

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE *IN VITRO* ET
IN VIVO DU NOUVEAU MÉTABOLITE DE LA
BIG ENDOTHÉLINE-1 : L'ENDOTHÉLINE-1(1-31)**

Par

MIRCO PLANTE

Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M.Sc.)

Décembre 2002

L'imagination est plus importante
que les connaissances.

Albert Einstein

La vie a plus d'imagination
que n'en porte nos rêves

Ridley Scott

S'il n'existait qu'une seule vérité,
on ne pourrait peindre des centaines
de tableaux sur un même sujet

Pablo Picasso

Aux Algolagniens...

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES PUBLICATIONS.....	vii
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
1.1 LE SYSTÈME ENDOTHÉLINERGIQUE.....	1
1.1.1 Structure et voie de biosynthèse de l'endothéline.....	3
1.1.2 Enzymes de conversion de l'endothéline (ECE).....	7
1.1.2.1 L'ECE-1.....	7
1.1.2.2 Autres ECEs (ECE-2, ECE-3, ECEL1).....	13
1.1.2.3 Inhibiteurs de l'ECE.....	14
1.1.3 L'endopeptidase neutre 24.11 (NEP).....	15
1.1.3.1 Caractéristiques biochimiques de la NEP.....	16
1.1.3.2 Inhibiteurs de la NEP.....	16
1.1.4 ET-1(1-31): Un nouveau métabolite biologiquement actif de la big ET-1.....	18
1.1.5 Récepteurs de l'endothéline (ET _A & ET _B).....	23
1.1.5.1 Médiateurs de l'endothéline.....	24
1.1.5.2 Antagonistes des récepteurs ET _A & ET _B	28
1.1.6 Effets pharmacologiques.....	29
1.1.6.1 ET-1.....	29

1.1.6.2 ET-1(1-31).....	36
1.2 BUT DE LA PRÉSENTE ÉTUDE.....	39
MATÉRIEL & MÉTHODES.....	43
2.1 <i>IN VITRO</i> : PERFUSION DE POUMON ISOLÉ DE COBAYE.....	43
2.1.1 Animaux utilisés.....	43
2.1.2 Chirurgie et perfusion de poumon.....	43
2.1.3 Protocole expérimental.....	45
2.1.4 Dosage de TxB ₂ et de 6-céto-PGF _{1α} : Essai radioimmunologique (R.I.A.).....	45
2.2 <i>IN VIVO</i> : LE LAPIN.....	47
2.2.1 Animaux utilisés.....	47
2.2.2 Chirurgie.....	47
2.2.3 Protocole expérimental.....	48
2.2.4 Extraction plasmatique des endothélines.....	49
2.2.5 Dosage de l'ET-1(1-31) : Essais immunologique ELISA (E.I.A.)..	50
2.2.6 Dosage de l'ET-1: R.I.A.....	52
2.3 CALCULS ET ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES.....	55
2.4 COMPOSÉS UTILISÉS.....	55
2.5 ÉHIQUE.....	58
RÉSULTATS.....	59
3.1 EFFET DE L'ET-1(1-31) ET DE L'ET-1 SUR LA LIBÉRATION D'EICOSANOÏDES DANS LE POUMON DE COBAYE ISOLÉ ET PERFUSÉ DE COBAYE.....	59

3.1.1 Effet des antagonistes BQ-788 et BQ-123 sur la libération d'eicosanoïdes induite par l'ET-1(1-31) et l'ET-1 dans le poumon perfusé et isolé de cobaye.....	61
3.1.2 Effet d'un inhibiteur enzymatique, le thiorphan, sur la libération d'eicosanoïdes induite par l'ET-1(1-31) et la big ET-1 dans le poumon de cobaye isolé et perfusé.....	61
3.2 RÉPONSE HÉMODYNAMIQUE DE L'ET-1, LA BIG ET-1 ET DE L'ET- 1(1-31) CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ.....	65
3.2.1 Effet des antagonistes BQ-123 et BQ-788 sur la réponse hémodynamique de la big ET-1, l'ET-1(1-31) et l'ET-1 chez le lapin anesthésié.....	67
3.2.2 Effet des inhibiteurs (phosphoramidon, CGS 35066 et thiorphan) sur la réponse hémodynamique de la big ET-1, l'ET-1(1-31) et l'ET-1 chez le lapin anesthésié.....	70
3.3 EFFET DE L'INJECTION INTRA CARDIAQUE D'ET-1(1-31) SUR LA CONCENTRATION PLASMATIQUE D'ET-1(1-31) ET D'ET-1 CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ.....	73
DISCUSSION.....	76
4.1 IMPLICATION DU RÉCEPTEUR ET _B ET DE L'ENDOPEPTIDASE NEUTRE 24.11 DANS LA LIBÉRATION D'EICOSANOÏDES INDUITE PAR L'ET-1(1-31) DANS LE POUMON DE COBAYE ISOLÉ ET PERFUSÉ.....	76

4.2 IMPLICATION DES RÉCEPTEURS ET _A ET ET _B AINSI QUE DES ENZYMES NEP 24.11 ET ECE DANS LES RÉPONSES HÉMODYNAMIQUES DE L'ET-1(1-31) CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ.....	78
4.3 PERSPECTIVES.....	82
CONCLUSIONS.....	83
REMERCIEMENTS.....	85
BIBLIOGRAPHIE.....	86

LISTE DES PUBLICATIONS

- D'ORLÉANS-JUSTE, P., PLANTE, M., HONORÉ, J.C., CARRIER, E., LABONTÉ, J.
(2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (sous presse)
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., LABONTÉ, J., BKAILY, G., CHOUFFANI, S., PLANTE, M., J.C. HONORÉ (2002) Roles of the ET_B receptor for endothelins in the physiology and pathophysiology. *Pharmacology & Therapeutics* **95(3)**:221
- PLANTE, M., HONORÉ, J.C., NEUGEBAUER, W., D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2002) Endothelin-1 (1-31) induces a thiorphan-sensitive release of eicosanoids via ET_B receptors in the guinea pig perfused lung. *Clinical Science* **103 (suppl.48)** : 128S-131S
- HONORE, J.C., PLANTE, M., BKAILY, G., RAE, G.A., D'ORLEANS-JUSTE, P.
(2002) Pressor and pulmonary responses to ET-1(1-31) in guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology* **136 (6)**: 819-28
- CLAING, A., SHBAKLO, H., PLANTE, M., BKAILY, G., D'ORLÉANS-JUSTE, P.
(2002) Comparison of the contractile and calcium-increasing properties of platelet-activating factor and endothelin-1 in the rat mesenteric artery and vein. *British Journal of Pharmacology* **135(2)** : 433-443

D'ORLÉANS-JUSTE, P., LABONTÉ, J., DUVAL, M., PLANTE, M., COURNOYER,
G., BKAILY, G., BERTHIAUME, N. (2001) Chapter 11 : Endothelins and the Release
of Autacoids; Handbook of Experimental Pharmacology; Volume 152; Ed. T.D.
Warner; Springer-Verlag, Berlin.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Comparaison des séquences en acides aminés des différentes isoformes de l'endothéline (ET-1, ET-2, ET-3) et de la sarafotoxine S6c (STX-6C).....	4
Figure 2	Schéma de la voie de biosynthèse de l'endothéline-1.....	6
Figure 3	Représentation schématique du dimère ECE-1.....	10
Figure 4	Alignement des séquences d'acides aminés en N-terminal des isoformes de l'ECE-1 humaine.....	11
Figure 5	Alignement des séquences d'acides aminés en C-terminal de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1), l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP) et de la thermolysine (TLN).....	17
Figure 6	Modèle de liaison du thiorphan et du phosphoramidon à l'endopeptidase neutre 24.11.....	19
Figure 7	Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'endothéline-1(1-31).....	21
Figure 8	Représentation schématique de l'action vasculaire de l'endothéline-1 et de ses médiateurs sur les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires.....	26
Figure 9	Illustration du montage utilisé lors de l'étude impliquant la perfusion de poumon.....	44
Figure 10	Courbe déplacement de l'ET-1(1-31) dans le kit RIA RPA 555.....	53
Figure 11	Profile de libération de TxB ₂ et 6-céto-PGF _{1α} induite par l'ET-1 et l'ET-1(1-31) dans le poumon isolé et perfusé du cobaye.....	60

Figure 12	Effet du BQ-123 et du BQ-788 sur la libération de TxB_2 et de 6-céto-PGF $_{1\alpha}$ induite par l'ET-1 dans le poumon isolé et perfusé du cobaye.....	62
Figure 13	Effet du BQ-123 et du BQ-788 sur la libération de TxB_2 et PGF $_{1\alpha}$ induite par l'ET-1(1-31) et l'ET-1 dans le poumon isolé et perfusé du cobaye.....	63
Figure 14	Effet du thiorphan sur la libération de TxB_2 et PGF $_{1\alpha}$ induite par l'ET-1(1-31) et la big ET-1 dans le poumon isolé et perfusé de cobaye	64
Figure 15	Cinétique de l'effet presseur de l'ET-1(1-31), la big ET-1 et l'ET-1 chez lapin anesthésié.....	66
Figure 16	Courbes doses-réponses des augmentations maximales des effets presseurs provoqués par l'ET-1(1-31) et la big ET-1 chez le lapin anesthésié.....	68
Figure 17	Effet des antagonistes BQ-123 et BQ-788 sur l'effet presseur provoqué par la l'ET-1(1-31) et la big ET-1 chez le lapin anesthésié.....	69
Figure 18	Effet des antagonistes BQ-123 et BQ-788 sur l'effet presseur provoqué par la l'ET-1 chez le lapin anesthésié.....	71
Figure 19	Effet des inhibiteurs phosphoramidon, CGS 35066 et thiorphan sur l'effet presseur provoqué par l'ET-1(1-31), la big ET-1 et l'ET-1 chez le lapin anesthésié.....	72
Figure 20	Effet de l'injection intracardiaque d'ET-1(1-31) sur la concentration plasmatique d'ET-1(1-31) et d'ET-1 immunoréactif chez le lapin anesthésié.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Caractéristiques des divers isoformes de l'ECE.....	8
Tableau II	Effets non cardiovasculaires de l'endothéline-1.....	31
Tableau III	Effets cardiovasculaires de l'endothéline-1.....	32
Tableau IV	Système endothélinergique cardiovasculaire et pulmonaire chez le cobaye.....	33
Tableau V	Système endothélinergique cardiovasculaire et pulmonaire chez le lapin.....	34
Tableau VI	Effets généraux de l'endothéline-1(1-31).....	37
Tableau VII	Liste des composés pharmacologiques ou chimiques utilisés.....	56
Tableau VIII	Liste des composés peptidiques utilisés	57

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

COX : Cyclooxygénase

ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline

EDCF : Facteur contracteur dérivé de l'endothélium

EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium

ET : Endothéline

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

K_m : Constante de Michaelis-Menten

MEP : Métalloendopeptidase

NEP : Néprilysine ou Endopeptidase neutre 24.11

NO : Oxyde Nitrique

NOS : Oxyde Nitrique synthase

PAM : Pression artérielle moyenne

PGI₂ : Prostacycline

6-céto-PGF_{1α} : Produit stable de dégradation non-enzymatique de la prostacycline

PIP : Pression d'insufflation pulmonaire

PR : Phosphoramidon

RIA : Essai radio-immunologique

STX-S6 : Sarafatoxine S6

TR : Thiorphan

Tx : Thromboxane

CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DU NOUVEAU MÉTABOLITE DE LA BIG ENDOTHÉLINE-1 : L'ENDOTHÉLINE-1(1-31)

Mirco Plante

Mémoire présentée à la Faculté de médecine en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

RÉSUMÉ

Les résultats présentés dans cette étude, dans le modèle du poumon de cobaye isolé et perfusé *in vitro*, et dans le modèle animal du lapin anesthésié *in vivo*, portent sur les effets pharmacologiques d'un nouveau peptide de la famille des endothélines (ET) : l'ET-1(1-31).

Premièrement, nous avons démontré que l'infusion d'ET-1(1-31), comme dans le cas de l'ET-1, provoquait la libération d'eicosanoïdes (TxA₂ et PGI₂) dans le poumon de cobaye isolé et perfusé. Cette libération est significativement réduite par un antagoniste des récepteurs ET_B, le BQ-788. Par contre, un antagoniste des récepteurs ET_A, le BQ-123, n'a aucun effet sur cette libération, confirmant ainsi le rôle du récepteur ET_B dans la libération d'eicosanoïdes. D'autre part, l'utilisation d'un inhibiteur de la NEP, le thiorphan, abolit la libération des eicosanoïdes induite par ce nouveau peptide. Ces résultats suggèrent que l'ET-1(1-31) nécessite une métabolisation en un peptide actif pour induire la libération d'eicosanoïdes via le récepteur ET_B.

Deuxièmement, nous avons observé que l'injection intracardiaque d'ET-1(1-31) chez le lapin anesthésié provoquait une vasoconstriction monophasique similaire à celle de la big ET-1. L'utilisation des antagonistes BQ-123 et BQ-788 nous ont permis de constater que l'ET-1(1-31) agissait sur les deux récepteurs de l'ET pour induire ses effets hémodynamiques. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur non sélectif (phosphoramidon) et sélectif de l'ECE et de la NEP (le CGS 35066 et le thiorphan respectivement) nous ont démontré que l'ET-1(1-31) nécessitait un clivage principalement par la NEP et de façon moins importante par l'ECE pour induire ses effets hémodynamiques.

Finalement, nous avons étudié, à l'aide de dosages plasmatiques d'ET-1(1-31) et d'ET-1, le métabolisme de l'ET-1(1-31) lorsqu'il est injecté de façons intracardiaque chez le lapin anesthésié. Nous avons démontré que l'ET-1(1-31) est métabolisé en ET-1 *in vivo* chez le lapin anesthésié.

Cette étude présente une caractérisation pharmacologique de ce nouveau peptide et permet de mieux comprendre son mécanisme d'action. Des études ultérieures permettront de mieux comprendre l'implication de l'ET-1(1-31) au niveau pathophysiologique.

INTRODUCTION

1.1 LE SYSTÈME ENDOTHÉLINÉRIQUE

À la fin des années 70 et au début des années 80, des recherches démontrèrent que les cellules endothéliales synthétisent et libèrent des substances vasodilatatrices telles que la prostacycline (PGI₂) et l'EDRF (facteur relaxant dérivé de l'endothélium, identifié plus tard comme étant l'oxyde nitrique (NO)) (MONCADA *et al.*, 1976; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; PALMER *et al.*, 1987). Des substances vasoconstrictrices telles que l'EDCF (facteur contracteur dérivé de l'endothélium) ont aussi été isolées (DE MEY & VANHOUTTE, 1982; RUBANYI & VANHOUTTE, 1986).

En 1988, l'équipe du professeur Masaki isola, purifia, séquença et clona l'EDCF qu'ils nommèrent : Endothéline (ET) (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Ce nouveau peptide de 21 acides aminés, qui fût isolé à partir du surnageant de culture de cellules endothéliales d'aorte thoracique porcine, n'avait aucune similarité de séquence avec les autres peptides d'origine mammifère connus. Cependant, quelques mois après cette découverte, il fût rapporté que la séquence en acides aminés de la sarafotoxine 6C (STX-6C), un peptide isolé du venin de serpent *Atractaspis engaddensis*, était remarquablement similaire à celle de l'ET (Anonymous, 1988; TAKASAKI *et al.*, 1988; KLOOG & SOKOLOVSKY, 1988; MILLS *et al.*, 1991).

En 1989, la présence d'ET a été détectée dans du plasma humain, indiquant que l'ET pouvait être une hormone vasoconstrictrice circulante (ANDO *et al.*, 1989). Par la suite, une analyse des séquences du génome humain révéla l'existence de trois gènes

distincts de l'ET, qui codent pour trois isoformes nommées : ET-1, ET-2 et ET-3 (INOUE *et al.*, 1989).

Diverses études ont permis, entre autre, de définir le système endothélinergique. Ce dernier est généralement reconnu pour être constitué de deux récepteurs couplés aux protéines G (les récepteurs ET_A et ET_B), de trois ligands peptidiques précédemment cités (ET-1, ET-2, ET-3) ainsi que de deux peptidases d'activation (l'endopeptidase de type furine (LAPORTE *et al.*, 1993) et l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (YANAGISAWA *et al.*, 1988)). L'ET-1 est l'isoforme la plus importante tant au niveau de son expression, sa principale source de production étant l'endothélium vasculaire, qu'au niveau de ses effets biologiques. De plus, ce peptide s'avère être la substance vasoconstrictrice et hypertensive la plus puissante étudiée à ce jour (à noter que l'urotensine II, un nouveau peptide récemment découvert, semble aussi puissant que l'ET-1; AMES *et al.*, 1999). Ces diverses raisons justifient l'intérêt porté pour l'ET-1 dans le domaine de la pharmacologie cardiovasculaire. Ainsi, des études sur l'ET-1 amèneront une meilleure compréhension des processus pathophysiologiques pouvant impliquer ce peptide et permettront le développement de nouveau médicament.

