ratio ETB/ETA est de 4/1 (Nambi *et al.*, 1992). L'ABT-627 est un antagoniste spécifique au récepteur ETA avec une valeur de  $K_i$  de 0.034  $\mu$ M. L'ABT-627 est couramment utilisé comme médicament dans le traitement du cancer de la prostate. Dans un système hétérologue, l'ABT-627 peut renverser l'effet de l'ET-1 sur l'internalisation de son récepteur spécifique en déplaçant la liaison de l'ET-1 (Chiou *et al.*, 2000). De même, le déplacement de la liaison d'ET-1/récepteurs était aussi détecté dans les cellules Kupper (Stephenson *et al.*, 1995), dans les cellules granulosas au niveau de l'ovaire (Usuki *et al.*, 1998) et dans les cellules endothéliales du placenta chez l'humain (Kalina *et al.*, 1992). Toutes ces études, et beaucoup d'autres confirment la possibilité de dissocier la forte liaison de l'ET-1 de ses récepteurs avec une concentration élevée du compétiteur utilisé. Ceci appuie nos résultats qui suggèrent qu'une forte concentration d'AS (100 mM) augmente la dissociation de la liaison d'ET-1/récepteurs dans les cardiomyocytes ventriculaire de rat adulte.

Une stimulation prolongée de RCPG résulte souvent en l'internalisation des récepteurs pour réguler et limiter une réponse prolongée aux stimuli extracellulaires. Cependant l'internalisation ne rend pas toujours les RCPGs inactifs. Des études confirment que certains RCPGs sont capables de déclencher des réponses à l'intérieur des cellules. Ces réponses sont souvent médiées par les composantes de la machinerie d'endocytose telles que la  $\beta$ -arrestine et la dynamine (Bunemann *et al.*, 1999; Cyert, 2001; Di Fiore *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Ogimoto *et al.*, 2000; Tsao *et al.*, 2001). L'ETA et l'ETB subissent aussi une désensibilisation et l'internalisation suite à leur stimulation par l'agoniste (Chun *et al.*, 1995; Dupuis *et al.*, 1999; Freedman *et al.*, 1997). L'ETB internalisé suit la voie d'endocytose vers l'endosome et le lysosome pour être dégradé. Cependant, l'ETA internalisé est détecté dans le compartiment d'endocytose périnucléaire où il se libère de son ligand pour être ensuite recyclé vers la membrane plasmique. À la membrane plasmique, l'ETA recyclé peut lier un nouvel agoniste et prolonger la réponse (Allen *et al.*, 2003; Bremnes *et al.*, 2000). Ceci explique la différence des réponses produites suite à une simple injection d'ET-1. En effet, l'injection d'une simple dose d'ET-1 produit une réponse biphasique, une dilatation courte suivie

par une phase de contraction prolongée. La courte dilatation résulte de l'effet d'ET-1 sur ses récepteurs ETB endothéliaux, qui mènent à la libération d'agents vasodilatateurs (NO et la prostaglandine I<sub>2</sub>). Toutefois, l'internalisation et la dégradation du complexe ET-1/ETB font que cette phase est limitée (D'Orleans-Juste *et al.*, 2002; Dupuis *et al.*, 1999; Granger, 2003; Mawji *et al.*, 2003). L'action d'ET-1 sur ses récepteurs musculaires (où l'ETA est le sous-type dominant), qui sont recyclés en surface, rend la réponse contractile d'ETA efficace pour des heures (Mawji *et al.*, 2003). Les ETRs sont internalisés via les cages de clathrines, bien que l'ETA soit aussi détectés dans les caveolae (Allen *et al.*, 2003; Bremnes *et al.*, 2000). Dans notre étude, afin d'étudier la possibilité que l'action réduite d'AS soit causée par une perte de sensibilité des récepteurs, nous avons étudié l'effet de bloquer l'internalisation sur la réponse de l'AS. Nos résultats suggèrent que l'AS n'a aucun effet sur la liaison d'ET-1 sur ses récepteurs à 4°C (afin de bloquer le mécanisme d'internalisation des récepteurs), à 24°C (température ambiante) ou même à 37°C (température physiologique). Ceci supporte l'idée que le manque d'effet d'AS est bel et bien dû à sa faible capacité de déplacer la forte association ET-1/ETB à cette concentration, et que seule une concentration plus élevée (100 nM ou plus) peut produire un effet.

Dans les cardiomyocytes, l'ET-1 et les agonistes  $\alpha$ 1-adrénérgiques, tel que la phényléphrine, peuvent induire de l'hypertrophie (Cooper, 1997; Granger, 2003; Ito *et al.*, 1991; Mawji *et al.*, 2003; Sadoshima *et al.*, 1993a; Sadoshima *et al.*, 1993b; Shubeita *et al.*, 1990; Spieker *et al.*, 2001; Sugden *et al.*, 1998a). Ces agonistes peuvent provoquer des changements morphologiques et transcriptionnels caractéristiques à cette réponse. Il est aussi connu que les voies des MAPKs sont impliquées dans la régulation et la transmission de la réponse hypertrophique de l'ET-1. Parmi les trois voies des MAPKs, ERK est généralement impliquée dans la régulation de la réponse proliférative, alors que les voies JNK et p38 sont connues pour réguler les réponses au stress (Spieker *et al.*, 2001; Sugden *et al.*, 1998b). Dans les cardiomyocytes, les trois voies interviennent dans la régulation de la réponse hypertrophique (Force *et al.*, 2002; Granger, 2003; Hocher *et al.*, 1999; Spieker *et al.*, 2001; Sugden *et al.*, 1998a; Thibault *et al.*, 1995). Des études récentes montrent aussi un effet additif de ces voies dans le contrôle de la survie cellulaire. Dans les cardiomyocytes néonataux de ventricule de rat, l'ET-1 active les trois voies,

ERK, JNK et p38 MAPK. Bien que, la régulation de la cascade de signalisation dans les cardiomyocytes de rat adulte ne soit pas totalement comprise, une étude très récente, montre que l'ET-1 peut activer les voies ERK et p38 MAPK menant ainsi à l'activation de leur substrat, MSK-1 (Mitogen and Stress-activated protein Kinase-1) (Markou *et al.*, 2002). Toutes ces études et bien d'autres prouvent que l'ET-1 est capable de déclencher les voies de signalisation des MAPKs.