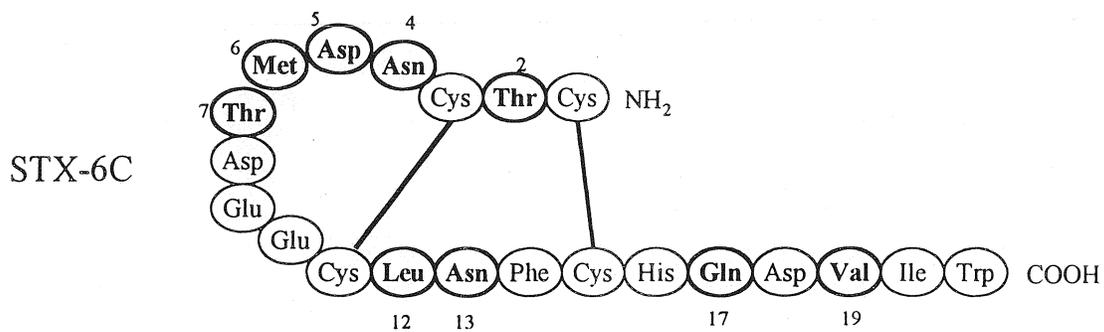
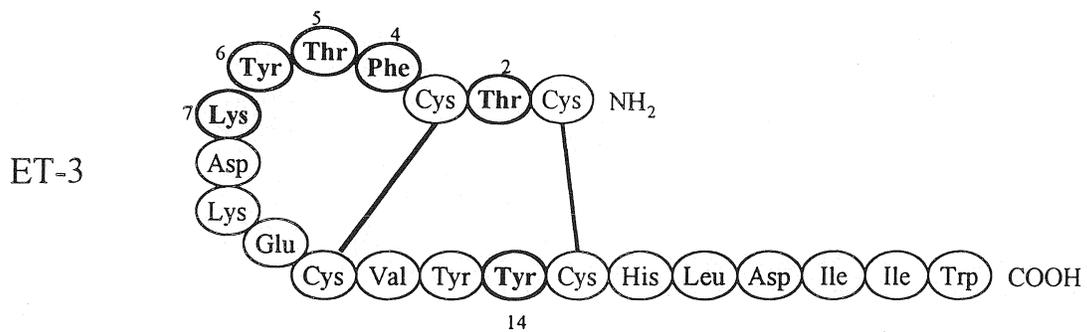
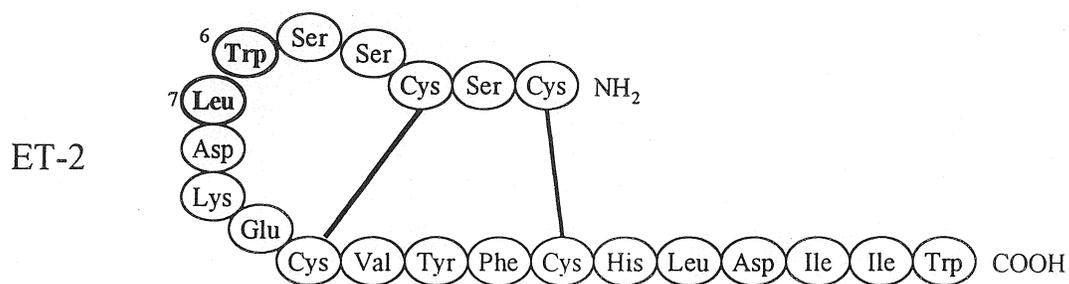
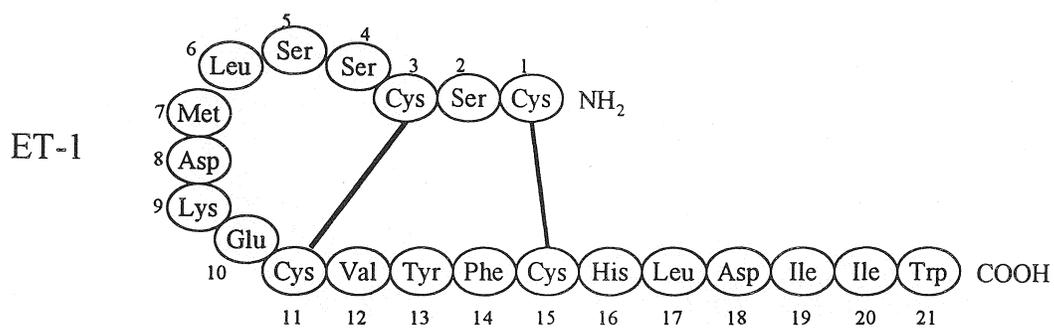
1.1.1 Structure et voie de biosynthèse de l'endothéline

L'ET-1 est un peptide de 21 acides aminés ayant un poids moléculaire de 2492 Da. et constitué d'une extrémité C-terminale hydrophobe et deux ponts disulfures situés du côté N-terminal (YANAGISAWA *et al.*, 1988) (**Figure 1**). Le domaine C-terminal contient le site de liaison pour son récepteur tandis que le domaine N-terminal détermine l'affinité de cette liaison (HASHIDO *et al.*, 1992; FORGET *et al.*, 1996; ROVERO *et al.*, 1990; ROVERO *et al.*, 1998; MIASIRO *et al.*, 1993). Il est à noter que les ponts disulfures sont essentiels pour la liaison à haute affinité des endothélines aux récepteurs ET_A mais qu'ils sont moins importants pour la liaison avec les récepteurs ET_B (HUNT *et al.*, 1993; SAEKI *et al.*, 1991).

Les deux autres isoformes de l'ET, l'ET-2 et l'ET-3, diffèrent respectivement de 2 et 6 acides aminés par rapport à l'ET-1 (INOUE *et al.*, 1989) (**Figure 1**). Une étude a révélé que le tryptophane en position 21 ainsi que le pont disulfure Cys¹-Cys¹⁵ de l'ET sont nécessaires pour son action au niveau des récepteurs ETs (FILEP *et al.*, 1992). De plus, les acides aminés Lys⁹ et Tyr¹³ pourraient jouer un rôle important dans l'activité vasoconstrictrice de ces peptides (KITAZYMI *et al.*, 1990). Les acides aminés Trp²¹, Lys⁹ et Tyr¹³ sont conservés dans les trois isoformes de l'ET, démontrant ainsi leur importance au sein de ce peptide.

Chaque isomère de l'ET provient d'un gène distinct et possède donc un précurseur distinct. Ainsi, le précurseur de l'ET-1 humaine, la préproET-1, fût clonée et séquencée en 1988, révélant un peptide de 212 acides aminés (ITOH *et al.*, 1988; YANAGISAWA *et al.*, 1988). Cependant, les précurseurs synthétisés sont clivés successivement par deux protéases différentes, une endopeptidase de type furine et l'ECE, pour libérer les formes

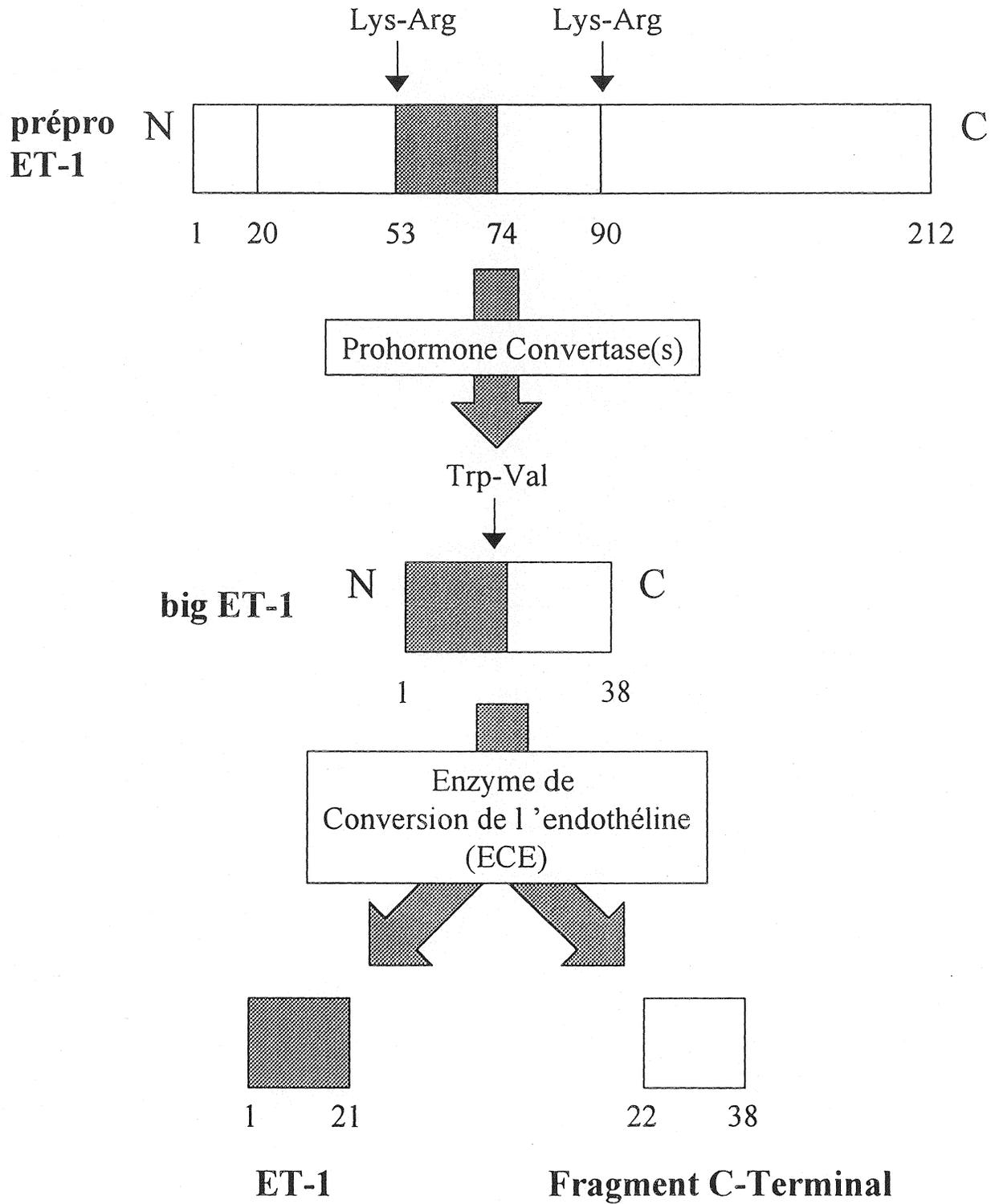
Figure 1 Comparaison des séquences en acides aminés des différentes isoformes de l'endothéline (ET-1, ET-2, ET-3) et de la sarafotoxine S6c (STX-6C) (Nussdorfer et al., 1999).



actives matures de 21 acides aminés. Chez l'homme cette maturation s'exécute en trois étapes (exemple pour l'isoforme ET-1) (**Figure 2**). Premièrement, la prépro ET-1 (212 a.a.) est clivée aux sites Arg⁵²-Cys⁵³ et Arg⁹²-Ala⁹³ par des endopeptidases de type furine (furine et PC7) de la voie de sécrétion constitutive (LAPORTE et al., 1993; Blais *et al.*, 2002). Par la suite, des carboxypeptidases enlèvent séquentiellement les deux derniers acides aminés en C-terminal de ce peptide (Arg⁹² puis Lys⁹¹) afin de générer la big ET-1 (38 a.a.). Finalement, l'ECE clive spécifiquement la big ET-1 entre les résidus 73 et 74 (Trp⁷³-Val⁷⁴ pour la big ET-1 et la big ET-2 et Trp⁷³-Ile⁷⁴ pour la big ET-3) afin de libérer l'ET-1 (21 a.a.) active ainsi qu'un fragment C-terminal (YANAGISAWA *et al.*, 1988) qui ne possède aucune propriété vasoactive (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1991a). Ce processus de maturation est similaire pour les autres isoformes d'endothélines (ET-2, ET-3).

Tout comme l'ET-1, la big-ET-1 possède une action vasoconstrictrice mais cependant, celle-ci est beaucoup moins importante (140 fois moins) que celle observée avec l'ET-1 (KASHIWABARA *et al.*, 1989; KIMURA *et al.*, 1989; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1991b). Il a été démontré que cet effet vasoconstricteur de la big ET-1 est médié via sa conversion en ET-1 par l'ECE (FUKURODA *et al.*, 1990; McMAHON *et al.*, 1991). La préproET-1 n'a pour sa part aucune activité vasoconstrictrice intrinsèque (CADE *et al.*, 1990).

Figure 2 Schéma de la voie de biosynthèse de l'endothéline-1 (Turner & Murphy, 1996)



1.1.2 Les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE)

L'existence d'une enzyme de conversion de l'ET (ECE) avait été prédite par YANAGISAWA *et al.* (1988). Au début de l'année 1990, deux études réalisées *in vitro* ont proposé la pepsine et la chymotrypsin comme enzyme permettant le clivage de la big ET-1 porcine afin d'obtenir de l'ET-1 mature (TAKAOKA *et al.*, 1990a, TAKAOKA *et al.*, 1990b). En 1993, OHNAKA *et al.* (1993) réussissent à purifier et à caractériser une ECE à partir de l'endothélium aortique de porc. Toutefois l'identité de la véritable ECE n'a été finalement révélée (purification, clonage et expression cellulaire) que par les équipes de Xu *et al.* (1994) et Shimada *et al.* (1994).

L'ECE est une métalloendopeptidase (MEP) zinc dépendante. L'analyse de la structure primaire de l'ECE nous révèle la présence d'une séquence consensus très conservée chez plusieurs MEP (XU *et al.*; 1994). Dans cette famille, nous retrouvons la neprilysine (NEP ou EC 24.11), la thermolysine et la Kell. Il y a présentement 3 isomères de l'ECE qui ont été identifiées : ECE-1, ECE-2 et ECE-3. L'ECE-1 est l'isomère découvert par Xu *et al.* (1994). (**Tableau 1**)

1.1.2.1 L'ECE-1

L'ECE-1 est l'isoforme la plus importante de par son action et son expression. Elle est retrouvée abondamment au niveau des cellules endothéliales mais aussi au niveau de certaines cellules exocrines, cellules musculaires lisses, neurones ou cellules gliales (HIOKI *et al.*, 1991; HISAKI *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 1995; BARNES *et al.*, 1997; BARNES *et al.*, 1999; KORTH *et al.*, 1999). Une étude faite par le groupe de Shimada *et al.* (1996) révéla que l'ECE-1 existait sous la forme d'un homodimère de

TABLEAU I

Caractéristiques des divers isoformes de l'ECE

ECE	Description	Clivage de big ET-1	Références
ECE-1	Clive la big ET-1 en ET-1. Spécificité: big ET-1 > big ET-2 > big ET-3 Localisation: cellules endothéliales. Isoformes: ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d Un seul gène contenant quatre promoteurs encodent les quatres isoformes d'ECE-1. Les quatre isoformes ne diffèrent que par leur N-terminale (rôle dans la localisation cellulaire).	Km = 1-2 μ M pour la big ET-1	Xu <i>et al.</i> , 1994 Shimada <i>et al.</i> , 1994 Schmidt <i>et al.</i> , 1994
	ECE-1a: Localisation: membrane plasmique	Km = 0.4-0.8 μ M Vmax = 0.6-0.8 μ mol / min / mg	Shimada <i>et al.</i> , 1995 Schweizer <i>et al.</i> , 1997
	ECE-1b: Localisation: intracellulaire	Km = 0.4-0.5 μ M Vmax = 0.1-0.7 μ mol / min / mg	Shimada <i>et al.</i> , 1995 Schweizer <i>et al.</i> , 1997
	ECE-1c: Localisation: membrane plasmique	Km = 0.4-0.5 μ M Vmax = 0.5 μ mol / min / mg	Schweizer <i>et al.</i> , 1997
	ECE-1d: Localisation: membrane plasmique	Km = 1.26 μ M	Valdenaire <i>et al.</i> , 1999
ECE-2	Clive la big ET-1 en ET-1. Spécificité: big ET-1 > big ET-2 > big ET-3 59% d'homologie avec l'ECE-1. Localisation: cellules endothéliales	Km = 1-2 μ M	Emoto & Yanagisawa, 1995
	ECE-2-2a-1: Localisation: foie, rein, cellules endothéliales	n.d. n.d.	Ikeda <i>et al.</i> , 2002
	ECE-2-2a-2: Localisation: foie, rein, cellules endothéliales	n.d. n.d.	Ikeda <i>et al.</i> , 2002
	ECE-2-2b-1: Localisation: tissus neuronnax	n.d.	Ikeda <i>et al.</i> , 2002
	ECE-2-2b-2: Localisation: tissus neuronnax	n.d.	Ikeda <i>et al.</i> , 2002
ECE-3	Spécificité pour la big ET-3. Aucune action sur la big ET-1 et la big ET-2.	Km = 0.14 μ M Vmax = 7.4 pmol / min / mg de protéine pour la Big ET-3	Hasegawa <i>et al.</i> , 1998

n.d. = non déterminé

deux sous unités reliées par un pont disulfure (**Figure 3**). La cystéine impliquée dans la formation de ce pont disulfure est la Cys416 chez l'ECE-1 humaine (HOANG *et al.*, 1997).

Il existe 4 isoformes d'ECE-1. En 1995, 2 isoformes d'ECE-1 furent identifiées chez l'homme : ECE-1a et ECE-1b (SHIMADA *et al.*, 1995). En 1997, une isoforme d'ECE-1 retrouvée chez le rat fût identifiée comme une forme additionnelle d'ECE-1 chez l'homme : ECE-1c (SCHWEIZER *et al.*, 1997). Récemment, une quatrième isoforme de ECE-1 fût clonée : ECE-1d (VALDENNAIRE *et al.*, 1999a). Un seul gène, localisé sur le chromosome 1 (1p36) mais contenant 4 promoteurs alternatifs, serait responsable de la synthèse de ces quatre ECE-1 humaines (VALDENNAIRE *et al.*, 1995; 1999). Les connaissances sur la régulation de l'expression de ces isoformes sont toutefois limitées (ORZECOWSKI *et al.*, 2001). Toutes les isoformes d'ECE-1 ne diffèrent que par leur région N-terminal (**Figure 4**). Cette différence influence leur localisation respective au niveau de la cellule. En effet, les ECE-1a, ECE-1c et ECE-1d se retrouve, chez l'homme, au niveau de la membrane plasmique tandis que l'ECE-1b se retrouve au niveau intracellulaire (TAKAHASHI *et al.*, 1995; SCHWEIZER *et al.*, 1997; AZARANI *et al.*, 1998). La localisation des ECE-1 est très importante pour son action. Par exemple, il fût rapporté que l'infusion d'ET-1 dans la veine dorsale de la main produit une vasoconstriction marquée alors que l'infusion de la big ET-1 n'a aucun effet (HAYNES *et al.*, 1995). Cette étude suggère que dans ce vaisseau, la big ET-1 est uniquement clivée par une enzyme intracellulaire.

L'ECE-1 clive spécifiquement la big ET-1 entre les résidus Trp²¹ et Val²². L'importance de ce clivage précis nous est démontrée par la découverte que l'activité

Figure 3 Image du haut; Topologie de l'ECE dimérique. Dix sites de glycolysation dans la protéine sont indiqués dans le domaine extracellulaire. Image du bas; Structure du domaine de l'ECE endothéliale de rat, indiquant la présence d'un domaine "amphipathic membrane-spanning" (boîte hachurée), motif zinc (boîte noir) sites de N-glycolysation (indiqué par N), et des résidues cystéine (●, conservés entre ECE et NEP; ○, non conservés). Modifié à partir de Turner & Murphy (1996).

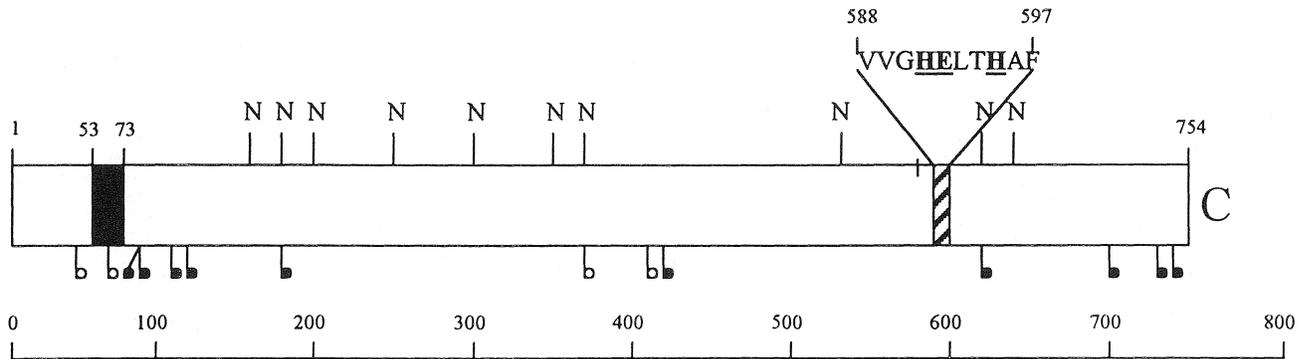
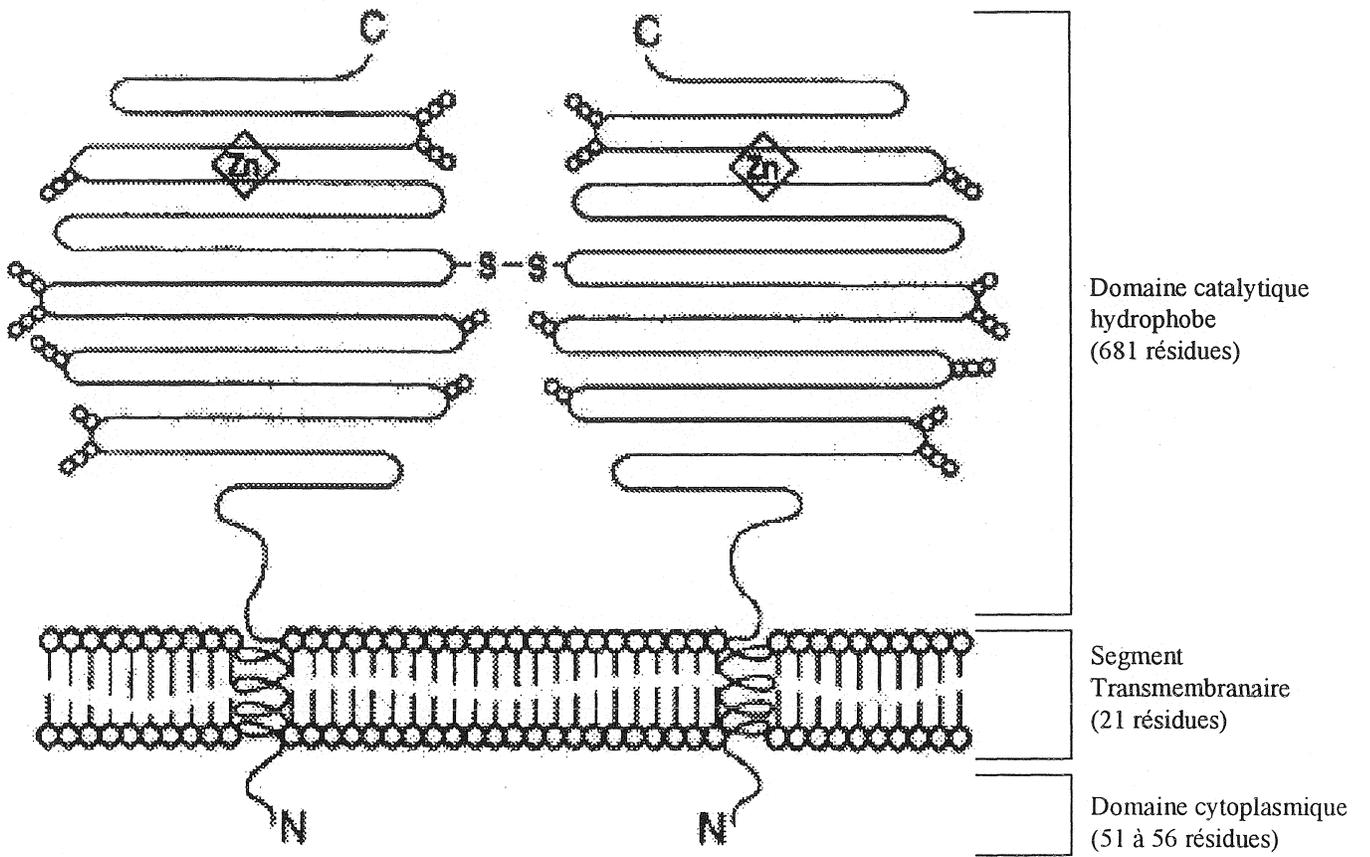


Figure 4 Alignement des séquences d'acides aminés en N-terminal des isoformes ECE-1 humaines. Les séquences communes pour les quatre isoformes sont en caractère gras et les séquences communes à ECE-1b, ECE-1c et ECE-1d sont soulignées (Turner et al., 1998 ; Valdenaire et al., 1999).

ECE-1a MPLQGLGLQRNPFLQGKRGPGLTSSPPL LPPSLQVNFHSPRSGQ ...

ECE-1b MRGVWPPPVSALL SALGMSTYKRATLDEEDLVDSLSEGDAYPNGLOVNFHSPRSGQ ...

ECE-1c MMSTYKRATLDEEDLVDSLSEGDAYPNGLOVNFHSPRSGQ ...

ECE-1d MEALRESVLHLALQMSTYKRATLDEEDLVDSLSEGDAYPNGLOVNFHSPRSGQ ...

vasoconstrictrice de l'ET-1(1-20) et de l'ET-1(1-22) est trois fois plus faible que l'ET-1(1-21) authentique (NISHIKORI *et al.*, 1991). Des études détaillées furent réalisées à l'aide de mutagenèse dirigée du gène de la big ET-1 afin d'identifier les résidus impliqués dans le clivage de ce peptide par l'ECE-1. OHNAKA *et al.* (1993) ont démontré que la partie C-terminale de la big ET-1 (Big ET-1 (16-37)) est trois fois plus spécifique pour l'ECE-1 que la big ET-1 intacte. Cette étude suggère donc que la partie N-terminale contenant une structure en boucle (Big ET-1 (1-15)) diminue la conversion de la big ET-1 par l'ECE-1. FABRINI *et al.* (1993) ont démontré qu'il n'était pas nécessaire d'avoir les résidus Trp²¹ et Val²² au site de clivage pour que l'ECE-1 puisse agir sur la big ET-1. Une autre construction intéressante, la [Phe²²] big ET-1 (18-34), démontre une activité spécifique 12 fois plus élevée que la big ET-1 pour la ECE-1 (HOANG *et al.*, 1996). Ainsi, la région C-terminale semble jouer un rôle important dans la reconnaissance de la big ET-1 par l'ECE.

Il est rapporté que le K_m de l'ECE-1 purifiée pour la big ET-1 se situe entre 0.2 μ M (ECE-1 purifiée du poumon de rat (TAKAHASHI *et al.*, 1993)) et 23 μ M (ECE-1 recombinante humaine (SCHMIDT *et al.*, 1994)). L'ordre de spécificité de l'ECE-1 envers les différentes isoformes de la big ET est: big ET-1 > big ET-2 > big ET-3. La clef de cette spécificité résiderait dans les résidus aminés 27 à 29, lesquels sont respectivement His²⁷-His²⁸-Val²⁹ (big ET-1), Glu²⁷-Gln²⁸-Thr²⁹ (big ET-2) et Glu²⁷-Gln²⁸-Thr²⁹ (big ET-3). En plus de cliver spécifiquement la big ET-1, l'ECE-1 peut aussi hydrolyser plusieurs autres peptides biologiquement actifs comme la bradykinine, la substance P, la neurotensine, l'angiotensine I et l'insuline (HOANG *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1999), bien que cela s'effectue de façon beaucoup moins efficace.

YANAGISAWA *et al.* (1998) ont observé que les souris ayant une délétion (K.O.) du gène de l'ECE-1 ont des taux plasmatiques d'ET-1 comparables aux animaux contrôles, suggérant la participation d'enzymes alternatives dans la conversion de la big ET1 en ET-1.

1.1.2.2 Autres ECEs (ECE-2, ECE-3, ECEL1)

L'ECE-2 fût identifiée en 1995 par Emoto & Yanagisawa (1995). Cette découverte révéla une protéine ayant 59% d'homologie avec l'ECE-1 pouvant convertir la big ET-1 en ET-1. Aucun substrat plus spécifique n'a été rapporté pour l'ECE-2. Sa fonction dans la biosynthèse de l'endothéline reste inconnue. Elle a été localisée au niveau des vésicules de sécrétions des cellules endothéliales (RUSSELL & DAVENPORT, 1999). Une étude de YANAGISAWA *et al.* (2000) démontre un rôle important de l'ECE-2 dans le développement cardiaque murin. Récemment, quatre isomères de l'ECE-2 furent identifiés : ECE-2a-1, ECE-2a-2, ECE-2b-1, ECE-2b-2 (IKEDA *et al.*, 2002). Ces isomères, tout comme ceux de l'ECE-1, ne diffèrent entre eux que de par leur région en N-terminal, impliquée dans la localisation au niveau cellulaire.

Une troisième enzyme de conversion, ECE-3, a été purifiée à partir de microsomes d'iris bovin et il a été démontré que cette enzyme avait une spécificité pour la big ET-3 (HASEGAWA *et al.*, 1998).

Récemment, un autre type d'ECE a été caractérisé: l'endothelin-converting enzyme-like 1 (ECEL1) (VALDENAIRE *et al.*, 1999b; SCHWEIZER *et al.*, 1999). Cette enzyme garde encore tous ses mystères mais ces études nous suggèrent qu'elle serait impliquée de façons très importante dans le contrôle nerveux de la respiration.

1.1.2.3 Inhibiteurs de l'ECE

Il y a un grand intérêt à trouver des inhibiteurs de l'ECE-1 qui pourraient être utilisés dans diverses situations pathophysiologiques impliquant l'ET telle l'hypertension (Roques, 1998). Plusieurs inhibiteurs de l'ECE ont été développés afin de contrôler et de moduler les effets de l'endothéline.

Le phosphoramidon (PR), produit de *Streptomyces tanashiensis*, a été le premier inhibiteur de l'ECE à être identifié. À l'origine, il avait été identifié comme un inhibiteur de la thermolysine, une peptidase bactérienne zinc-dépendante produite par *Bacillus thermoproteolyticus*. Le PR a démontré un fort potentiel pour inhiber les effets pharmacologiques de la big ET-1, et non ceux de l'ET-1, en bloquant la conversion de la big ET-1 en ET-1 *in vitro* et *in vivo* (FUKURODA *et al.*, 1990; MCMAHON *et al.*, 1991; RAE *et al.*, 1993). De plus, plusieurs études *in vitro* ont confirmé l'effet inhibiteur du PR sur la conversion des trois isomères de la big ET en leur ET respective (IKEGAWA *et al.*, 1991; MATSUMURA *et al.*, 1990; MATSUMURA *et al.*, 1992; YORIMITSU *et al.*, 1992). Les autres inhibiteurs d'endopeptidase tel le kélatorphan, le captopril ou la leupeptine s'avérèrent inefficaces pour inhiber les conversions des big ET. (MCMAHON *et al.*, 1991). Il est à noter que le PR est un inhibiteur non spécifique puisqu'il fût aussi utilisé chez les animaux comme inhibiteur de la NEP (Voir section suivante). Plusieurs inhibiteurs sélectifs de l'ECE virent finalement le jour (LOFFLER, 2000). Notamment, le CGS 35066 s'est avéré être particulièrement efficace, *in vitro* et *in vivo*, pour inhiber la conversion de la big ET-1 en ET-1 (DE LOMBAERT *et al.*, 2000; JENG *et al.*, 2000; TRAPANI *et al.*, 2000). Le CGS 35066 a un IC₅₀ de 22 nM et 2.3 µM envers l'ECE et la

NEP respectivement. Il a été démontré que ce nouvel inhibiteur bloquait 84% de l'effet de la big ET-1 *in vivo*. Le CGS 35066 est l'inhibiteur le plus efficace et le plus sélectif pour l'ECE à ce jour.

1.1.3 L'endopeptidase neutre 24.11 (NEP)

La NEP est une MEP localisée à la face extracellulaire de la membrane plasmique, qui effectue l'hydrolyse et l'inactivation de certains peptides. La découverte de la NEP fût réalisée en 1974, suite à une étude de purification et de caractérisation de cette enzyme au niveau du rein de lapin (KERR & KENNY, 1974). Dans ce tissu, 4% des protéines membranaires situées au niveau de la bordure en brosse sont composées de NEP. Les premiers substrats physiologiques découverts pour la NEP furent les enképhalines et la substance P, suggérant un rôle important de la NEP dans l'inactivation des signaux neuropeptidiques dans le cerveau (d'où les surnoms de la NEP tels l'enképhalinase ou la cholinestérase) (MALFROY *et al.*, 1978; MATSAS *et al.*, 1983). Cependant, la NEP joue aussi un rôle important à l'extérieur du système nerveux (ROQUES *et al.*, 1993; TURNER & TANZAWA, 1997, TURNER *et al.*, 2001). Par exemple, elle est impliquée dans l'inactivation de divers peptides natriurétiques et vasodilateurs tel l'ANP (LINDBERG *et al.*, 1992; KENNY *et al.*, 1988). Elle joue aussi un rôle important dans plusieurs cancers en inactivant les signaux peptidiques mitogéniques (SUMITOMO *et al.*, 2000; DAI *et al.*, 2001). Il a d'ailleurs été démontré que l'expression de la NEP est diminuée dans certains types de cancer, empêchant ainsi son action anti-mitogénique (SHIPP *et al.*, 1991; PANPANDREOU *et al.*, 1998).

1.1.3.1 Caractéristiques biochimiques de la NEP

La purification et le clonage de la NEP ont révélé une protéine membranaire intégrale de type II d'environ 700 acides aminés, constituée d'un petit domaine cytoplasmique en N-terminale, d'une région hydrophobe transmembranaire et d'un large domaine extracellulaire contenant le site actif (DEVAULT *et al.*, 1987). La NEP est un homodimère relié par un lien non-covalent. Elle contient un atome de zinc par sous-unité. Une étude des sites d'action (i.e. sites de liaison et de clivage) de la NEP et de la thermolysine a suggéré d'importantes similarités entre ces deux enzymes (BENCHETRIT *et al.*, 1988). La NEP a une spécificité similaire à celle de la thermolysine (MARIE-CLAIRE *et al.*, 1998). Elles hydrolysent toutes deux préférentiellement les oligopeptides par un clivage en N-terminal des acides aminés hydrophobes.

Par ailleurs, il a été démontré que la NEP partage une homologie de séquence avec l'ECE égale à 37% (XU *et al.*; 1994) (Figure 5). De plus, une étude intéressante démontre qu'une mutation de la Glu403 en Cys chez la NEP de lapin résulte en une dimérisation covalente de la NEP, similaire à celle observée avec l'ECE (HOANG *et al.*, 1997). Ceci suggère donc fortement que ces deux molécules aient une conformation semblable.

1.1.3.2 Inhibiteurs de la NEP

Il est suggéré que les inhibiteurs de la NEP pourraient avoir un rôle très important à jouer dans la médecine cardiovasculaire (ROQUES *et al.*, 1993; WILKINS *et al.*,

Figure 5 Alignement des séquences d'acides aminés en C-terminal pour l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1a), l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP) et la thermolysine (TLN) (A). Les séquences communes pour les trois protéines sont en caractères gras. Résidus équivalents chez les métalloprotéases et fonctions de ces résidus (B). (Sansom *et al.*, 1998).