À ce jour, il n'y a pas beaucoup d'études qui s'adressent à la possibilité de déclencher la cascade des MAPKs par l'AS. L'AS produit une réponse anti-inflammatoire en activant la voie p38 MAPK, et en inhibant ainsi l'action du TNF- $\alpha$  via l'activation de NF- $\kappa$ B (Kupferwasser *et al.*, 2003; Schwenger *et al.*, 1998; Talbodec *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). L'AS mène aussi à l'activation de la voie p38 MAPK, et à la régulation négative de la signalisation de TNF- $\alpha$  (Kupferwasser *et al.*, 2003; Schwenger *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). De plus, dans les fibroblastes cardiaques, l'AS inhibe la phosphorylation sur le(s) résidu(s) tyrosine(s) de(s) l'activateur(s) de transcription STAT1 et STAT3. Cette inhibition a comme conséquence de prévenir la translocation nucléaire, et la liaison sur l'ADN, des STATs1/3 (Wang *et al.*, 2002). La réponse de l'AS sur les STATs peut aussi être causée par la voie ERK MAPK. Cependant, le mécanisme en est encore mal défini (Wang *et al.*, 2002). De plus, quelques études s'intéressent au rôle de l'AS chez les plantes. Une de ces études montre que l'AS active une protéine kinase de 48 kD (Zhang *et al.*, 1997). Cette protéine est membre de la cascade des MAPKs chez la plante. De plus, Lebrun-Garcia et ses collaborateurs ont montré que l'AS était capable d'activer deux protéines kinases qui semblaient être impliquées dans les voies MAPK chez les plantes. Ce sont les protéines kinases SIPK (Salicylic acid-Induced Protein Kinase) et WIPK (Wound-Induced Protein Kinase) (Lebrun-Garcia *et al.*, 2002). Toutes ces études appuient l'hypothèse que l'AS peut activer les voies des MAPKs.

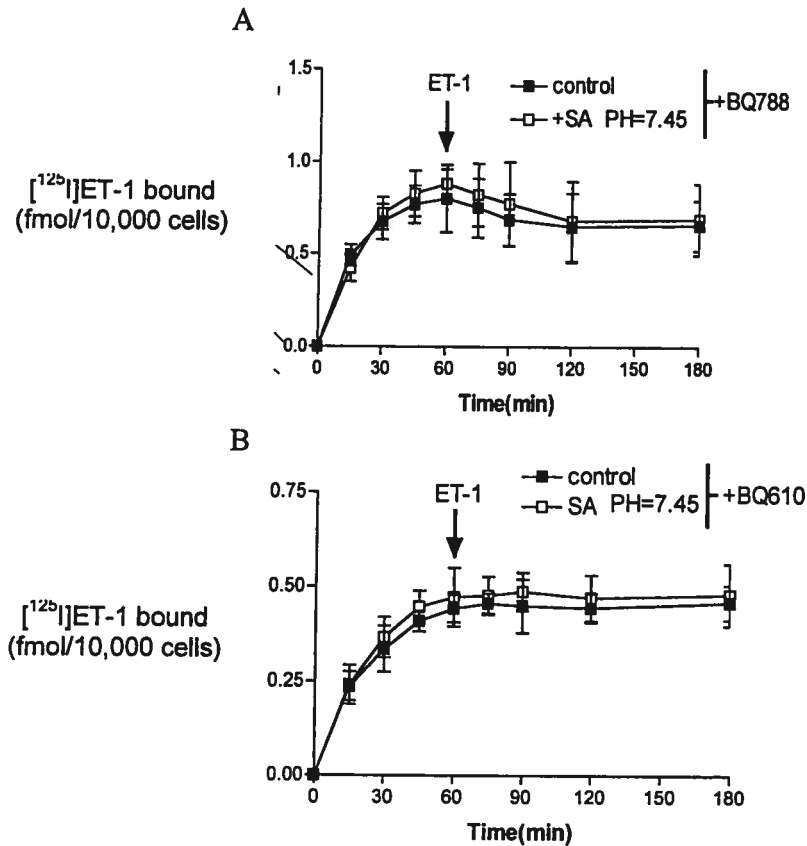
Dans cette présente étude, un autre but était de vérifier l'effet de la dissociation récepteur/ligand sur la signalisation de l'ET-1. Nous avons obtenu des résultats qui suggèrent que l'AS (10  $\mu$ M – 10 mM) n'inhibe pas l'activation de la voie ERK MAPK par l'ET-1. Ceci était prévisible puisque l'AS ne produit pas la dissociation du complexe ET-1/ETR à cette concentration. Toutefois, à une forte concentration d'AS (100 mM),

l'activation de ERK est plus élevée que celle produite par l'ET-1 seule. Il est intéressant de noter qu'il semble y avoir un lien direct entre la dissociation du complexe récepteur/ligand et l'activation d'ERK, puisque les deux phénomènes se produisent à la même concentration de 100 mM d'AS. Nous avons donc voulu vérifier si l'activation de ERK était dépendante, ou non, de la dissociation du complexe récepteur/ligand. Pour ce faire, nous avons étudié la liaison de l'ET-1 en présence des différents inhibiteurs des voies MAPK. En effet, ni la présence de PD 98059 (l'inhibiteur de MEK), ni de SB 203580 (l'inhibiteur de p38 MAPK), ne montrent un effet sur le déplacement de liaison d'ET-1 par l'AS. Ceci suggère que la dissociation du complexe ET-1/ETR produite par la présence d'AS ne nécessite pas la protéine ERK comme médiateur dans la réaction. Il est à noter que dans la figure 5.A, nous remarquons l'apparition d'une protéine d'environ 40 kDa suite à l'incubation avec d'AS (100 mM). Cette nouvelle bande n'apparaît pas dans le cas où les cardiomyocytes sont stimulés avec l'ET-1 ou lorsque la voie p38 MAPKs est inhibée par le SB 203580. Ceci nous suggère plusieurs questions: 1) Est-ce que cette protéine est une forme modifiée de la protéine ERK ou 2) Est-ce la phosphorylation d'une nouvelle protéine avec un motif TEY qui n'est pas une cible en réponse à l'ET-1. Ces questions, sont présentement étudiées au laboratoire comme suite à la présente étude.

En conclusion, nos résultats obtenus en utilisant les cardiomyocytes de ventricule de rat adulte fraîchement isolés, suggèrent que: (1) l'AS, à une concentration de 5 mM n'affecte pas la liaison d'ET-1; (2) ceci est causé par une incapacité à déplacer la forte association du complexe ET-1/ETR, et n'est pas causé par l'internalisation ou la désensibilisation des récepteurs; (3) le déplacement de la liaison ET-1/ETR (nécessite une concentration d'AS, d'environ 100 mM) des cardiomyocytes et sur des fractions membranaires; (4) à 100 mM, l'AS mène à l'activation de la voie ERK MAPK; (5) l'inhibition de la voie ERK l'effet de l'AS sur la stabilité du complexe ET-1/ETR; (6) à 100 mM, l'AS induit la phosphorylation d'une nouvelle protéine possédant le motif TEY.

**ANNEXE DES FIGURES**





**Figure 11** : Salicylic acid displayed no receptor subtype-specific effects. Myocytes were incubated with  $[^{125}\text{I}]\text{ET-1}$  (40 pM) plus 1  $\mu\text{M}$  BQ788 (A, antagonist of ETB) or BQ610 (B, antagonist of ETA), in Buffer D, in the absence (solid) or presence (open) of 5 mM SA. After 60 min, non-radioactive ET-1 (0.1  $\mu\text{M}$ ) was added. Data shown are means ( $\pm\text{SE}$ ) of 5 independent experiments using separate cell isolations. Each experiment was performed in quadruplicate.

## RÉFÉRENCES

---

- ABRAHAM, D.J., VANCHEESWARAN, R., DASHWOOD, M.R., RAJKUMAR, V.S., PANTELIDES, P., XU, S.W., DU BOIS, R.M. & BLACK, C.M. (1997). Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol*, **151**, 831-41.
- ALBERTS, B. (1995). Biologie moléculaire de la cellule. 3è éd. *Méd-Sci Flam*.
- ALLEN, B.G., PHUONG, L.L., FARHAT, H. & CHEVALIER, D. (2003). Both endothelin-A and endothelin-B receptors are present on adult rat cardiac ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol*, **81**, 95-104.
- AMANN, R. & PESKAR, B.A. (2002). Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol*, **447**, 1-9.
- ANDOH, A., SHIMADA, M., BAMBA, S., OKUNO, T., ARAKI, Y., FUJYAMA, Y. & BAMBA, T. (2002). Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 participate in interleukin-17 plus tumor necrosis factor-alpha-induced stabilization of interleukin-6 mRNA in human pancreatic myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, **1591**, 69-74.
- ARAI, H., HORI, S., ARAMORI, I., OHKUBO, H. & NAKANISHI, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**, 730-732.
- BARKER, S., LEES, D.M., WOOD, E.G. & CORDER, R. (2002). Inhibitory effect of adrenomedullin on basal and tumour necrosis factor alpha-stimulated endothelin-1 synthesis in bovine aortic endothelial cells is independent of cyclic AMP. *Biochem Pharmacol*, **63**, 149-156.
- BARRON, A.J., FINN, S.G. & FULLER, S.J. (2003). Chronic activation of extracellular-signal-regulated protein kinases by phenylephrine is required to elicit a hypertrophic response in cardiac myocytes. *Biochem J*, **371**, 71-79.
- BERGMAN, R.A., AFIFI, A.K. & HEIDGER, P.M. (1996). Histology. *W B Saund (Philadelphia)*.
- BLANDIN, V., VIGNE, P., BREITMAYER, J.P. & FRELIN, C. (2000). Allosteric inhibition of endothelin ETRA receptors by 3,5-dibromosalicylic acid. *Mol Pharmacol*, **58**, 1461-1469.

- BOGOYEVITCH, M.A., GILLESPIE-BROWN, J., KETTERMAN, A.J., FULLER, S.J., BEN-LEVY, R., ASHWORTH, A., MARSHALL, C.J. & SUGDEN, P.H. (1996). Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res*, **79**, 162–173.
- BOGOYEVITCH, M.A., GLENNON, P.E., ANDERSSON, M.B., CLERK, A., LAZOU, A., MARSHALL, C.J., PARKER, P.J. & SUGDEN, P.H. (1994). Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, **269**, 1110–1119.
- BOGOYEVITCH, M.A., GLENNON, P.E. & SUGDEN, P.H. (1993). Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett*, **317**, 271–275.
- BOGOYEVITCH, M.A., KETTERMAN, A.J. & SUGDEN, P.H. (1995). Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem*, **270**, 29710–29717.
- BOIVIN, B., CHEVALIER, D., VILLENEUVE, L.R., ROUSSEAU, E. & ALLEN, B.G. (2003). Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem*, **278**, 29153–29163.
- BOSCOE, M.J., GOODWIN, A.T., AMRANI, M. & YACOB, M.H. (2000). Endothelins and the lung. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 41–62.
- BREMNES, T., PAASCHE, J.D., MEHLUM, A., SANDBERG, C., BREMNES, B. & ATTRAMANDAL, H. (2000). Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem*, **275**, 17596–17604.
- BRUNNER, F. & DOHERTY, A.M. (1996). Role of ET(B) receptors in local clearance of endothelin-1 in rat heart: studies with the antagonists PD155080 and BQ-788. *FEBS Lett*, **396**, 238–242.
- BRUNS, R.F. & FERGUS, J.H. (1990). Allosteric enhancement of adenosine A1 receptor binding and function by 2-amino-3-benzoylthiophenes. *Mol Pharmacol*, **38**, 939–949.