A)

ECE 550 ----- -NAYY SPTKN EIVF PAGILQ APPYTR SSPN ALNFGGIGVV 588
 NEP 542 ----- -NAFYSSGRN QIVF PAGILQ PPFSSAQSN SLNYGGIGMV 580
 TLN 101 RSSVHYSQGY NNAFWNGSEM VYGDGDGQTF IPLS----- -----GGI--DV 139

 ECE 589 VGHELTHAFD DQGREYDKDG NLRPWWKNSS VEAPKQQTEC MVQQYNNYS-- 637
 NEP 581 IGHEI THGFD DNGRNFNKDG DLVDWWTQQS ASNFKEQSQC MVYQYGNSFW 630
 TLN 140 VAHELTHAVT D----- ----- -----YT AGLIYQNES-- 161

 ECE 638 --VNGEPVNG-- RHTLGENIAD NGGLKAAYRA YQNWVK KNGA EQILPTLGLT 685
 NEP 631 DLAGGQHLNG INTLGENIAD NGGLGQAYRA YQNYIK KNGE EKLLPGLDLN 680
 TLN 162 ----- --GAINAISD IFGTLVEFYA NKNPDWEIGE DVYTPGISGD 200

 ECE 686 SNQLF FLGFA QVWCSVRTPE SSHEGLITDP HSPSRFRVIG SLSNSKEFSE 735
 NEP 681 HKOLF FLNFA QVWCGTYRPE YAVNSIKTDV HSPGNFRITG TLQNSAEFSE 730
 TLN 201 SLRSMSDFAK YGDPDHYSKR YTGTQDNNGV HINSGIINKA AYLISQGGTH 250

 ECE 736 HFRCP LGSPM NFRHKCEVW 754
 NEP 731 AFHCRKNSYM NFEKKCRVW 749
 TLN 251 YGVS VVGIGR DKLGIIFYRA LTQYLTP TGN FSQLRAAAVQ SATDLYGSTS 300

 TLN 301 QEVASVKQAF DAVGVK 316

B)

Fonction des résidus		THLN	NEP	ECE-1a
Lie le C-terminal des inhibiteurs		None	R102	R129
Motif de liaison de l'inhibiteur (motif 1)		N112	N542	N550
		A113	A443	A551
	(S ₁) →	F114	F544	F552
	(S ₂) →	W115	Y545	Y553
Région conservé près du site de liaison du zinc		G135	G575	G583
		G136	G576	G584
		I137	I577	I585
	(S' ₁) →	V139	V580	V588
		V140	I581	V589
		A141	G582	G590
Motif Zinc 'HExxH' (motif 2)	(Zn ²⁺) →	H142	H583	H591
	(Glu cat) →	E143	E584	E592
		L144	I585	L593
		T145	T586	T594
	(Zn ²⁺) →	H146	H587	H595
Lien H vers l'inhibiteur (3)		Y157	Y625	Y633
Lien H de la liaison Zn ²⁺ à His (motif 4)	(Zn ²⁺) →	E166	E646	E651
		D170	D650	D655
His stabilisant (5)		H231	H711	H716

1993). Comme mentionné précédemment, le PR inhibe les effets de la NEP, tout comme ceux de l'ECE et de la thermolysine. Plusieurs inhibiteurs sélectifs de la NEP ont été synthétisés desquels le thiorphan (TR) est l'un des plus efficace et le mieux décrit dans la littérature (ROQUES *et al.*, 1980) (Figure 6).

Grâce à ces inhibiteurs sélectifs, l'implication de la NEP dans diverses situations a été étudiée. Ainsi, ABASSI *et al.* (1993) démontrait que la NEP ne pouvait pas générer d'ET-1 à partir de la big ET-1 *in vitro*. Cependant, l'année suivante, l'équipe de Murphy *et al.* (1994) a réfuté cette conclusion par leurs études *in vitro*. Cette découverte remet en question les conclusions de plusieurs études faites sur l'ECE. En effet, certaines activités ECE PR-sensibles pourraient être en partie attribuables à la NEP. Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré l'effet inhibiteur du thiorphan sur le mécanisme de conversion de la big ET-1 en ET-1 ainsi que sur divers effets physiologiques de la big ET-1, suggérant une implication de la NEP dans ces processus (MCMAHON *et al.*, 1991; LEBEL *et al.*, 1996; LAPORTE *et al.*, 1997).

Par ailleurs, des études ont rapporté que la NEP dégradait significativement l'ET-1, terminant ainsi l'action de ce peptide (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 1990; SOKOLOVSKY *et al.*, 1992). Il a été rapporté que l'inhibition de la NEP, avec le TR, cause une vasoconstriction des vaisseaux de résistance humains, *in vivo* via l'inhibition de la dégradation de l'ET-1 (FERRO *et al.*, 1998).

1.1.4 Un nouveau métabolite biologiquement actif de la big ET-1 : ET-1(1-31)

L'équipe de PATTERSON *et al.* (1990) a été la première à suggérer l'existence d'une voie de synthèse alternative à celle impliquant les ECEs, pour les peptides ETs. Ils

Figure 6 Modèle de liaison du thiorphan (A) et du phosphoramidon (B) à l'endopeptidase neutre 24.11 (Turner & Murphy, 1996).

avaient découvert que la cathepsine G clivait la big ET-1 pour produire un nouveau peptide vasoconstricteur constitué de 27 à 31 acides aminés. Une autre étude, utilisant la spectrométrie de masse, a par la suite confirmé que le dit peptide était composé de 31 acides aminés, d'où la terminologie de ce nouveau peptide : ET-1(1-31) (KAW *et al.*, 1992). En 1990, l'étude de Takaoka *et al.* a démontré que la chymotrypsine (qui a une spécificité de clivage pour les a.a. Tyr, Phe et Trp) pouvait aussi cliver la big ET-1 porcine pour produire l'ET-1 mature (TAKAOKA *et al.*, 1990b). Dans cette même étude, un fait intéressant a été remarqué : la chymotrypsine devait d'abord cliver la big ET-1 entre les acides aminés Tyr³¹ et Gly³² pour ensuite pouvoir cliver le peptide au niveau des acides aminés Trp²¹ et Val²². En 1997, une autre étude a démontré que l'incubation de la big ET-1 avec des fractions membranaires de poumon humain conduisait à la formation d'ET-1(1-31) comme produit majeur de l'hydrolyse (HANSON *et al.*, 1997). Il a été suggéré que cette hydrolyse était effectuée par une sérine protéase chymostatine-sensible. Parallèlement à ces études, une autre équipe de chercheurs a découvert que l'incubation de la big ET-1 avec la chymase, purifiée à partir de mastocytes humains, résultait en la formation d'ET-1(1-31) sans aucun autre produit de dégradation (NAKANO *et al.*, 1997; KIDO *et al.*, 1998). Cette découverte a permis l'identification de l'enzyme jusqu'alors inconnue ayant une activité sérine protéase pouvant cliver la big ET-1 en ET-1(1-31) dans le poumon humain : la chymase (**figure 7**).

Au niveau pulmonaire, les mastocytes sont localisés dans la sous-muqueuse et autour des veinules des bronches. Suite à leur activation, les mastocytes libèrent divers médiateurs chimiques et protéases comme la chymase, la tryptase et la carboxypeptidase.

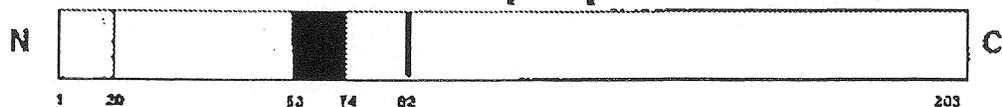
Figure 7 Schéma de la voie de biosynthèse de l'endothéline-1(1-21) et de l'endothéline-1(1-31) (Lüscher *et al.*, 2000)

prepro Endothelin-1 mRNA



Arg-Arg

prepro Endothelin-1



Dibasic-Pair-Specific
Endopeptidase(s)



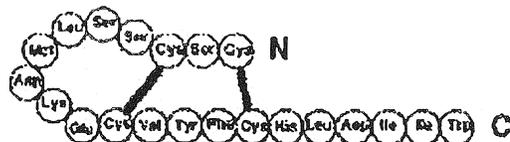
Big-Endothelin-1 (1-38)

Endothelin Converting Enzymes
(ECE-1a, ECE-1, ECE-1c, ECE-2)

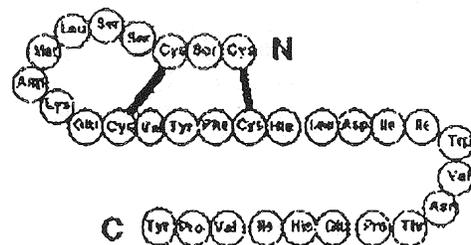
Chymase

Non-ECE Metalloprotease

Chymase



Endothelin-1 (1-21)



Endothelin-1 (1-31)

Au niveau du cœur, les mastocytes et les cellules endothéliales sont les lieux de synthèse et d'entreposage de la chymase (URATA *et al.*, 1993; SPERR *et al.*, 1994).

Des études ont révélé que la chymase est l'enzyme la plus efficace et la plus spécifique pour la formation d'angiotensine II, à partir de l'angiotensine I, dans le poumon (LINDBERG *et al.*, 1997) et le cœur (URATA *et al.*, 1990). La chymase humaine a une préférence pour les acides aminés tyrosine, proline et leucine au site de clivage (KINOSHITA *et al.*, 1990). Ainsi, la chymase humaine peut cliver la big ET-1 entre le 31^e et le 32^e acide aminé puisque cette région contient les acides aminés propices à cet effet (Pro³⁰-Tyr³¹ et Gly³²-Leu³³).

Une étude intéressante révéla que dans le poumon humain l'ET-1(1-31) se retrouve en quantité similaire à celle de la big ET-1, mais à un niveau moins élevé que l'ET-1, suggérant la participation de la chymase pulmonaire dans cette présence d'ET-1(1-31) (OKISHIMA *et al.*, 2001).

Suite à la découverte de ce nouveau peptide, plusieurs hypothèses ont émergées sur son mode d'action. Ainsi, une équipe a rapporté que l'ET-1(1-31) avait une action potentielle en lui-même (KIDO *et al.*, 1998). D'autres études ont affirmé que l'ET-1(1-31) était un agoniste sélectif du récepteur ET_A (MAZZOCHI *et al.*, 2000; REBUFFAT *et al.*, 2001). A noter qu'il n'existe à ce jour aucun agoniste sélectif du récepteur ET_A connu. L'ET-1(1-31) serait le premier si cette hypothèse se confirmait.

Cependant, d'autres études ont démontré la non-sélectivité de ce peptide envers les récepteurs ET_A et ET_B (KISHI *et al.*, 1998; NIWA *et al.*, 2000). De plus, HAYASAKI-KAJIWARA *et al.* (1999) ont démontré que le ET-1(1-31) produisait de

l'ET-1 via son clivage par la NEP, suggérant ainsi que l'ET-1(1-31) médie ses actions via sa conversion en ET-1.

Ainsi, il y a encore beaucoup d'ambiguïtés sur le mécanisme d'action de ce nouveau peptide de la famille des ETs.

1.1.5 Récepteurs de l'endothéline ET_A et ET_B

En 1989, une étude comparative entre les 3 isoformes de l'ET a révélé que l'ET-3 était moins active que l'ET-1 ou l'ET-2 pour induire la vasoconstriction dans les artères coronaires du porc ainsi que *in vivo*, chez le rat anesthésié (INOUE *et al.*, 1989). Par contre, d'autres études démontrèrent que les trois isoformes de l'ET étaient équipotentes pour induire la libération du NO de l'endothélium de diverses préparations vasculaires isolées telles le poumon de cobaye, le mésentère de rat ou l'aorte de lapin (DE NUCCI *et al.* 1988; WARNER *et al.*, 1989). L'hypothèse de l'existence de deux récepteurs de l'ET a été ainsi considérée et par la suite confirmée par le clonage de deux entités réceptorielles: le récepteur ET_A (ARAI *et al.*, 1990) et le récepteur ET_B (SAKURAI *et al.*, 1990).

L'ordre d'affinité des diverses ETs pour le récepteur ET_A est $ET-1 \geq ET-2 > ET-3$ (ET-1 a une affinité 100 fois plus grande que celle de ET-3) (LIN *et al.*, 1991; HOSODA *et al.*, 1991). Le récepteur ET_B a une affinité équipotente pour les trois isoformes de l'ET : $ET-1 = ET-2 = ET-3$ (SAKAMOTO *et al.*, 1991; OGAWA *et al.*, 1991). Les récepteurs ET_A et ET_B ont 48% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés. En 1993, un troisième récepteur à l'ET (le récepteur ET_C), spécifique à ET-3, a été découvert chez *Xenopus laevis* (KARNE *et al.*, 1993). Le récepteur ET_C possède une homologie de

séquences en acide aminé de 47 et 52% pour le récepteur ET_A et ET_B respectivement. Si la fonction du récepteur ET_C est de causer la dispersion des granules de pigmentation dans les mélanophores de *Xenopus laevis*, on ne retrouve cependant aucun analogue de ce récepteur chez les mammifères.

Les récepteurs de l'ET font partie de la superfamille des RCPGs (Récepteurs couplés aux protéines G), une famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires possédant une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C terminale cytoplasmique. Ces récepteurs se couplent à diverses sous unités α de protéines G (G α s, G α i ou G α q) en fonction du type cellulaire où ils sont exprimés (TAKIGAWA *et al.*, 1995; TAKAGI *et al.*, 1995). Les récepteurs ET_A et ET_B diffèrent non seulement dans leur extrémité N-terminale (qui assure la liaison du ligand ET) mais aussi dans leur extrémité C-terminale, qui est cruciale pour la spécificité de couplage des récepteurs aux protéines G (Masaki *et al.*, 1999). Par contre, les sept domaines transmembranaires de ces deux récepteurs possèdent une grande homologie entre eux.

Ainsi, l'endothéline doit se lier à ses récepteurs pour engendrer ses divers effets physiologiques. Mais l'endothéline n'agit pas directement. Entre la liaison de l'ET à son récepteur et l'effet observé, il y a une multitude de molécules qui véhiculent et transmettent l'action de l'ET. Ce sont les médiateurs.

1.1.5.1 Médiateurs de l'endothéline

Parmi les divers effets biologiques observés de l'ET, la propriété vasoconstrictrice de l'ET-1 a été découverte en premier et est la plus étudiée.

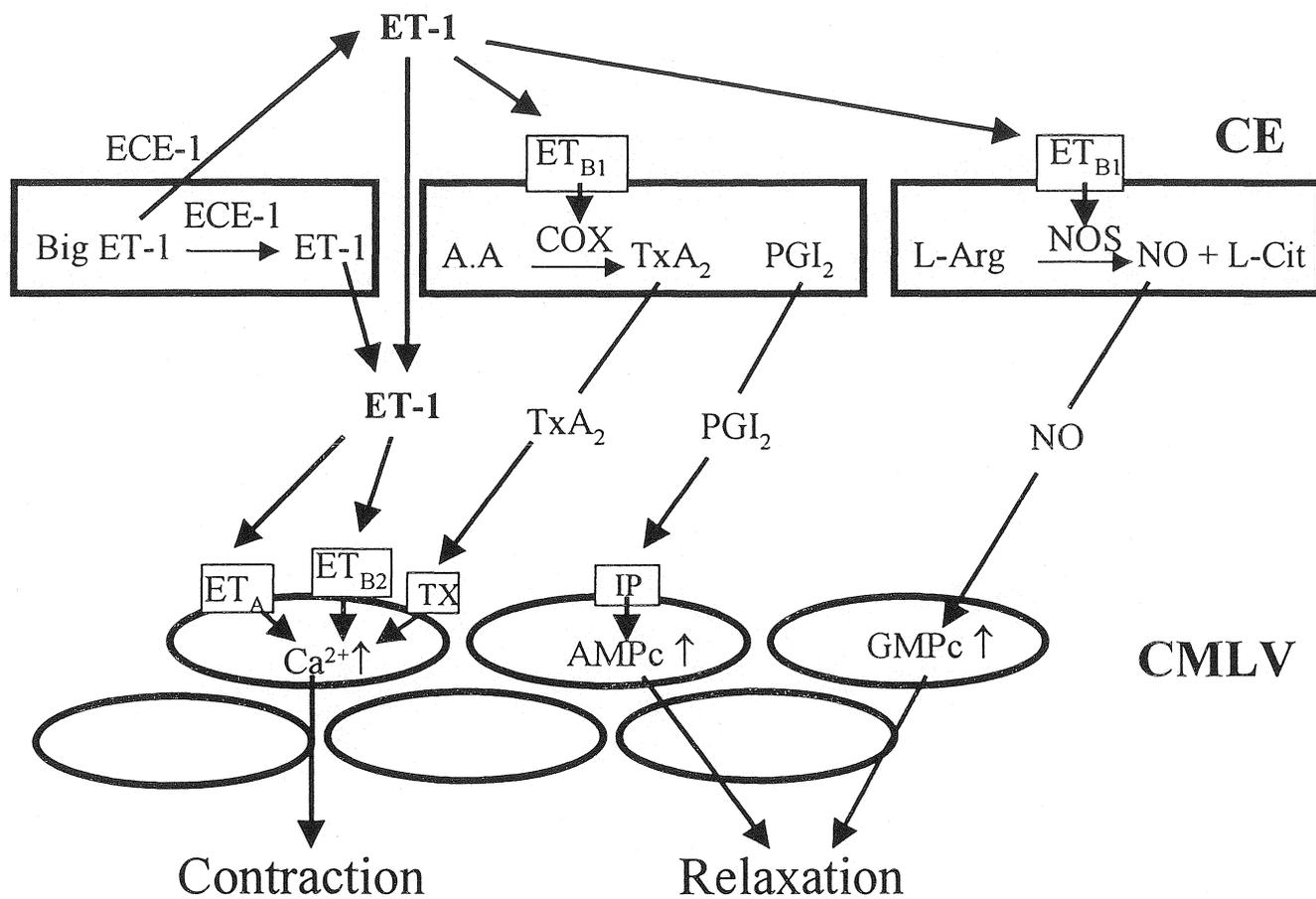
Au niveau des vaisseaux sanguins, les récepteurs ET_A sont principalement situés sur les cellules musculaires lisses et provoquent, lorsqu'ils sont activés, une contraction via l'augmentation cytoplasmique du niveau calcique (GOTO *et al.*, 1989; IWAMURO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999) (**Figure 8**). Il fût démontré que l'ET-1 n'active pas directement les canaux calciques de type L, puisque ce peptide ne déplace pas la liaison de plusieurs ligands de ces canaux (KASUYA *et al.*, 1989; GU *et al.*, 1989; HAMILTON *et al.*, 1989). De plus, les antagonistes des canaux calciques de type L n'interfèrent pas avec la liaison de l'ET-1 sur les vaisseaux sanguins ou les cellules musculaires lisses, suggérant ainsi que l'ET-1 agit sur son récepteur pour mobiliser le Ca²⁺ dans ces cellules (GARDNER *et al.*, 1992; HIRATA *et al.*, 1988). D'autre part, l'ET-1 libère le Ca²⁺ intracellulaire, emmagasiné dans le réticulum sarcoplasmique, en stimulant l'augmentation d'inositol triphosphate (LITTLE *et al.*, 1992; PANG *et al.*, 1989; KASUYA *et al.*, 1989). Le Ca²⁺ agit en activant diverses cascades intracellulaires (tel la kinase des chaînes de myosine légère) aboutissant à la contraction des fibres de myosine (Rubanyi & Plokoff, 1994).