- BUENO, O.F., J., D.W.L., TYMITZ, K.M., WITT, S.A., KIMBALL, T.R., KLEVITSKY, R., HEWETT, T.E., JONES, S.P., LEFER, D.J., PENG, C.F., KITSIS, R.N. & MOLKENTIN, J.D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*, **19**, 6341-6350.
- BUNEMANN, M. & HOSEY, M.M. (1999). G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol*, **517**, 5-23.
- CARDILLO, C., KILCOYNE, C.M., WACLAWIW, M., CANNON, R.O. & PANZA, J.A. (1999). Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension*, **33**, 753-8.
- CHEVALIER, D., THORIN, E. & ALLEN, B.G. (2000). Simultaneous measurement of ERK, p38, and JNK MAP kinase cascades in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **44**, 429-439.
- CHILOECHES, A., PATERSON, H.F., MARAIS, R., CLERK, A., MARSHALL, C.J. & SUGDEN, P.H. (1999). Regulation of Ras.GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J Biol Chem*, **274**, 19762-19770.
- CHIOU, W.J., WESSALE, J.L., VON GELDERN, T., OPGENORTH, T.J. & WU-WONG, J.R. (2000). 'Irreversible' endothelin-1 binding does not prohibit ABT-627 from reversing endothelin-1-induced effects. *J Cardiovasc Pharmacol*, **36**, S48-S52.
- CHUN, M., LIN, H.Y., HENIS, Y.I. & LODISH, H.F. (1995). Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *J Biol Chem*, **270**, 10855-10860.
- CLAING, A., LAPORTE, S.A., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors : roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol*, **66**, 61-79.
- CLERK, A., MICHAEL, A. & SUGDEN, P.H. (1998a). Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J*, **333**, 581-589.
- CLERK, A., MICHAEL, A. & SUGDEN, P.H. (1998b). Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G

- protein-coupled receptor agonists endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol*, **142**, 523–535.
- CLERK, A., PHAM, F.H., FULLER, S.J., SAHAI, E., AKTORIES, K., MARAIS, R., MARSHALL, C.J. & SUGDEN, P.H. (2001). Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. *Mol Cell Biol*, **21**, 1173–1184.
- CLERK, A. & SUGDEN, P.H. (1999). Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *Am J Cardiol*, **83**, 64H–69H.
- CLERK, A. & SUGDEN, P.H. (1997). Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-Jun transcription factors in rat ventricular myocytes. *Biochem J*, **325**, 801–810.
- CLOZEL, M., GRAY, G.A., BREU, V., LOFFLER, B.M. & OSTERWALDER, R. (1992). The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 867–873.
- COOPER, G. (1997). Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Annu Rev Med*, **48**, 13–23.
- CRAMER, H., SCHMENGER, K., HEINRICH, K., HORSTMAYER, A., BONING, H., BREIT, A., PIIPER, A., LUNDSTROM, K., MULLER-ESTEREL, W. & SCHROEDER, C. (2001). Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G( $\alpha$ )q. *Eur J Biochem*, **268**, 5449–5459.
- CROSS, P.C. & MERCER, K.L. (1995). Ultrastructure cellulaire et tissulaire, Approche fonctionnelle. *De Boeck U Bruxel*.
- CYERT, M.S. (2001). Regulation of nuclear localisation during signaling. *J Biol Chem*, **276**, 20805–20808.
- D'ORLEANS-JUSTE, P., LABONTE, J., BKAILY, G., CHOUFANI, S., PLANTE, M. & HONORE, J.C. (2002). Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther*, **95**, 221–238.
- D'USCIO, L.V., BARTON, M., SHAW, S. & LUSCHER, T.F. (2000). Endothelin in atherosclerosis: importance of risk factors and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol*, **35**, S55–S59.
- DADOUNE, J.P. (1990). Histologie. *Méd-Sci Flam Paris*.
- DALE, L.B., BHATTACHARYA, M., SEACHRIST, J.L., ANBORGH, P.H. & FREGUSON, S.S. (2001). Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate

receptor 1a in human embryonic kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is beta-arrestin1 isoform-specific. *Mol Pharmacol*, **60**, 1243-1253.

DAVENPOT, A.P., O'REILLY, G., MOLENAAR, P., MAGUIRE, J.J., KUC, R.E., SHARKEY, A., BACON, C.R. & FERRO, A. (1993). Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridization, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ETB receptors in human vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*, **22**, 22-25.

DESMARETS, J., GRESSER, O., GUEDIN, D. & FRELIN, C. (1996). Interaction of endothelin-1 with cloned bovine ETA receptors: biochemical parameters and functional consequences. *Biochemistry*, **35**, 14868-14875.

DI FIORE, P.P. & GILL, G.N. (1999). Endocytosis and mitogenic signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 483-488.

DUPUIS, J., SCHWAB, A.J., SIMARD, A., CERNACEK, P., STEWART, D.J. & GORESKY, C.A. (1999). Kinetics of endothelin-1 binding in the dog liver microcirculation in vivo. *Am J Physiol*, **277**, G905-G914.

EISELE, G., SCHWEDHELM, E., SCHIEFFER, B., TSIKAS, D. & BOGER, R.H. (2004). Acetylsalicylic acid inhibits monocyte adhesion to endothelial cells by an antioxidative mechanism. *Cardiovasc Pharmacol*, **43**, 514-521.

ELSHOURBAGY, N.A., LEE, J.A., KORMAN, D.R., NUTHALAGANTI, P., SYLVESTER, D.R., DILELLA, A.G., SUTIPHONG, J.A. & KUMAR, C.S. (1992). Molecular cloning and characterization of the major endothelin receptor subtype in porcine cerebellum. *Mol Pharmacol*, **41**, 465-473.

ETO, M., BARANDIER, C., RATHGEB, L., KOZAI, T., JOCH, H., YANG, Z. & LUSCHER, T.F. (2001). Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ Res*, **89**, 583-590.

FAWCETT, D.W. (1994). A textbook of Histology. 12th ed. *Chapm & Hal*.

FERRARI, E., TALBODEC, A., VIGNE, P. & FRELIN, C. (1998). Evidence for receptor bound endothelin in renal but not in cardiac tissues from normal rats. *Cardiovasc Res*, **38**, 140-148.