Le récepteur ET_B pour sa part est localisé plus particulièrement à la surface des cellules endothéliales et provoque la libération de facteurs relaxants tels la PGI₂ et le NO (DE NUCCI *et al.*, 1988a; DE NUCCI *et al.*, 1988b; BOTTING & VANE, 1990; HYSLOP & DE NUCCI, 1992) ainsi que de facteurs contractiles tel le thromboxane A₂ (TxA₂) (**Figure 8**).

La première évidence que l'ET-1 pouvait stimuler le métabolisme de l'acide arachidonique (précurseur de PGI₂ et TxA₂) via l'activation de la phospholipase A₂ a été rapportée par De NUCCI *et al.* en 1988. Ils démontrèrent que l'ET-1 provoque la

Figure 8 Schéma de l'action vasculaire de l'endothéline-1 et de ses médiateurs sur les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaire.

A.A: acide arachidonique; AMPc: adénosine monophosphate cyclique; CE: cellules endothéliales; CMVL: cellules musculaires lisses vasculaires; COX: cyclooxygénase; ET-1: endothéline-1; ECE: enzyme de conversion de l'endothéline; ET: récepteur de l'endothéline; GMPc: guanosine monophosphate cyclique; IP: récepteur prostacycline; L-Arg: L-arginine; L-Cit: L-citruiline; NO: oxyde nitrique; NOS: oxyde nitrique synthase; PGI₂: prostacycline; TX: récepteur du thromboxane; TxA₂: thromboxane A₂.



libération de PGI₂ et TxA₂ à partir de préparations pulmonaires de rat et de cobaye. D'autres études subséquentes confirmèrent l'activation de la phospholipase A₂ par l'ET-1 (REYNOLDS *et al.*, 1989; RESINK *et al.*, 1989; ABDEL LATIF *et al.*, 1991).

La PGI₂ libérée par les cellules endothéliales interagit avec les récepteurs de type IP, situés à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires, ce qui provoque l'augmentation intracellulaire d'AMPc et la relaxation subséquente des cellules musculaires. D'autre part, il a été démontré que la libération de TxA₂ et l'activation de ses récepteurs étaient impliquées dans la bronchoconstriction induite par l'ET-1 (SCHUMACHER *et al.*, 1990). L'aspirine ou l'indométhacine abolit la métabolisation de l'acide arachidonique en eicosanoïdes (PGI₂ et TxA₂) en inhibant l'enzyme catalysant leur formation, la cyclooxygénase (COX) (MONCADA *et al.*, 1973).

Le NO est produit suite à l'oxydation de la L-arginine en L-citruline via la NO-synthase (NOS) (PALMER *et al.*, 1988). Il existe 3 isoformes de la NOS : nNOS (neuronale), iNOS (inductible) et eNOS (endothéliale) (MONCADA *et al.*, 1997). La eNOS, retrouvée au niveau des cellules endothéliales, est responsable de la production du NO vasorelaxant (MARSDEN *et al.*, 1992; SESSA *et al.*, 1992). Le NO, qui est un produit très labile, est libéré des cellules endothéliales et agit sur le muscle lisse vasculaire en stimulant la formation de GMPc via l'enzyme guanylate cyclase soluble, ce qui induit la vasorelaxation (RAPOPORT *et al.*, 1983).

Des études *in vitro*, sur diverses veines et artères de différentes espèces animales, démontre l'implication du récepteur ET_B dans la vasoconstriction (NISHIYAMA *et al.*, 1995a; SUDJARWO *et al.*, 1993). Par ailleurs, une étude a révélé la présence de deux types de récepteur ET_B. Ainsi, les récepteurs ET_B sont présents sur les cellules endothéliales

(ET_{B1}) médieraient la libération de facteurs relaxants alors que les récepteurs ET_B présents sur le muscle lisse (ET_{B2}) provoqueraient la contraction via l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (DOUGLAS *et al.*, 1995).

En plus de médier les divers effets physiologiques de l'ET-1, les récepteurs ET_B jouent un rôle important dans la clairance de ce peptide. En effet, la demi-vie de l'ET-1 chez les mammifères est moins de 1.5 min car ce peptide est efficacement éliminé par les lits vasculaires splanchniques, rénaux et pulmonaires (HEMSEN *et al.*, 1995; KOBAYSHI *et al.*, 1998). Suite à des études utilisant divers antagonistes des récepteurs de l'ET-1, il a été proposé que le récepteur ET_B était le seul impliqué la clairance de l'ET-1 (FUKURODA *et al.*, 1994; BRUNET *et al.*, 1996; DUPUIS *et al.*, 1996; KOBAYSHI *et al.*, 1998; BERTHIAUME *et al.*, 2000). En se liant aux récepteurs ET_B, l'ET-1 subit une internalisation et une dégradation rapide (avec son récepteur) dans les lysosomes (PAASCHE *et al.*, 2001; BREMNES *et al.*, 2000).

1.1.5.2 Antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B

Les récepteurs ET_A et ET_B constituent des cibles importantes pour moduler les effets des ETs. Ainsi, plusieurs antagonistes des récepteurs de l'ET ont été identifiés à ce jour.

Le premier antagoniste découvert, et le plus utilisé jusqu'à aujourd'hui, est le BQ-123 : un antagoniste sélectif du récepteur ET_A, découvert dans un milieu de culture de *Streptomyces misakiensis* (IHARA *et al.*, 1991a; ISHIKAWA *et al.*, 1992). Il a été démontré que le BQ-123 inhibait la liaison de l'ET-1 au récepteur ET_A et qu'il diminuait

considérablement l'effet presseur de l'ET-1 chez le rat anesthésié, démontrant ainsi l'implication du récepteur ET_A dans la vasoconstriction (IHARA *et al.*, 1991b).

En 1994, Ishikawa *et al.* ont caractérisé biochimiquement et pharmacologiquement le premier antagoniste sélectif du récepteur ET_B : le BQ-788 (OKADA & NISHIKIBE, 2002; GRATTON *et al.*, 2000; ISHIKAWA *et al.*, 1994). Cette étude a démontré entre autre, *in vivo* chez le rat, que le BQ-788 abolissait la réponse vasodilatatrice transitoire de l'ET-1 et augmentait sa réponse pressive, démontrant ainsi l'implication du récepteur ET_B dans la vasodilatation.

Aujourd'hui, il existe une multitude d'antagonistes des récepteurs ET (DASGUPTA *et al.*, 2002; BENIGNI & REMUZZI, 1999; FERRO & WEBB, 1996; GRAY & WEBB, 1996). Ces antagonistes ont aidé d'une part à caractériser les récepteurs de l'ET et d'autre part, ont apporté et apporteront une meilleure compréhension de l'implication pathophysiologique de l'ET-1.

1.1.6 Effets Pharmacologiques

Après avoir parcouru la biosynthèse de l'ET-1, les enzymes impliqués dans sa formation, les récepteurs de l'ET-1 ainsi que les divers médiateurs véhiculant l'action de l'ET, nous allons faire un survol des divers effets pharmacologiques de l'ET-1.

1.1.6.1 ET-1

L'ET-1 est la seule isoforme de l'ET à être détecté dans les cellules endothéliales vasculaires (YANAGISAWA *et al.*, 1988; YANAGISAWA *et al.*, 1989). Elle est aussi exprimée dans plusieurs cellules non-vasculaires, notamment au niveau du cerveau, des

reins, des poumons et d'autres tissus (SAKURAI *et al.*, 1991). De plus, les récepteurs de l'ET sont distribués dans une variété de cellules et de tissus en différentes proportions. Ces derniers faits suggèrent une multitude de fonctions physiologiques pour l'ET-1 (RUBANYI & POLOKOFF, 1994; MASAKI *et al.*, 1994; RAE *et al.*, 1994; NUSSDORFER *et al.*, 1999) (**Tableau II**).

Les effets de l'ET-1 sur le système cardiovasculaire restent les plus documentés (**Tableau III**). Ainsi, l'infusion intraveineuse d'ET-1, chez diverses espèces animales, provoque une phase vasodilatatrice transitoire suivie d'une phase vasoconstrictrice (YANAGISAWA *et al.*, 1988a; LIU *et al.*, 1990; DE NUCCI *et al.*, 1988a; HOM *et al.*, 1990). L'utilisation d'inhibiteurs des NOS (inhibant ainsi la production de NO) réduit la phase vasodilatatrice induite par l'ET-1, indiquant que cette phase est médiée via la libération de NO endothéliale (GARDINER *et al.*, 1990; FOZARD & PART, 1992). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la COX, tel que l'indométhacine (inhibant entre autre la production de PGI₂), n'altère pas la phase vasodilatatrice mais potentialise la phase vasoconstrictrice (WALDER *et al.*, 1989). L'injection intravasculaire de la big ET-1 n'induit seulement qu'une phase vasoconstrictrice, contrairement à l'ET-1 qui provoque une réponse biphasique. (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1991a; HALEEN *et al.*, 1993).

Divers modèles animaux ont été développés, et leur système endothélinergique caractérisés, afin de mieux étudier les diverses propriétés des ETs. Les effets cardiovasculaires de l'ET-1 et de la big ET-1 sont bien connus *in vivo* chez le cobaye et le lapin, ainsi que dans divers tissus et organes provenant de ces mêmes modèles animaux (**Tableau IV & V**). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation de l'ET (ECE et NEP), les récepteurs de l'ET (ET_A et ET_B) ainsi que les médiateurs de l'ET

TABLEAU II

Effets non cardiovasculaires de l'endothéline-1

Système/Organes / Tissus	Récepteurs	Actions
Rein / Tubules	ET _B ¹	Diminue la réabsorbtion de Na ⁺
Poumon / Épithélium de trachée	ET _A	Stimule la libération d'arachidonate Stimule la sécrétion de mucus Stimule le battement des cils
Poumon / Muscle lisse de trachée et bronches	ET _A , ET _B	Contraction
Tractus gastrointestinal / Muscle lisse de l'Iléon	ET _A , ET _B	Contraction / relaxation
Foie / Hépatocytes	ET _A , ET _B	Stimule la glycogénèse
Organe sexuel mâle / vas déférent	ET _A , ET _B	Contraction
Organe sexuel femelle / ovaire	n.d.	Stimule la synthèse de stéroïdes
Yeux / iris	ET _B	Contraction du sphincter
Os / ostéoclastes	n.d.	Inhibe (direct) / stimule (indirect) la résorbtion de l'os par les ostéoclastes
Os / ostéoblastes	n.d.	Stimule la prolifération des ostéoblastes
Glande surrénales / cortex	ET _A , ET _B	Stimule la sécrétion d'aldostérone
Hypothalamus	ET _A , ET _B	Inhibe la libération de prolactine Stimule la sécrétion d'ocytocine
Système nerveux central	ET _A , ET _B	Dépression respiratoire Stimule la libération de la substance P Élévation plasmatique de catécholamine et du niveau du glucose
Système nerveux périphérique / nerf parasympathique	ET _B ²	Potentie contraction cholinergique
Système nerveux périphérique / nerf sympathique	n.d.	Inhibe la libération de noradrénaline Potentie l'action de la noradrénaline

Modifié à partir de RUBANYI & POLOKOFF (1994)

¹OHUCHI *et al.*, 2000

²HENRY *et al.*, 1995

n.d. = non déterminé

TABLEAU III

Effets cardiovasculaires de l'endothéline-1

Système/Organes / Tissus	Récepteurs	Actions
Cellules sanguines / Plaquettes	ET _B ¹	Inhibe l'aggrégation plaquettaire
Cœur	ET _A , ET _B	Inotropie positive, Chronotropie positive, Hypertrophie
Foie / Vaisseau sanguin portal	ET _B	Vasoconstriction
Gros vaisseaux / Endothélium	ET _B	Libération PGI ₂ et NO
Gros vaisseaux / Muscle lisse	ET _A , ET _B	Contraction (veine > artère)
Microcirculation	ET _A	Vasocontraction (artérioles > veinule)
Microvaisseaux / Endothélium	ET _A , ET _B	Libération PGI ₂ et NO
Microvaisseaux / Muscle lisse	ET _A	Contraction
Pression sanguine	ET _A , ET _B	Effet dépresseur transitoire Effet presseur soutenu
Poumon / Vaisseau sanguin	ET _A , ET _B	Vasoconstriction
Rate/ Vaisseau sanguin	ET _A	Vasoconstriction Libération de prostanoides
Rein / Vaisseau sanguin	ET _A , ET _B	Vasoconstriction

Modifié à partir de RUBANYI & POLOKOFF (1994)

¹ LABONTÉ *et al.*, 2001

TABLEAU IV

Système endothélinergique cardiovasculaire et pulmonaire chez le cobaye

Système/Organe /tissus/cellules	Système endothéline	Référence
Bronches supérieures	ECE impliquée dans la maturation de la big ET-1 en ET-1.	Lebel <i>et al.</i> , 1995
Cellule Clara	Synthèse de ET-1 de façon phosphoramidon-sensible.	Laporte <i>et al.</i> , 1995 et 1996
Cell. épithéliales de trachée	ET-1 est produite par ECE et dégradé par NEP	Yang <i>et al.</i> , 1997
mésentère: Veine et artère	ET-1: Vasoconstriction via le récepteur ET _A .	Berthiaume <i>et al.</i> , 1995
Paranchyme pulmonaire	NEP impliquée dans la maturation de la big ET-1 en ET-1.	Lebel <i>et al.</i> , 1996
Poumon	ET-1 & Big ET-1: libération de TxA ₂ et PGI ₂ via le récepteur ET _B .	De Nucci <i>et al.</i> , 1988; D'Orléans-juste <i>et al.</i> , 1994; Gratton <i>et al.</i> , 1995
	ET-1 provoque la libération de TxA ₂ via le NO	Lewis <i>et al.</i> , 1998 et 1999
Rein	ET-1: Vasoconstriction directe via le récepteur ET _A , modulée par NO ET-1: libère aucun eicosanoïdes	Duval & D'Orléans-juste 2000
Systémique	ET-1: Augmentation biphasique de la MAP. Big ET-1: Effet monophasique presseur soutenu ET-1 & Big ET-1: bronchoconstricteur.	Gratton <i>et al.</i> , 1995 D'Orléans-juste <i>et al.</i> , 1991b;
	ET-1 provoque un effet bronchoconstricteur (PIP) et vasorelaxant (MAP) via le NO	Lewis <i>et al.</i> , 1999

TABLEAU V

Système endothélinergique cardiovasculaire et pulmonaire chez le lapin

Système/Organe /tissus/cellules	Système endothéline	Référence
Aorte	ET-1: activation des canaux calciques de type R via les récepteurs ET _A et ET _B .	Benckroun <i>et al.</i> , 1995
Artère pulmonaire	Présence unique de ET _B .	Calo <i>et al.</i> , 1996
Carotide	Présence prédominante ET _A .	Calo <i>et al.</i> , 1996
	Augmentation de la pression de perfusion: stimule l'expression d'ET-1 et ET _B .	Lauth <i>et al.</i> , 2000
Poumon	ET-1: effet vasopresseur et libération de PGI ₂ via ET _B . L'ECE présente est sélective pour la big ET-1.	Gratton <i>et al.</i> , 1995a
Rein	ET-1: libération de prostanoïdes vasodilateurs et vasoconstriction via le récepteur ET _A .	D'Orléans-Juste <i>et al.</i> , 1993 & Télémaque <i>et al.</i> , 1993a
	Big ET-1: effet vasopresseur et libération de prostanoïdes (phosphoramidon-sensible).	Télémaque <i>et al.</i> , 1992, 1993b
	Antagoniste ET _B en présence d'ET-1: potentie l'augmentation de la pression vasculaire mais ne diminue pas la libération de prostanoïde. Inhibiteur NOS en présence d'ET-1: potentie l'augmentation de la pression vasculaire.	D'Orléans-Juste <i>et al.</i> , 1994
Systémique	ET-1: effet biphasique sur MAP. Big ET-1: effet monophasique presseur soutenu.	D'Orléans-Juste <i>et al.</i> , 1991a Gratton <i>et al.</i> , 1997, 1998 & 2000 Roberts-Thomson <i>et al.</i> , 1994
	Big ET-1: augmente ET-1 et prostanoïdes plasmatiques.	D'Orléans-Juste <i>et al.</i> , 1990, 1991a
	Antagoniste ET _B ou inhibiteur NO: augmente ET-1 et big ET-1 plasmatique.	Gratton <i>et al.</i> , 1997
	Antagoniste ET _B en présence de big ET-1: potentie l'effet presseur.	Gratton <i>et al.</i> , 2000
Vaisseaux	Carotide: présence prédominante ET _A . Artère pulmonaire: uniquement présence ET _B .	Calo <i>et al.</i> , 1996
Veine jugulaire	ET-1: Contraction via ET _B .	Sumner <i>et al.</i> , 1992
	Présence de ET _A et ET _B .	Calo <i>et al.</i> , 1996
Veine saphène	ET-1: contraction via ET _A .	Nishiyama <i>et al.</i> , 1995

(TXA₂, PGI₂, NO) ont tous été bien caractérisés dans ces modèles. Ainsi l'administration, en bolus, d'ET-1 dans ces deux modèles *in vivo*, produit un effet biphasique sur la pression sanguine alors que la big ET-1 n'induit qu'une vasoconstriction (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1991a; GRATTON *et al.*, 1997 & 2000, SCHMITZ-SPANKE *et al.*, 2001).