- FILEP, J.G., HERMAN F, BATTISTINI, B., CHABRIER, P.E., BRAQUET, P. & SIROIS, P. (1991). Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin. *J Cardiovasc Pharmacol*, **17**, S216-8.
- FORCE, T., HAQ, S., KILTER, H. & MICHEAL, A. (2002). Apoptosis signal-regulating kinase/nuclear factor-kappaB: a novel signaling pathway regulates cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation*, **105**, 402-404.
- FREEDMAN, N.J., AMENT, A.S., OPPERMANN, M., STOFFEL, R.H., EXUM, S.T. & LEFKOWITZ, R.J. (1997). Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*, **272**, 17734-17743.
- GARTNER, L.P. & HIATT, J.L. (1997). Color textbook of Histology., **W B Saunder (Philadelphia)**.
- GORACA, A. (2002). New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul*, **36**, 161-167.
- GRANGER, J.P. (2003). Endothelin. *Am J Physiol*, **285**, R298-R301.
- GRANTCHAROVA, E., FURKERT, J., REUSCH, H.P., KRELL, H.W., PAPSDORF, G., BEYERMANN, M., SCHULEIN, R., ROSENTHAL, W. & OKSCHE, A. (2002). The extracellular N terminus of the endothelin B (ETB) receptors is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process. *J Biol Chem*, **277**, 43933-43941.
- GRATTON, J.P., COURNOYER, G., LOFFLER, B.M., SIROIS, P. & D'ORLEANS-JUSTE, P. (1997). ET(B) receptor and nitric oxide synthase blockade induce BQ-123-sensitive pressor effects in the rabbit. *Hypertension*, **30**, 1204-1209.
- HALL, R.A. & LEFKOWITZ, R.J. (2002). Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res*, **91**, 672-680.
- HAYNES, W.G., STRACHAN, F.E. & WEBB, D.J. (1995). Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation*, **92**, 357-363.
- HAYNES, W.G. & WEBB, D.J. (1993). The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin Sci (Lond)*, **84**, 485-500.
- HILAL-DANDAN, R., RAMIREZ, M.T., VILLEGAS, S., GONZALEZ, A., ENDO-MOCHIZUKI, Y., BROWN, J.H. & L.L., B. (1997). Endothelin ETA receptor regulates signaling

- and ANF gene expression via multiple G protein-linked pathways. *Am J Physiol*, **272**, H130-H137.
- HIRATA, Y., EMORI, T., EGUCHI, S., KANNO, K., IMAI, T., OHTA, K. & MARUMO, F. (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*, **91**, 1367-1373.
- HIRATA, Y., TAKAGI, Y., FUKUDA, Y. & MARUMO, F. (1989). Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **78**, 225-228.
- HOARE, S.R. & STRANGE, P.G. (1996). Regulation of D2 dopamine receptors by amiloride and amiloride analogs. *Mol Pharmacol*, **50**, 1295-1308.
- HOCHER, B., GEOEGE, I., REBSTOCK, J., BAUCH, A., SCHWARTZ, A., NEUMAYER, H.H. & BAUER, C. (1999). Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension*, **33**, 816-822.
- HORSTMAYER, A., CRAMER, H., SAUER, T., MULLER-ESTERL, W. & SCHROEDER, C. (1996). Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J Biol Chem*, **271**, 20811-20819.
- HOSODA, K., NAKAO, K., HIROSHI-ARAI, SUGA, S., OGAWA Y, MUKOYAMA, M., SHIRAKAMI, G., SAITO, Y., NAKANISHI, S. & IMURA, H. (1991). Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*, **287**, 23-26.
- HUNLEY, T.E. & KON, V. (2001). Update on endothelins-biology and clinical implications. *Pediatr Nephrol*, **16**, 752-762.
- IGLARZ, M. & SCHIFFRIN, E.L. (2003). Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr Hypertens Rep*, **5**, 144-148.
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K. & MASAKI, T. (1989a). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 2863-2867.
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., TAKUWA, Y., MITSUI, Y., KOBAYASHI, M. & MASAKI, T. (1989b). The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem*, **264**, 14954-14959.
- ITO, H., HIRATA, Y., ADACHI, S., TANAKA, M., TSUJINO, M., KOIKE, A., NOGAMI, A., MARUMO, F. & HIROE, M. (1993). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in



the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*, **92**, 398–403.

ITO, H., HIRATA, Y., HIROE, M., TSUJINO, M., ADACHI, S., TAKAMOTO, T., NITTA, M., TANIGUCHI, K. & MARUMO, F. (1991). Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*, **69**, 209-215.

JIJON, H.B., PANENKA, W.J., MADSEN, K.L. & PARSONS, H.G. (2002). MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol*, **283**, C31-C41.

JOHNSON, G.L. & LAPADAT, R. (2002). Mitogen-activated Protein Kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, **298**, 1911-1912.

KAKOKI, M., HIRATA, Y., HAYAKAWA, H., TOJO, A., NAGATA, D., SUZUKI, E., KIMURA, K., GOTO, A., KIKUCHI, K., NAGANO, T. & OMATA, M. (1999). Effects of hypertension, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia on endothelin type B receptor-mediated nitric oxide release from rat kidney. *Circulation*, **99**, 1242–1248.

KALINA, B. & LOFFLER, B.M. (1992). Crosslinking analysis of an endothelin receptor protein from human placenta. *Biochem Int*, **27**, 735-744.

KIEMER, A.K., KULHANEK-HEINZE, S., GERWIG, T., GERBES, A.L. & VOLLMAR, A.M. (2002). Stimulation of p38 MAPK by hormonal preconditioning with atrial natriuretic peptide. *World J Gastroenterol*, **8**, 707-711.

KOBAYASHI, T., MIYAUCHI, T., SAKAI, S., KOBAYASHI, M., YAMAGUCHI, I., GOTO, K. & SUGISHITA, Y. (1999). Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. *Am J Physiol*, **276**, H1197–H1206.

KOMOIKE, Y., TAKEEDA, M., TANAKA, A., KATO, S. & TAKEUCHI, K. (2002). Prevention by parenteral aspirin of indomethacin-induced gastric lesions in rats: mediation by salicylic acid. *Dig Dis Sci*, **47**, 1538-1545.

KOSHIMIZU, T., TSUJIMOTO, G., ONO, K., MASAKI, T. & SAKAMOTO, A. (1995). Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs membrane signaling but not ligand binding of human ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **217**, 354– 362.

- KRUM, H., DENVER, R., TZANIDIS, A. & MARTIN, P. (2001). Diagnostic and therapeutic potential of the endothelin system in patients with chronic heart failure. *Heart Fail Rev*, **6**, 341-352.
- KUBO, T., IBUSUKI, T., CHIBA, S., KAMBE, T. & FUKUMORI, R. (2001). Mitogen-activated protein kinase activity regulation role of angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **411**, 27-34.
- KUPFERWASSER, L.I., YEAMAN, M.R., NAST, C.C., KUPFERWASSER, D., XIONG, Y.Q., PALMA, M., CHEUNG, A.L. & BAYER, A.S. (2003). Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in staphylococcus aureus. *J Clin Invest*, **112**, 222-233.
- KYRIAKIS, J.M. & AVRUCH, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, **81**, 807-869.
- LEBRUN-GARCIA, A., CHILTZ, A., GOUT, E., BLIGNY, R. & PUGIN, A. (2002). Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogin in tobacco cells. *Planta*, **214**, 792-797.
- LEE, J.A., ELLIOTT, J.D., SUTIPHONG, J.A., FRIESEN, W.J., OHLSTEIN, E.H., STADEL, J.M., GLEASON, J.G. & PEISHOFF, C.E. (1994). Tyr-129 is important to the peptide ligand affinity and selectivity of human endothelin type A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 7164-7168.
- LEONHARDT, A., BERNERT, S., WATZER, B., SCHMITZ-ZIEGLER, G. & SEYBERTH, H.W. (2003). Low-dose aspirin in pregnancy: maternal and neonatal aspirin concentrations and neonatal prostanoid formation. *Pediatrics*, **111**, 77-81.
- LEVIN, E.R. (1995). Endothelins. *N Engl J Med*, **333**, 356-363.
- LI, J.G., LUO, L.Y., KRUPNICK, J.G., BENOVIC, J.L. & LIU-CHEN, L.Y. (1999). U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, **274**, 12087-12094.
- LIN, H.Y., KAJI, E.H., WINKEL, G.K., IVES, H.E. & LODISH, H.F. (1991). Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 3185-3189.

- LOVE, M.P., HAYNES, W.G., GRAY, G.A., WEBB, D.J. & J., M.J. (1996). Vasodilator effects of endothelin-converting enzyme inhibition and endothelin ETA receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors. *Circulation*, **94**, 2131–2137.
- LOWES, V.L., IP, N.Y. & WONG, Y.H. (2002). Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals*, **11**, 5–19.
- LUTTRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, **115**, 455–465.
- MARKOU, T. & LAZOU, A. (2002). Phosphorylation and activation of mitogen and stress-activated protein kinase-1 in adult cardiac myocytes by G-protein coupled receptor agonists requires both extracellular-signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J*, **356**, 757–763.
- MASAKI, T. (1998). The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res*, **39**, 530–533.
- MASAKI, T., VANE, J.R. & VANHOUTTE, P.M. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol Rev*, **46**, 137–142.
- MAWJI, I.A. & MARSDEN, P.A. (2003). Perturbations in paracrine control of the circulation : role of the endothelial-derived vasomediators, endothelin-1 and nitric oxide. *Microsc Res Tech*, **60**, 46–58.
- MAYES, M.D. (2003). Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum*, **48**, 1190–1199.
- MCADAM, B., KEIMOWITZ, R.M., MAHER, M. & FITZGERALD, D.J. (1996). Transdermal modification of platelet function: an aspirin patch system results in marked suppression of platelet cyclooxygenase. *J Pharmacol Exp Ther*, **277**, 559–564.
- MCCULLOCH, K.M., DOCHERTY, C.C., MORECROFT, I. & MACLEAN, M.R. (1996). EndothelinB receptor-mediated contraction in human pulmonary resistance arteries. *Br J Pharmacol*, **119**, 1125–1130.
- MICHEL, M.C., LI, Y. & HEUSCH, G. (2001). Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **363**, 245–266.

- MODESTI, P.A., VANNI, S., PANICCIA, R., PERRNA, A., MACCHERINI, M., LISI, G., SANI, G. & NERI SERNERI, G.G. (1999). Endothelin receptor in adult human and swine isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol*, **58**, 369-374.
- MOLENAAR, P., O'REILLY, G., SHARKEY, A., KUC, R.E., HARDING, D.P., PLUMPTON, C., GRESHAM, G.A. & DAVENPORT, A.P. (1993). Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res*, **72**, 526-538.
- MURAKAMI-MORI, K., MORI, S. & NAKAMURA, S. (1999). p38 MAP kinase is a negative regulator for ERK1/2-mediated growth of AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 676-682.
- NAKAMUTA, M., TAKAYANAGI, R., SAKAI, Y., SAKAMOTO, S., HAGIWARA, H., MIZUNO, T., SAITO, Y., HIROSE, S., YAMAMOTO, M. & NAWATA, H. (1991). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **177**, 34-39.
- NAMBI, P., PULLEN, M., WU, H.L., AIYAR, N., OHLSTEIN, E.H. & EDWARDS, R.M. (1992). Identification of endothelin receptor subtypes in human renal cortex and medulla using subtype-selective ligands. *Endocrinology*, **131**, 1081-1086.
- NEYLON, C.B., AVDONIN, P.V., DILLEY, R.J., LARSEN, M.A., TKACHUK, V.A. & BOBIK, A. (1994). *Different electrical responses to vasoactive agonists in morphologically distinct smooth muscle cell types.*: *Circ Res*.
- NICOL, R.L., FREY, N., PEARSON, G., COBB, M., RICHARDSON, J. & OLSON, E.N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J*, **20**, 2757-2767.
- OAKLEY, R.H., LAPORTE, S.A., HOLT, J.A., CARON, M.G. & BARAK, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, **275**, 17201-17210.
- OGAWA, Y., NAKAO, K., ARAI, H., O., N., HOSODA, K., SUGA, S., NAKANISHI, S. & IMURA, H. (1991). Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **178**, 248-255.
- OGIMOTO, G., YUDOWSKI, G.A., BARKER, C.J., KOHLER, M., KATZ, A.I., FERAILLE, E., PEDEMONTE, C.H., BERGGREN, P.O. & BERTORELLO, A.M. (2000). G protein-coupled receptors regulate Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and endocytosis by