Chez l'homme, en conditions normales, le niveau circulant de l'ET-1 est très bas (ANDO *et al.*, 1989; HARTTER *et al.*, 1989; KOYAMA *et al.*, 1989; SUZUKI *et al.*, 1989). Il a été démontré que le BQ-123 diminuait la résistance vasculaire lorsqu'il était infusé *in vivo* dans les tissus vasculaires de l'avant bras chez l'homme (HAYNES & WEBB, 1994). Le BQ-788 pour sa part, abolit la phase hypotensive induite par l'ET-1 et induit une augmentation de la pression sanguine lorsqu'il est administré par voie intraveineuse *in vivo* (ISHIKAWA *et al.*, 1994). Une autre étude rapporte que l'infusion systémique d'un antagoniste non-sélectif des récepteurs ET_A/ET_B, le TAK-044, diminue aussi la résistance vasculaire périphérique (PLUMPTON *et al.*, 1996; HAYNES *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent une implication des deux récepteurs dans la régulation du tonus vasculaire. D'autre part, une étude intéressante sur des souris hétérozygotes déficientes en ET-1, montre que la pression sanguine de ces souris est élevée malgré un taux d'ET-1 plasmatique bas (OHUCHI *et al.*, 1999). Cette pression serait due à une diminution de la libération de facteurs vasorelaxants par l'endothélium (tel le PGI₂ et le NO), causée par la diminution d'expression de l'ET-1 chez ces souris.

L'ET-1 a des effets plus marqués en conditions pathophysiologiques (LERMAN *et al.*, 1991). L'ET-1 a un rôle aggravant dans plusieurs maladies cardiovasculaires incluant l'athérosclérose, l'hypertension pulmonaire, les spasmes cérébraux vasculaires

après hémorragie subarachnoïdienne, la dysfonction rénale et l'hypertension (MIYAUCHI & MASAKI, 1999). Dans ces maladies, le niveau d'ET-1 plasmatique est augmenté, et les antagonistes des récepteurs à l'ET ont des effets bénéfiques sur ces pathologies (SAKAI *et al.*, 1996). Récemment, le 5 décembre 2001, le premier médicament oral affectant le système ET fût mis sur le marché : le bosentan (TracleerTM) (CLOZEL *et al.*, 1993; CLOZEL *et al.*, 1994). Il est maintenant disponible sous prescription pour les personnes atteintes d'hypertension artérielle pulmonaire. Le bosentan est un antagoniste non spécifique des récepteurs de type ET_A et ET_B. Une approche alternative pour contrôler les effets de l'ET-1 serait d'inhiber sa biosynthèse. Plusieurs recherches ont révélé le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de l'ECE sur divers modèles animaux pathologiques (JENG *et al.*, 2002). Ainsi, une étude révéla que le CGS 26303, un inhibiteur non sélectif de l'ECE, diminue la pression artérielle moyenne chez des rats hypertendus (SHR) (DE LOMBAERT *et al.*, 1994).

D'autre part, l'ET-1 serait impliqué dans le « french paradoxe » : Une population française qui mange beaucoup de matière grasse et qui boit beaucoup de vin rouge a un faible taux de maladie cardiovasculaire. Des études ont révélé que le vin rouge (qui contient du resveratrol) inhibait la synthèse d'ET-1, ce qui empêcherait le développement de maladies cardiovasculaires normalement engendrées par l'ET-1 dans cette diète riche en lipide (EL-MOWAFY *et al.*, 1999; CORDER *et al.*, 2001).

1.1.6.2 ET-1(1-31)

Plusieurs études sur les effets de l'ET-1(1-31), sur divers organes et tissus, ont été rapportées (Tableau VI). Les effets de ce nouveau peptide sont similaires à ceux de

TABLEAU VI
Effets généraux de l'endothéline-1(1-31)

Système/Organes / Tissus/ Cellules	Récepteurs	Actions de ET-1(1-31)	Référence
Aorte	ET _A , ET _B	Vasoconstriction.	Kishi <i>et al.</i> , 1998
Artère coronaire	ET _A	Vasoconstriction	Maguire <i>et al.</i> , 2001
	ET _A , ET _B	Vasoconstriction. L'inhibition de ET _B en présence de ET-1(1-31) potentie la contraction	Niwa <i>et al.</i> , 2000
	ET _A , ET _B	Vasocontraction	Kishi <i>et al.</i> , 1998
Artère mammaire	ET _A	Vasocontraction	Maguire <i>et al.</i> , 2001
Artère ombilicale	n.d.	Contraction similaire à celle de ET-1	Takeji <i>et al.</i> , 2000
Cellules endothéliales	ET _B	Augmentation le Ca ²⁺ intracellulaire Production de NO	Niwa <i>et al.</i> , 2000
Cellules mésangiales	ET _A	Induit une augmentation de l'activation de p38-MAPK.	Inui <i>et al.</i> , 2000
	n.d.	Stimulation de la prolifération.	Yoshizumi <i>et al.</i> , 2000
	ET _A	Augmente le Ca ²⁺ intracellulaire.	Yasuoka <i>et al.</i> , 1999
Cellules musculaires lisses d'artère coronaire	n.d.	Augmente le Ca ²⁺ intracellulaire en libérant le Ca ²⁺ des storages intracellulaires	Inui <i>et al.</i> , 1999
	ET _A	Stimule prolifération via activation ERK1/2	Yoshizumi <i>et al.</i> , 1998a
	ET _A	Augmente le Ca ²⁺ intracellulaire	Yoshizumi <i>et al.</i> , 1998b
Cellules musculaires lisses vasculaires	n.d.	Stimule prolifération. Augmente le Ca ²⁺ intracellulaire.	Nagata <i>et al.</i> , 2000
Cellules musculaires lisses bronchiques	n.d.	Augmente le Ca ²⁺ intracellulaire. Conversion de ET-1(1-31) en ET-1 via NEP	Hayasaki-Kajiwara <i>et al.</i> , 1999
Cellules de la zone glomérulée des glandes surrénales	ET _A	Stimule prolifération. Agoniste sélectif ET _A .	Mazzocchi <i>et al.</i> , 2000
Cortex des glandes surrénales	ET _A	Stimule prolifération de la zone gloméruleuse Agoniste sélectif ET _A .	Rebuffat <i>et al.</i> , 2001
	ET _A	Effet sécrétagogue	Rossi <i>et al.</i> , 2002
Monocytes & Neutrophiles	ET _A	Activité chimotactique	Cui <i>et al.</i> , 2001
Trachée	n.d.	Spasmogène sur le muscle lisse de la trachée Potentie la contraction médié par les nerfs cholinergiques.	Goldie <i>et al.</i> , 2000

n.d. = non déterminé

l'ET-1. Ainsi, des études ont démontré que l'ET-1(1-31) possédait des propriétés vasoconstrictrices mais que celles-ci étaient moins importantes que celles de l'ET-1 (MAGUIRE *et al.*, 2001 ; NIWA *et al.*, 2000 ; KISHI *et al.*, 1998). L'ET-1 (1-31) induit son effet vasoconstricteur de la même façon que l'ET-1, c'est à dire, en stimulant l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires (NAGATA *et al.*, 2000 ; HAYASAKI-KAJIWARA *et al.*, 1999 ; INUI *et al.*, 1999; YOSHIZUMI *et al.*, 1998b). Par ailleurs, NIWA *et al.* (2000) a démontré que le ET-1(1-31) était aussi capable de moduler la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires, par le même mécanisme que l'ET-1, c'est à dire, en stimulant la libération de NO par les cellules endothéliales via les récepteurs ET_B. D'autre part, l'ET-1(1-31) module aussi la prolifération de divers types cellulaires tels les cellules musculaires lisses et les cellules de la zone glomérulée des surrénales (REBUFFAT *et al.*, 2001 ; MAZZOCCHI *et al.*, 2000 ; NAGATA *et al.*, 2000 ; YOSHIZUMI *et al.*, 1998a). Malgré le nombre d'études faites pour caractériser ce nouveau peptide ET, aucune étude *in vivo* n'a encore été faite avec l'ET-1(1-31).

Divers travaux ont suggéré que ET-1(1-31) pouvait jouer un rôle dans divers maladies cardiaques et pulmonaires telles l'athérosclérose (NAKANO *et al.*, 1997; YOSHIZUMI *et al.*, 1998b; NAGATA *et al.*, 2000) ou l'asthme (GOLDIE *et al.*, 2000). Par ailleurs, d'autres études ont rapporté la participation de la chymase dans ces maladies (HAMADA *et al.*, 1999; MITANI *et al.*, 1999), suggérant ainsi la présence potentielle d'ET-1(1-31).

1.2 BUT DE LA PRÉSENTE ÉTUDE

La caractérisation pharmacologique du ET-1(1-31) est encore ambiguë et incomplète. Des questions importantes restent encore en suspend. Est-ce que l'ET-1 (1-31) agit directement en se liant aux récepteurs à l'ET, ayant ainsi une action potentielle en lui-même? Ou est-ce que les effets observés du ET-1 (1-31) sont plutôt médiés par sa conversion en un métabolite actif? Si l'ET-1 (1-31) agit directement sur les récepteurs de l'ET-1, est-il un agoniste sélectif pour l'un de ces récepteurs? Mais s'il agit via sa conversion en un métabolite, quel est ce métabolite (ET-1?) et quelle(s) enzyme(s) est impliquée dans cette conversion (NEP?, ECE?)?

Récemment, la première étude *in vivo* sur l'ET-1(1-31) a été effectuée dans notre laboratoire (HONORÉ et al., 2002). Cette étude, effectuée chez le cobaye, démontre que l'ET-1(1-31), à une dose de 4 nmol/kg, induit un effet vasoconstricteur biphasique sur la pression artérielle moyenne (PAM). Le PR, mais pas le TR, réduit cet effet vasopresseur systémique, suggérant la participation de l'ECE dans cet effet. De plus, l'ET-1(1-31) provoque, de façon indométhacine-sensible, une augmentation de la pression d'insufflation pulmonaire (PIP) chez ce modèle animal, impliquant ainsi les eicosanoïdes (PGI₂ et TXA₂) dans cet effet. Le PR et le TR altèrent cette réponse PIP de l'ET-1(1-31). Cette étude suggère que l'ET-1(1-31) nécessite une conversion par l'ECE au niveau de la circulation systémique. Par contre, la NEP semble impliquée de façon plus importante que l'ECE dans les effets pharmacologiques induits par l'ET-1(1-31) dans les voies respiratoires du cobaye (HONORÉ *et al.*, 2002).

Il a été rapporté que la chymase, qui peut cliver la big ET-1 en ET-1(1-31), est libérée par les mastocytes se trouvant au niveau pulmonaire. De plus, une étude réalisée *in vitro* sur des cellules musculaires lisses bronchiales humaines démontre que l'ET-1(1-31) médie ses actions via sa conversion en ET-1 par l'intermédiaire de la NEP (HAYASAKI-KAJIWARA *et al.*, 1999). Le poumon semble donc être un organe clef dans la formation et le processus d'activation de l'ET-1(1-31).

Suite aux résultats obtenus *in vivo* chez le cobaye (HONORÉ *et al.*, 2002) et tenant compte des conclusions de l'étude de Hayasaki-Kajiwara *et al.* (1999), nous voulons, comme premier objectif, caractériser les effets *in vitro* de ET-1(1-31) sur le poumon de cobaye perfusé. Les effets de l'ET-1 sur ce modèle ont été bien documentés dans notre laboratoire (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1994 & 1991b; GRATTON *et al.*, 1995; BERTHIAUME *et al.*, 1995; LEWIS *et al.*, 1998 & 1999). Ces études ont démontré que l'ET-1 et la big ET-1 (via sa conversion en ET-1) stimulent la libération d'eicosanoïdes (TXA₂) via le récepteur ET_B lorsqu'ils sont infusés dans le poumon de cobaye perfusé. Ainsi, nous voulons étudier l'effet de l'ET-1(1-31) sur la libération d'eicosanoïdes dans le poumon perfusé de cobaye et vérifier si l'utilisation d'antagoniste des récepteurs ET_A et ET_B et d'un inhibiteur de la NEP influence cet effet.

Les buts de ce premier objectif sont donc:

- Étudier l'effet de l'ET-1, la big ET-1 et l'ET-1(1-31) sur la libération d'eicosanoïdes (PGI₂ et TxA₂) dans le poumon perfusé de cobaye.
- Déterminer l'effet d'un antagoniste du récepteurs ET_A, le BQ-123, et d'un antagoniste du récepteur ET_B, le BQ-788, sur la libération d'eicosanoïdes engendrée par l'ET-1 et l'ET-1(1-31).

- Déterminer l'effet d'un inhibiteur sélectif de la NEP, le thiorphan, sur la libération d'eicosanoïdes engendrée par la big ET-1 et l'ET-1(1-31).
- Établir le mécanisme d'action par lequel l'ET-1(1-31) agit sur la libération d'eicosanoïdes dans le poumon perfusé de cobaye.

Par ailleurs, l'étude de HAYASAKI-KAJIWARA *et al.* (1999) a démontré une métabolisation *in vitro* de ET-1(1-31) en ET-1 par la NEP au niveau des cellules musculaires lisses bronchiales. Comme second objectif, nous voulons vérifier et s'il y a lieu caractériser, l'effet et la métabolisation *in vivo* de ce nouveau peptide ET. Pour ce faire nous utiliserons le lapin comme modèle expérimental. L'action de l'endothéline sur ce dernier fut bien caractérisée dans notre laboratoire (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1991a GRATTON *et al.*, 1997,1998 & 2000). Ce modèle animal nous permet de faire plusieurs prélèvements sanguins en fonction du temps, desquels nous pouvons doser un composé spécifique. Nous voulons ainsi vérifier si l'injection systémique d'ET-1 (1-31) dans ce modèle animal, entraîne son métabolisme en ET-1.

Les buts de ce second objectif sont donc:

- Étudier l'effet de l'ET-1(1-31), la big ET-1 et l'ET-1 sur la pression artérielle moyenne (PAM) chez le lapin.
- Déterminer l'effet d'antagonistes des récepteurs ET_A, BQ-123, et ET_B, BQ-788 sur les variations de PAM engendrées par l'ET-1(1-31), la big ET-1 et l'ET-1

- Déterminer l'effet d'un inhibiteur non-sélectif de la NEP/ECE, le phosphoramidon, d'un inhibiteur sélectif de la NEP, le thiorphan, et de l'ECE, le CGS 35066, sur les variations de PAM engendrées par l'ET-1(1-31), la big ET-1 et l'ET-1.
- Déterminer les concentrations plasmatiques d'ET-1(1-31) et d'ET-1 suite à l'injection d'ET-1(1-31).

La réalisation de ces deux objectifs devrait nous permettre d'approfondir la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de l'ET-1(1-31) et nous apporter des éclaircissements sur certaines questions restées controversées concernant l'action de ce nouveau peptide.

MATÉRIELS & MÉTHODES

2.1 *IN VITRO*: PERFUSION DE POUMON DE COBAYE

2.1.1 Animaux utilisés

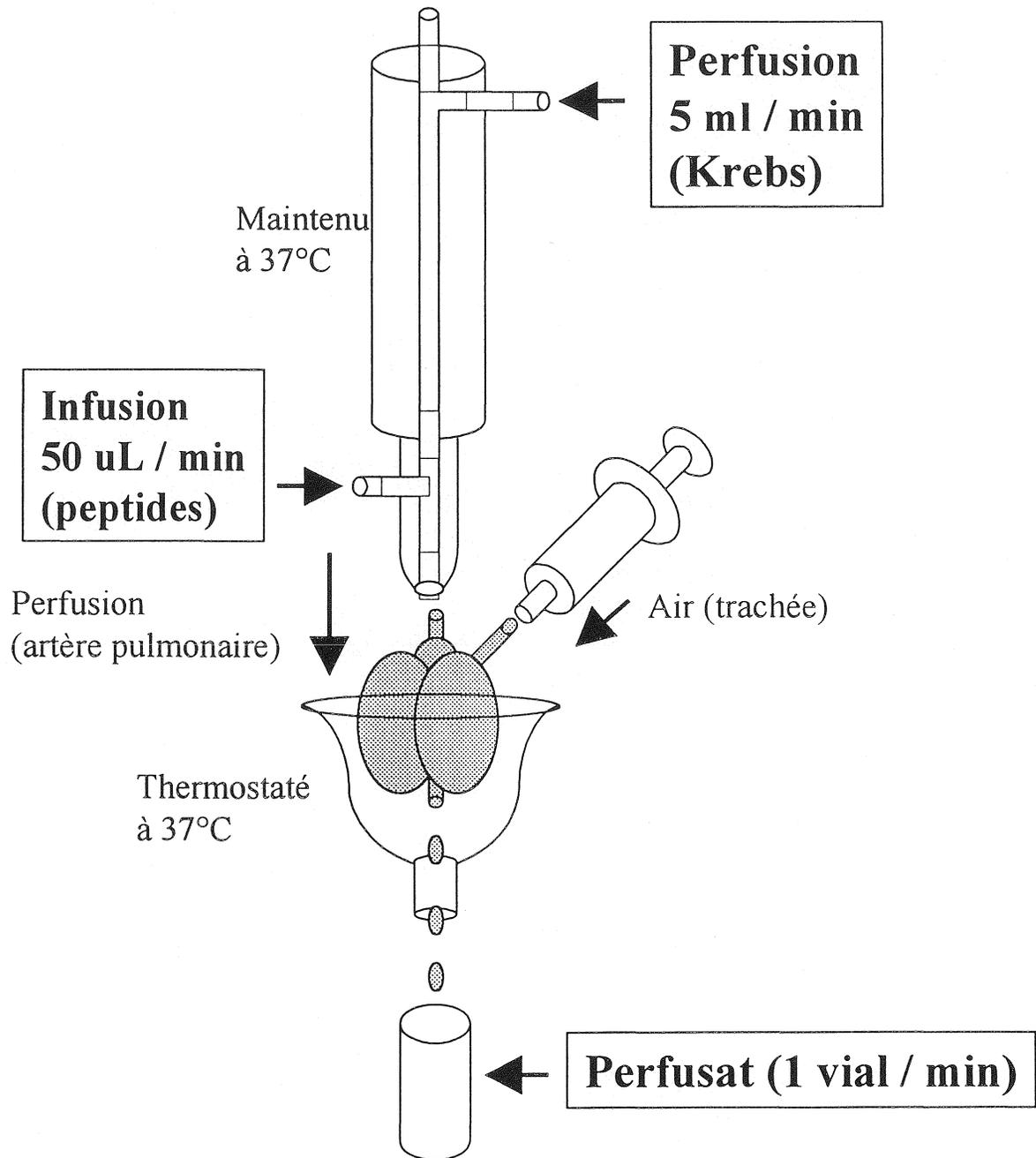
Les études *in vitro* ont été accomplies sur des poumons isolés de cobayes (mâle ou femelle) de race Hartley provenant de Charles River (Qc) et pesant de 300 g à 350 g.

2.1.2 Chirurgie et perfusion des poumons

Les cobayes sont sacrifiés par dislocation cervicale. Une thoracotomie est effectuée puis l'apex (base) du cœur est coupé afin d'insérer un cathéter (Portex, 6FG) dans l'artère pulmonaire via le ventricule droit. Les poumons sont ensuite perfusés *in situ* avec une solution de Krebs héparinée (100 U/ml). Une portion de l'oreillette droite est découpée afin de faciliter la perfusion du poumon. Par la suite, un cathéter est inséré dans la bronche supérieure (trachée). Les poumons sont finalement retirés et installés sur un montage à perfusion.

Les poumons sont installés dans une chambre chauffée puis sont gonflés avec de l'air ambiant via la canule bronchique. Les poumons sont perfusés (5 ml/min) avec une solution de Krebs chauffée (37°C) et oxygénée (95% O₂, 5% CO₂) via l'artère pulmonaire (Figure 9). La solution de Krebs utilisée est constituée de (en mM) : NaCl: 117.5, KCl: 4.7, KH₂PO₄: 1.2, CaCl₂·6H₂O: 2.5, MgSO₄·7H₂O: 1.2, NaHCO₃: 25 et glucose: 5.5. La pression est mesurée à l'aide d'un transducteur (Statham, modèle P23 AC), relié à un port latéral situé en amont de l'organe perfusé, et d'un physiographe de type Grass (Modèle 7D).

Figure 9 Schéma du montage de la perfusion de poumon isolé de cobaye



2.1.3 Protocole Expérimental

Suite à une période d'équilibration de 45 minutes, les différents agonistes (ET-1 à 5nM; ET-1(1-31) à 5 et 50 nM; big ET-1 à 10 nM) sont administrés via l'artère pulmonaire durant 3 minutes à un débit d'infusion de 50 μ l / min. Lors des infusions, le perfusat pulmonaire est récolté sous forme d'échantillons de 1 min (5ml): avant (2 min), pendant (3 min) et après (10 min) l'administration des peptides. Les échantillons sont ensuite entreposés (-20°C) jusqu'à la détermination par dosage radioimmunologique (RIA) des composés stables de la PGI₂ et le TxA₂: le 6-céto-PGF_{1 α} et le TxB₂ respectivement. En effet, il a été démontré que l'infusion d'endothélines dans le système vasculaire du poumon provoquait une vasoconstriction ainsi qu'une induction de la libération d'eicosanoïdes tels la PGI₂ et le TxA₂. (D'Orléans-juste, 1990, Lewis, 1998).

Dans certaines expériences, les poumons ont été préalablement traités pendant 60 min avec un inhibiteur sélectif de la NEP (thiorphan ; 25 μ M) ou pendant 15 min avec des antagonistes sélectifs des récepteurs de l'ET (BQ-123 à 1 μ M; BQ-788 à 5 nM) pendant avant l'injection des agonistes.

2.1.4 Thromboxane et prostacycline : dosage radioimmunologique (RIA)

Cette méthode a été appliquée selon un protocole utilisé couramment dans notre laboratoire (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1994; GRATTON *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 1999). La présence de 6-céto-PGF_{1 α} (métabolite stable de la PGI₂) et de TxB₂ (métabolite stable de TxA₂) dans les échantillons de perfusat du poumon de cobaye (section 2.1.4) est détectée par dosage radioimmunologique, selon la méthode de Salmon (1978). Les antisérums sont reconstitués dans 10 ml de solution tampon Tris (50 nM, pH:7.4)

contenant 0.1% de gélatine et 0.1% d'azyde de sodium (NaN_3). Cette solution d'antisérum donne une liaison spécifique avec son antigène d'environ 50%. L'antisérum contre le TxB_2 a une réactivité croisée de 100% avec le TxB_2 , moins de 2% avec la PGD_2 et la $\text{PGF}_{1\alpha}$ et moins de 0.1% avec la 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ et la PGE_2 . L'antisérum contre la 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ a une réactivité croisée de 100% avec la 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, 23% avec la PGE_2 , 7% avec la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et moins de 1% avec le TxB_2 . Les deux antisérums ne possèdent aucune réactivité croisée avec les différents peptides utilisés dans cette étude.

Une courbe standard est effectuée aux concentrations suivantes : 0.5, 1, 2, 5, 10 et 20 ng/ml pour le TxB_2 et 0.5, 1, 2, 3.5, 5, 10, 20 ng/ml pour la 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$. Toutes les dilutions des solutions de standard sont faites avec la solution de Tris (50 mM, pH :7.4). Un volume de 50 μl de chacune des concentrations de solutions standard et de chacun des échantillons est prélevé et mis dans des tubes de polystyrène. L'antisérum (50 μl) est ajouté à chaque tube et finalement 50 μl de l'eicosanoïde marqué au tritium (environ 2000 à 2500 coups par minute (cpm)) est aussi ajouté. De plus, des tubes indiquant la radioactivité totale, la liaison non-spécifique et la liaison totale sont préparés selon le protocole suivant :

Tubes Solutions	^3H total	Liaison non-spécifique	Liaison totale	Standards	Échantillons
Tampon Tris	250 μl	150 μl	100 μl	50 μl	50 μl
Standard	---	---	---	50 μl	---
Échantillon	---	---	---	---	50 μl
Antisérum	---	---	50 μl	50 μl	50 μl
^3H	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

Le contenu des tubes est ensuite agité et laissé à 4°C pendant 12-16 heures. Suite à l'incubation, le ligand non lié avec l'anticorps est séparé du ligand lié par l'addition de 100 µl d'une solution de tampon Tris contenant 2% de charbon activé et 0.4% de dextran, sauf dans les tube de [³H] totale. Les tubes sont ensuite agités et incubés 10 min (4°C). Une centrifugation à 1500 g durant 10 min à 4°C est ensuite effectuée (à l'aide d'une centrifugeuse Beckman TJ-6). Les surnageants sont ensuite transférés dans des vials à scintillation et 4 ml de liquide à scintillation est ajouté. La radioactivité est évaluée avec un compteur d'émission bêta (1409 Liquid Scintillation Counter Wallac).

La quantification des eicosanoïdes contenus dans les échantillons est évaluée en effectuant une intrapolation, par ordinateur (Microsoft Excel), à partir de la courbe standard.

2.2 *IN VIVO* : LE LAPIN

2.2.1 Animaux utilisés

Les études *in vivo* ont été accomplies sur des lapins albinos de race Nouvelle Zélande, mâle ou femelle, pesant 1.0 à 1.5 kg. Les lapins provenaient d'une ferme d'élevage locale (Réjean Brisebois, Fleurimont, Québec)

2.2.2 Chirurgie

Les lapins sont anesthésiés par une injection intramusculaire d'un mélange kétamine/xylamine (48 / 7 mg/kg) et des doses de maintien (22 / 3 mg/kg) sont administrées toutes les 15 minutes. Suite à une anesthésie locale au niveau du cou avec de la xylocaïne (2%), une trachéotomie est pratiquée sur le lapin. Par la suite, on réalise, via

la carotide, droite une canulation intracardiaque (canule PE 90 contenant une solution saline 0.9%) qui servira à injecter les différents peptides ainsi qu'à récolter les échantillons de sang. La canulation (canule PE 50 contenant une solution de saline 0.9% hépariné 1/100) de l'artère fémorale gauche suite à une anesthésie locale au niveau de la cuisse avec de la xylocaïne, servira à mesurer les variations de la pressions artérielle moyenne. Finalement, la canule fémorale est branchée à un transducteur qui est relié à un analyseur de pression sanguine (BPA-200A Micro-Med). Le système est relié à une imprimante qui inscrit la moyenne de la PAM calculée aux minutes. L'analyseur de pression sanguine détermine la PAM à partir des valeurs de pressions systoliques et diastoliques détectées par le transducteur de pression. La PAM est exprimée en mm Hg et est calculée à partir de l'équation suivante :

$$\text{PAM} = \text{pression diastolique} + 1/3 (\text{pression systolique} - \text{pression diastolique})$$

2.2.3 Protocole Expérimental

Après une période de stabilisation de 20 minutes, suivant la chirurgie, la réponse pharmacologique de divers agonistes (ET-1 à 0.25 nmol/kg ; ET-1(1-31) et big-ET-1 à 1 nmol/kg), injectés par voie intra-cardiaque en bolus (100-300 µl), est mesurée pendant 30 min suivant leur administration. Dans certaines expériences, des antagonistes tel le BQ-123 (1 mg/kg) et le BQ-788 (0.25 mg/ml) sont administrés de façon intraventriculaire 5 min avant chaque agoniste. Dans d'autres expériences, des inhibiteurs tels le PR (5 mg/kg), le CGS 35066 (1 mg/kg) ou le TR (1 mg/kg) sont aussi administrés de façon intraventriculaire 5 min (phosphoramidon) ou 15 min (CGS 35066 et Thirophan) avant chaque agoniste.

Des échantillons de sang (1ml) prélevés, avant et 1, 2, 5, 10, 15 et 30 minutes suivant l'injection des drogues, sont recueillis dans du sodium citrate (3.5%) dans un ratio 9:1 (vol/vol). Les échantillons sont ensuite centrifugés 1 min à 15 000 g pour la séparation du plasma puis ce dernier est entreposé à -80°C jusqu'à utilisation. L'animal est finalement euthanasié avec une injection intraventriculaire (200 µl) d'Euthanyle (Bimeda-MTC, Cambridge).

2.2.4 Extraction plasmatique des endothélines

Les échantillons de plasma (400 µl) sont acidifiés au TFA 0.2% (400µl). Par la suite, ces échantillons sont purifiés sur une colonne Amprep C18 (100 mg) jetable (Amersham) activée au méthanol (1ml). Les molécules non-liées sont lavées de la colonne avec 4 ml de TFA 0.1% et éliminées. L'ET-1 immunoréactive est éluée avec 1.5 ml d'acétonitrile 60% et séchée par évaporation en utilisant un Savant Speed Vac Concentrator chauffé à 45°C (environ 2h30 d'évaporation). Les échantillons séchés sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Le rendement de l'extraction a été évalué en utilisant un échantillon composé de 50 uL de traceur ¹²⁵I-ET-3 (Amersham) et de 350 uL de plasma contrôle. Ainsi, le rendement de cette extraction, évalué à l'aide d'un compteur d'émission de type gamma (1470 Wizard Gamma Counter Wallac), se situe autour de 65% (i.e. 65% de la radioactivité est récupérée).

2.2.5 Dosage de l'ET-1(1-31) : E.I.A.

Le niveau d'ET-1(1-31) immunoréactive (ET-1(1-31)-ir) est mesuré à l'aide d'un kit de dosage sur phase solide, utilisant un système à double anticorps polyclonaux contre le peptide d'intérêt. Le tétra méthyl Benzidine (TMB) est utilisé comme agent colorant. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'ET-1(1-31) présent. Le kit provient de Phoenix Biotech et est utilisé selon le protocole fournit par la compagnie.

Les standards ainsi que le tampon de lavage sont dilués dans de l'eau déionisée. L'anticorps couplé à l'enzyme est reconstitué avec le diluant à anticorps du kit (solution PBS contenant 1% BSA et 0.05% Tween20). La solution servant de substrat est préparée extemporanément en ajoutant la solution de 0.01% H₂O₂ à la solution TMB (tablettes TMB + solution de phosphate). L'anticorps dirigé contre l'ET-1(1-31) a une réactivité croisée avec l'ET-1(1-31), big ET-1, ET-1, -2, -3 de 100%, 0.7%, < 0.1%, < 0.1% et < 0.1% respectivement. Une courbe standard pour l'ET-1(1-31) est effectuée aux concentrations suivantes : 0.78, 1.56, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 et 100 pg / mL.

Les puits de la plaque (96 puits) sont tout d'abord lavés avec la solution de lavage (solution PBS contenant 0.00125% Tween20). Par la suite, 100 µL du tampon de dosage est ajouté dans le puit désigné B0 (0 pg/mL Standard). Un volume de 100 µL de chaque échantillon de standard est prélevé et transféré dans les puits identifiés à cet effet. 100 µL de chaque échantillons sont ensuite ajoutés dans les puits appropriés. La plaque est scellée avec le papier scellant pour ensuite être incubée entre 18 et 24 heures à 4°C.

Étapes	Blanc	B0	Standards	Échantillons
Lavage	+	+	+	+
Tampon de dosage	100 µL	100 µL	---	---
Ajout du standard / échantillon	---	---	100 µL	100 µL
Incubation (18-24h; 4°C)	+	+	+	+
Aspiration + Lavage (7x)	+	+	+	+
Ajout de l'anticorps couplé	---	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation (30 min; 37°C)	+	+	+	+
Aspiration + Lavage (9x)	+	+	+	+
Ajout du substrat	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation (30 min; TP; noir)	+	+	+	+
Ajout de la solution stop	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Suite à cette incubation, les puits de la plaque sont lavés (sept fois) avec la solution de lavage puis 100 µL de la solution d'anticorps sont ajoutés dans chaque puit, sauf dans le blanc. La plaque est ensuite incubée 30 min à 37°C. Suite à cette deuxième incubation, la plaque est de nouveau lavée avec la solution de lavage (neuf fois) puis 100 µL de la solution de substrat (TMB), fraîchement préparée, sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite mise à incuber à température pièce dans le pendant 30 min. Finalement, 100 µL de la solution Stop sont ajoutés dans chaque puits. Les mesures de coloration doivent être prise 30 minutes suivant l'addition de la solution Stop. Les résultats de colorimétrie sont obtenus à l'aide d'un lecteur de plaque (µ Quant, Biotek Instruments, inc.) à une longueur d'onde de 450 nm.

La quantité d'ET-1(1-31)-ir contenue dans les échantillons est évaluée à partir de la courbe de standards.