- ROSE, P.M., KRISTEK, S.R.J., PATEL, P.S., LIU, E.C., LYNCH, J.S., LACH, D.A., FISHER, S.M. & WEBB, M.L. (1995). Aspartate mutation distinguishes ETA but not ETB receptor subtype-selective ligand binding while abolishing phospholipase C activation in both receptors. *FEBS Lett*, **361**, 243–249.
- RUBANYI, G.M. & POLOKOFF, M.A. (1994). Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, **46**, 325-415.
- RUSSELL, F.D. & DAVENPORT, A.P. (1999). Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol*, **126**, 391-398.
- SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. (1993a). Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*, **73**, 413-423.
- SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. (1993b). Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-driven second messengers. *Circ Res*, **73**, 424-438.
- SAITO, T., RODGER, I.W., HU, F., ROBINSON, R., HUYNH, T. & GIAID, A. (2004). Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, **37**, 71-77.
- SAITO, Y., MIZUNO, T., ITAKURA, M., SUZUKI, Y., ITO, T., HAGIWARA, H. & HIROSE, S. (1991). Primary structure of bovine endothelin ETB receptor and identification of signal peptidase and metal proteinase cleavage sites. *J Biol Chem*, **266**, 23433-23437.
- SAKAMOTO, A., YANAGISAWA, M., SAWAMURA, T., ENOKI, T., OHTANI, T., SAKURAI, T., NAKAO, K., TOYO-OKA, T. & MASAKI, T. (1993). Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists. *J Biol Chem*, **268**, 8547-8553.
- SAKURAI, T., YANAGISAWA, M., TAKUWA, Y., MIYAZAKI, H., KIMURA, S., GOTO, K. & MASAKI, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**, 732-735.
- SATO, K., ROMAN, D.M. & MCMURTRY, I.F. (1999). Hypoxia inhibits increased ETB receptor-mediated NO synthesis in hypertensive rat lungs. *Am J Physiol*, **276**, L571-L581.

- modulating the recruitment of adaptor protein 2 and clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 3242-3247.
- OHKITA, M., TAKAOKA, M., SHIOTA, Y., NOJIRI, R. & MATSUMURA, Y. (2002). Nitric oxide inhibits endothelin-1 production through the suppression of nuclear factor kappa B. *Clin Sci*, **103**, 68S-71S.
- OKADA, M. & NISHIKIBE, M. (2002). BQ-788, a selective endothelin ET(B) receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev*, **20**, 53-66.
- OKAMOTO, Y., NINOMIYA, H., TANIOKA, M., SAKAMOTO, A., MIWA, S. & MASAKI, T. (1997). Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J Biol Chem*, **272**, 21589-21596.
- OLDROYD, S.D. & MORCOS, S.K. (2000). Endothelin : what does the radiologist need to know ?. *Br J Radiol*, **73**, 1246-1251.
- ORTEGA MATEO, A. & DE ARTINANO, A.A. (1997). Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res*, **36**, 339-51.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B.E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways : regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22**, 153-183.
- PETERS, S.L., SAND, C., MICHEL, M.C., PFAFFENDORF, M. & VAN ZWIETEN, P.A. (2002). A mitogen-activated protein kinase is involved in the inotropic but not chronotropic actions of adrenoceptor agonists and endothelin-1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **366**, 189-191.
- PONICKE, K., VOGELANG, M., HEINROTH, M., BECKER, K., ZOLK, O., BOHM, M., ZERKOWSKI, H.R. & BRODDE, O.E. (1998). Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation*, **97**, 744-751.
- RAVENHALL, C., GUIDA, E., HARRIS, T., KOUTSOUBOS, V. & STEWART, A. (2000). The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol*, **131**, 17-28.
- REINHART, G.A., PREUSSER, L.C., BURKE, S.E., WESSALE, J.L., WEGNER, C.D., OPGENORTH, T.J. & COX, B.F. (2002). Hypertension induced by blockade of ET(B) receptors in conscious nonhuman primates: role of ET(A) receptors. *Am J Physiol*, **283**, H1555-H1561.

- SCHIFFRIN, E.L. (2000). Endothelin : Role in experimental hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, **35**, S33-S35.
- SCHIFFRIN, E.L. & TOUYZ, R.M. (1998). Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol*, **32**, S2-S13.
- SCHWENGER, P., ALPERT, D., SKOLNIK, E.Y. & VILCEK, J. (1998). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and degradation. *Mol Cell Biol*, **18**, 78-84.
- SEO, B., OEMAR, B.S., SIEBENMANN, R., VON SEGESSER, L. & LUSCHER, T.F. (1994). Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation*, **89**, 1203-1208.
- SHAH, B.H. & CATT, K.J. (2003). A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 239-244.
- SHAPIRO, P.S., EVANS, J.N., DAVIS, R.J. & POSADA, J.A. (1996). The seven-transmembrane-spanning receptors for endothelin and thrombin cause proliferation of airway smooth muscle cells and activation of the extracellular regulated kinase and c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase groups of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **271**, 5750-5754.
- SHICHIRI, M., YOKOKURA, M., MARUMO, F. & 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.
- SHUBEITA, H.E., MCDONOUGH, P.M., HARRIS, A.N., KNOWLTON, K.U., GLEMBOTSKI, C.C., BROWN, J.H. & CHIEN, K.R. (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*, **265**, 20555-20562.
- SIMONSON, M.S., OSANAI, T. & DUNN, M.J. (1990). Endothelin isopeptides evoke Ca<sup>2+</sup> signaling and oscillations of cytosolic free [Ca<sup>2+</sup>] in human mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1055**, 63-68.
- SOKOLOVSKY, M. (1992). Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmacol Ther*, **54**, 129-149.

- SPIEKER, L.E., NOLL, G., RUSCHITZKA, F.T. & LUSCHER, T.F. (2001). Endothelin receptor antagonists in congestive heart failure: a new therapeutic principle for the future? *J Am Coll Cardiol*, **37**, 1493-1505.
- SPINELLA, F., ROSANO, L., DI CASTRO, V., NATALI, P.G. & BAGNATO, A. (2002). Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, **277**, 27850-27855.
- STEPHEN, S.G., FERGUSON, BARAK, L.S., ZHANG, J. & CARON, M.G. (1996). G-coupled receptor regulation : role of G-coupled receptor kinases and arrestins. *Can.J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 1095-1110.
- STEPHENSON, K., HARVEY, S.A., MUSTAFA, S.B., EAKES, A.T. & OLSON, M.S. (1995). Endothelin association with the cultured rat Kupffer cell : Characterization and regulation. *Hepatology*, **22** (3), 896-905.
- SUGDEN, P.H. & CLERK, A. (1998a). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*, **76**, 725-746.
- SUGDEN, P.H. & CLERK, A. (1998b). "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*, **83**, 345-352.
- SUMNER, M.J., CANNON, T.R., MUNDIN, J.W., WHITE, D.G. & WATTS, I.S. (1992). Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle cell contraction. *Br J Pharmacol*, **107**, 858-860.
- TAKASUKA, T., ADACHI, M., MIYAMOTO, C., FURUICHI, Y. & WATANABE, T. (1992a). Characterization of endothelin receptor ETA and ETB expressed in COS cells. *J Biochem (Tokyo)*, **112**, 396-400.
- TAKASUKA, T., AKIYAMA, N., HORII, I., FURUICHI, Y. & WATANABE, T. (1992b). Different stability of ligand-receptor complex formed with two endothelin receptor species, ETA and ETB. *J Biochem (Tokyo)*, **111**, 748-753.
- TAKASUKA, T., SAKURAI, T., GOTO, K., FURUICHI, Y. & WATANABE, T. (1994). Human endothelin receptor ETB. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand. *J Biol Chem*, **269**, 7509-7513.



- TAKAYANAGI, R., OHNAKA, K., TAKASAKI, C., OHASHI, M. & NAWATA, H. (1991). Multiple subtypes of endothelin receptors in porcine tissues: characterization by ligand binding, affinity labeling and regional distribution. *Regul Pept*, **32**, 23-37.
- TALBODEC, A., BERKANE, N., BLANDIN, V., BREITMAYER, J.P., FERRARI, E., FRELIN, C. & VIGNE, P. (2000). Aspirine and sodium salicylate inhibit endothelin ETA receptors by an allosteric type of mechanism. *Mol Pharmacol*, **57**, 797-804.
- TANAKA, H., MOROI, K., IWAI, J., TAKAHASHI, H., OHNUMA, N., HORI, S., TAKIMOTO, M., NISHIYAMA, M., MASAKI, T., YANAGISAWA, M., SEKIYA, S. & KIMURA, S. (1998). Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization. *J Biol Chem*, **273**, 11378-11383.
- TEDER, P. & NOBLE, P.W. (2000). A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **23**, 7-10.
- THIBAUT, G., ARGUIN, C. & GARCIA, R. (1995). Cardiac endothelin-1 content and receptor subtype in spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol*, **27**, 2327-2336.
- THORIN, E., CERNACEK, P. & DUPUIS, J. (1998). Endothelin-1 regulates tone of isolated small arteries in the rat: effect of hyperendothelinemia. *Hypertension*, **31**, 1035-1041.
- TSAO, P., CAO, T. & VON ZASTROW, M. (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 91-96.
- USUKI, S., KOBAYASHI, S., SUGIMOTO, M., KOTANI, E., OTANI, S., KUBO, T., ISHII, T., MURAKAI, K. & MIYAZAKI, H. (1998). Effects of follicle-stimulating hormone on endothelin receptors in cultured rat ovarian granulosa cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **31**, S225-S229.
- WAGGONER, W.G., GENOVA, S.L. & RASH, V.A. (1992). Kinetic analyses demonstrate that the equilibrium assumption does not apply to [125I]endothelin-1 binding data. *Life Sci*, **51**, 1869-1876.
- WAGNER, O.F., CHRIST, G., WOJTA, J., VIERHAPPER, H., PARZER, S., NOWOTNY, P.J., SCHNEIDER, B., WALDHAUSL, W. & BINDER, B.R. (1992). Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, **267**, 16066-16068.

- WANECEK, M., WEIZBERG, E., RUDEHILL, A. & OLDNER, A. (2000). The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Euro J Pharmacol*, **407**, 1-15.
- WANG, Z., JIANG, B. & BRECHER, P. (2002). Selective inhibition of STAT3 phosphorylation by sodium salicylate in cardiac fibroblasts. *Biochem Pharmacol*, **63**, 1197-1207.
- WILSON, S.H., SIMARI, R.D. & LERMAN, A. (2001). The effect of endothelin-1 on nuclear factor kappa B in macrophages. *Biochem Biophys Res Comm*, **286**, 968-972.
- WU-WONG, J.R., CHIOU, W.J., NAUGLES, K.E.J. & OPGENORTH, T.J. (1994). Endothelin receptor antagonists exhibit diminishing potency following incubation with agonist. *Life Sci*, **54**, 1727-1734.
- XIAO, Y.Q., SOMEYA, K., MORITA, H., TAKAHASHI, K. & OHUCHI, K. (1999). Involvement of p38 and ERK/MAPK pathways in staurosporine-induced production of macrophage inflammatory protein-2 in rat peritoneal neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, **1450**, 155-163.
- YAMAZAKI, T., KOMURO, I., KUDOH, S., ZOU, Y., SHIOJIMA, I., HIROI, Y., MIZUNO, T., MAEMURA, K., KURIHARA, H., AIKAWA, R., TAKANO, H. & YAZAKI, Y. (1996). Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, **271**, 3221-3228.
- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. & MASAKI, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-5.
- YOKOYAMA, Y., BAVEJA, R., SONIN, N., NAKANISHI, K., ZHANG, J.X. & CLEMENS, M.G. (2000). Altered endothelin receptor subtype expression in hepatic injury after ischemia/reperfusion. *Shock*, **13**, 72-8.
- YU, Y., ZENG, H., LYONS, S., CARLSON, A., MERLIN, D., NEISH, A.S. & GEWIRTZ, A.T. (2003). TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol*, **285**, G282-G290.
- ZHANG, S. & KLESSIG, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP Kinase in tobacco. *Plant Cell*, **9**, 809-824.