2.2.6 ET-1 : dosage radioimmunologique (RIA)

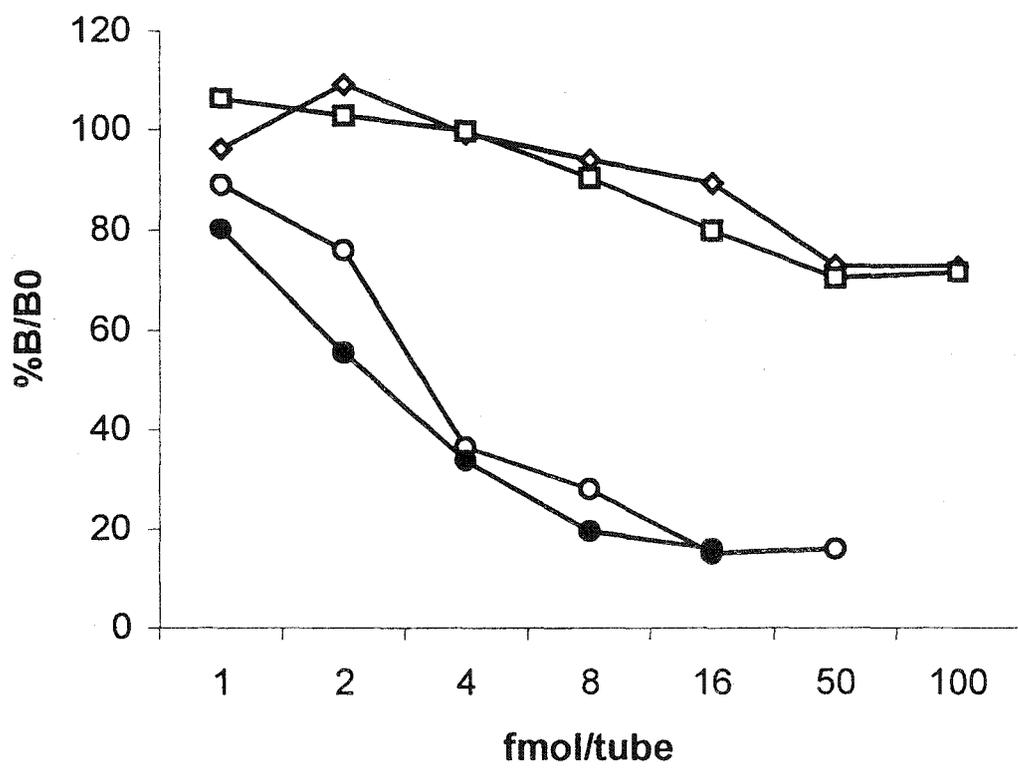
Cette approche consiste en une méthodologie modifiée à partir de Gratton *et al.* (1997).

Le niveau d'ET-1 immunoréactive (ET-ir) est mesuré à l'aide d'un dosage à double anticorps. Le kit provient de chez Amersham (RPA 555) et le dosage est effectué selon le protocole fourni par la compagnie.

Tous les constituants du kit sont dissous dans le tampon suivant : 0.02 M borate pH 7.4 contenant 0.1% d'azide de sodium. Les antisérums sont reconstitués dans 11 ml de la solution tampon, ce qui donne une liaison spécifique d'environ 50% avec son antigène. L'antisérum dirigé contre l'ET-1 possède une réactivité croisée avec les ET-1, -2, -3, de 100%, 144% et 52%, respectivement. La réactivité de cet antisérum avec la big ET-1 est de 0.4% et de moins de 0.0033% avec la big ET-1 (22-38) (Amersham), le BQ-788 et le BQ-123. L'ET-1(1-31) n'ayant pas été testé dans ce kit par la compagnie, nous avons déterminé le profil de réactivité croisée de l'ET-1(1-31) à l'aide d'une courbe de déplacement. Nous avons observé que l'ET-1(1-31) agissait similairement à la big ET-1 dans ce kit RIA (**Figure 10**). Les autres agents et solvants utilisés dans cette étude n'interfèrent pas avec l'antisérum utilisé jusqu'à une concentration de 100 pmol / tube.

Une courbe standard pour l'ET-1 est effectuée en duplicata aux concentrations suivantes : 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 et 16 fmol / mL. Des tubes de polystyrène sont identifiés et sont préparés en duplicata pour pouvoir compter la radioactivité totale (RT), la liaison non spécifique (LNS) et la liaison totale (B_0). Un volume de 100 μ l et de 50 μ l de la solution tampon est ajouté respectivement aux tubes LNS et B_0 . Un volume de 50 μ l de chacune des concentrations des solutions de standards et de chacun des échantillons à

Figure 10 Courbe de déplacement de la big ET-1 (\square), l'ET-1(1-31) (\diamond), l'ET-1 (\circ) et l'ET-3 du kit (\bullet) dans le kit RIA RPA555. B : coups par minute de l'échantillon ; B0 : coups par minute de la liaison totale.



doser est prélevé et transféré dans les tubes identifiés à cet effet. Par la suite, l'antisérum (50 μ l) est ajouté à chaque tube, sauf dans les tubes RT et LNS, puis les tubes sont mélangés et laissés à 4°C pendant 4h avant l'ajout du traceur radioactif (50 μ l) dans tous les tubes. Le traceur est le ^{125}I -ET-3, préparé afin d'obtenir l'équivalent d'environ 4000 cpm / 50 μ l.

Tubes Solutions	^{125}I totale	Liaison non-spécifique	Liaison totale	Standards	Échantillons
Tampon	---	100 μ l	50 μ l	---	---
Standard	---	---	---	50 μ l	---
Échantillon	---	---	---	---	50 μ l
Antisérum	---	---	50 μ l	50 μ l	50 μ l
^{125}I	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

Après agitation des tubes, ceux-ci sont laissés pour incubation de 16 à 24 heures à 4°C. Suite à l'incubation, 75 μ l du second anticorps (sérum d'ânes anti-lapin couplé à des particules de polymère magnétisé, Amerlex) sont ajoutés dans tous les tubes, sauf les tubes LT qui sont mis de côté pour le compte de la radioactivité. Les tubes sont ensuite laissés 10 min à la température de la pièce. La fraction liée à l'anticorps est séparée de façon magnétique utilisant un support Amerlex-M Separator. Les tubes sont placés dans le support afin que chacun soit en contact avec la base magnétique pour séparation durant 15 min à température de la pièce. Après la séparation, le surnageant est éliminé par inversion des tubes, qui sont fixés dans le support, et laissés en position inversée durant 5

min afin de permettre l'écoulement complet du surnageant. La quantité de radioactivité est déterminée avec un compteur d'émission de type gamma (1470 Wizard Gamma Counter Wallac).

La quantité d'ET-ir contenue dans les échantillons est évaluée à partir de la courbe de standards.

2.3 CALCULS ET ÉVALUATION STATISTIQUE DES DONNÉES

Tout les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur standard moyenne (SEM) pour un nombre varié d'expériences (n). Une analyse de la variance Anova pour les données pairées (ou non) suivit du test de Dunnet pour des comparaisons multiples est utilisé pour l'analyse statistique de variation en fonction d'une valeur basale (A vs B, A vs C, A vs D... A= valeur basale). Le test T de Student pour des données pairées (ou non) est utilisé pour évaluer des variations entre groupes (A vs B). Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme étant significative.

2.4 COMPOSÉS UTILISÉS

Les principaux composés pharmacologiques ou chimiques utilisés dans les diverses expériences sont exposés dans le **tableau VII**. On y retrouve leur nom ainsi que et leur provenance. Les concentrations molaires de ces composés ont été calculées à partir du poids moléculaire de la base.

Les peptides utilisés dans cette étude sont énumérés dans le **tableau VIII**. Ils y sont identifiés par leur nom et l'on y retrouve leur séquence en acides aminés. Les concentrations molaires des composés peptidiques ont été calculées à partir du poids

TABLEAU VII

Liste des composés pharmacologiques ou chimiques utilisés

Composé	Provenance
Héparine	Organon Teknika
Diméthyl Sulfoxide (DMSO)	Fischer
PBS	Sigma Chemicals
6-céto-prostaglandine F _{1α} (6-céto-PGF _{1α})	Cayman Chemicals
[³ H] 6-céto-PGF _{1α}	Amersham
6-céto-PGF _{1α} Antisérum	Sigma Chemicals
Thromboxane B ₂ (TxB ₂)	Cayman Chemicals
[³ H]TxB ₂	Amersham
TxB ₂ Antisérum	Sigma Chemicals
Trizma-Base	Sigma Chemicals
Trizma-Hcl	Sigma Chemicals
Charbon Activé	Sigma Chemicals
Dextran	Sigma Chemicals
Kétamine	MTC Pharmaceutical
Xylazine	Chemagro
Euthanyle	Bimeda-MTC
Citrate de sodium	Fischer
Acide Trifluoroacétique (TFA)	Sigma Chemical
Méthanol (MeOH)	Fischer
Acétonitrile	J.T. Baker
Essai ET-ir (RPA 555)	Amersham
Essai Big ET-1	Phoenix Biotech
Essai ET-1(1-31)	Phoenix Biotech

TABLEAU VIII

Liste des composés peptidiques, antagonistes et inhibiteurs utilisés

Peptides	Séquences / Formules chimiques	Provenance
big endothéline-1 humaine	NH ₂ -Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-Val-Asn-Trp-Thr-Pro-Glu-His-Val-Val-Pro-Tyr-Gly-Leu-Gly-Ser-Pro-Arg-Ser-COOH	American Peptide
endothéline-1(1-31) humaine	NH ₂ -Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-Val-Asn-Trp-Thr-Pro-Glu-His-Val-Val-Pro-COOH	Peptide International
endothéline-1 humaine	NH ₂ -Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH	American Peptide
BQ-123	Cyclo[D-Asp-L-Pro-D-val-L-Leu-D-Trp]	Peptide International
BQ-788	N, cis-2, 6-diméthylpiperidinocarbonyl-L-γ-Méthylleucyl-D-l-méthoxycarbonyltryptophanyl-D-norleucine	Peptide International
Phosphoramidon	N-(α-Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphinyl)-L-Tryptophan-Na	Peptide International
CGS 35066	(S)-3-Dibenzofuran-3-yl-2-[phosphonométhyl-amino] - propionic Acid	Novartis
Thiorphan	N-(2-mercaptométhyl)-1-oxo-3-phenylpropyl glycine	Sigma

moléculaire du sel. La big ET-1, ET-1, ET-2, ET-3 sont préparés dans une solution saline tamponnée avec du phosphate (PBS, pH 7.4) pour obtenir les solutions mères. L'ET-1(1-31), BQ-123 et le BQ-788 sont tout d'abord dissout dans le DMSO 100% puis dans le PBS pour une concentration finale de 5-10% DMSO. Les solutions mères sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Ces solutions sont diluées aux concentrations désirées avec la solution de PBS.

2.5 ÉTHIQUE

Le soin et l'utilisation des animaux et tous les protocoles de recherche sont conformes aux guides énoncés par le Conseil Canadien de Protection des Animaux et approuvés par le comité d'éthique sur la recherche animale de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke.

RÉSULTATS

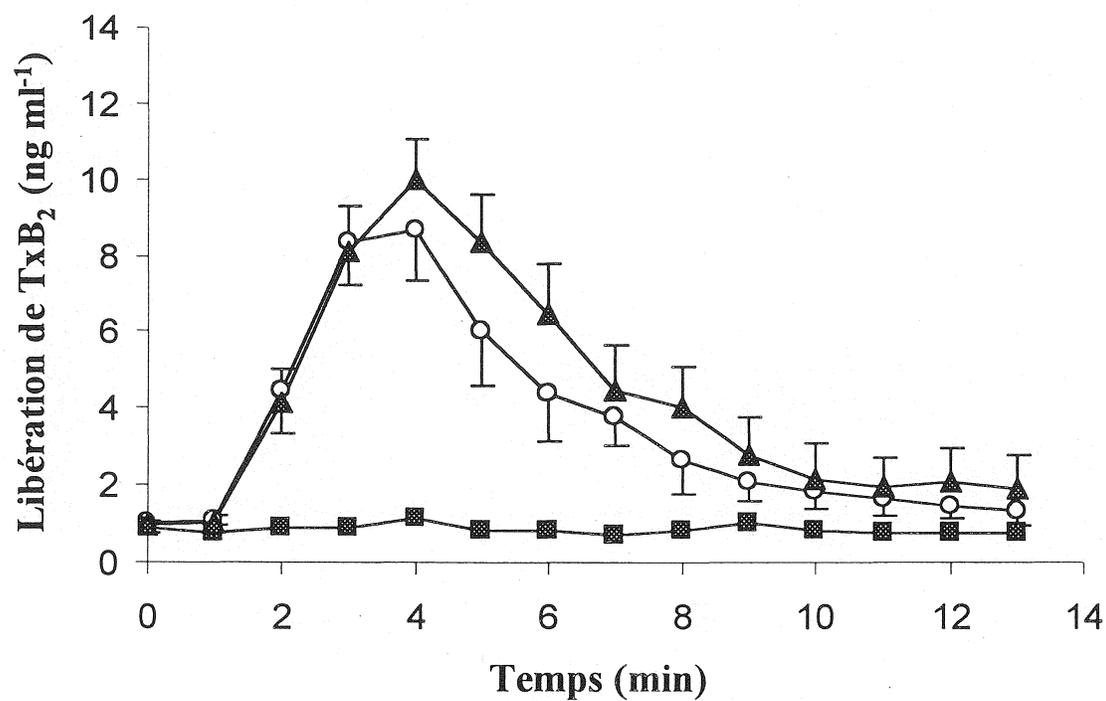
3.1 EFFET DE L'ET-1 ET DE L'ET-1(1-31) SUR LA LIBÉRATION D'EICOSANOÏDES DANS LE POUMON DE COBAYE ISOLÉ ET PERFUSÉ DE COBAYE

Afin de caractériser l'augmentation de la PIP provoquée par l'ET-1(1-31) chez le cobaye anesthésié, observée par HONORÉ *et al.* en 2002, nous avons étudié les effets de ce nouveau peptide dans le modèle du poumon de cobaye isolé et perfusé. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de l'ET-1(1-31) sur la libération d'eicosanoïdes (TxA₂ et PGI₂) dans ce modèle. Dans la pratique, nous avons dosé le TxB₂ et le 6-céto-PGI_{1α} car ceux-ci sont les produits de dégradation stables du TxA₂ et PGI₂, respectivement. Nous avons ensuite utilisé des antagonistes des récepteurs de l'endothéline (BQ-123 et BQ-788) ainsi qu'un inhibiteur de la NEP (thiorphan) afin de caractériser cette action de l'ET-1(1-31) dans le poumon de cobaye.

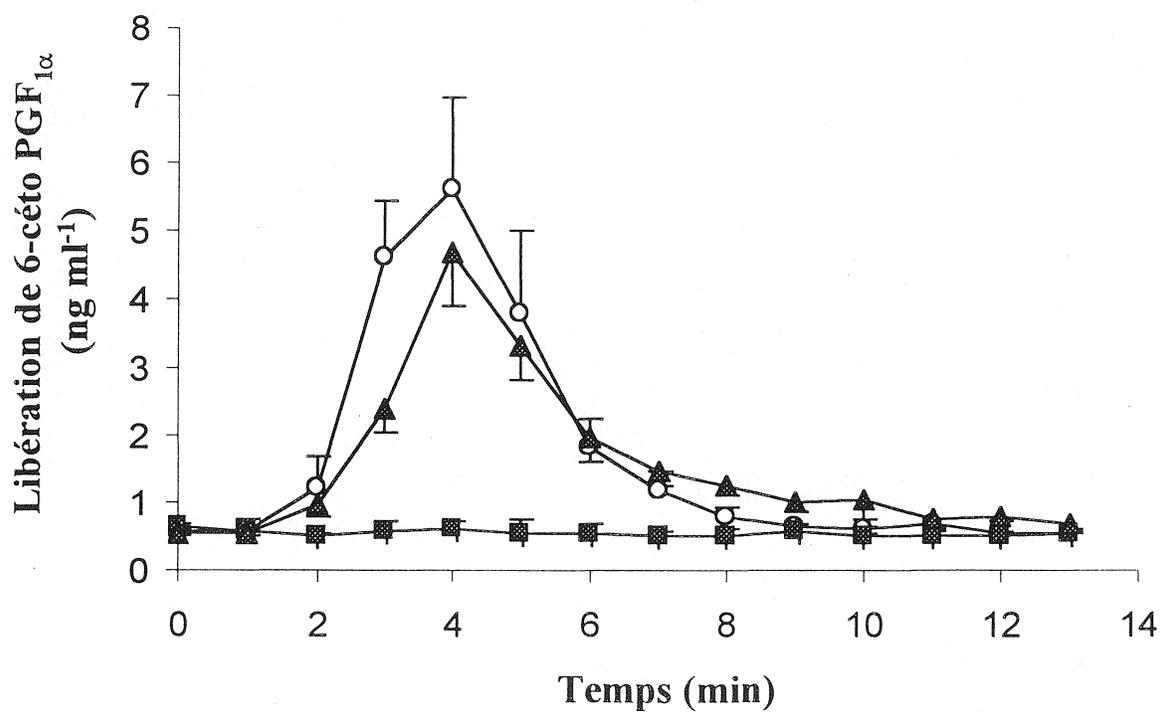
La figure 11 illustre le profil de la libération (ng/ml) du TxB₂ et du 6-céto-PGI_{1α} induit par l'ET-1 (5 nM) (libération maximale 8.7 ± 1.3 et 5.6 ± 1.4 ng/ml; n = 5) et l'ET-1(1-31) (50 nM) (libération maximale 10.0 ± 1.1 et 4.7 ± 0.7 ng/ml; n = 6) lorsqu'infusé (50 µl/min pendant 3 min) dans l'artère pulmonaire du poumon de cobaye isolé et perfusé. Nous observons que l'ET-1(1-31) est capable de stimuler la libération de TxB₂ et 6-céto-PGI_{1α} mais à une concentration dix fois plus élevée que celle de l'ET-1.

Figure 11 Profil de libération du TxB_2 (A) et du 6-céto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (B) induit par ET-1 (5 nM; \circ) et ET-1(1-31) (5 nM; \blacksquare et 50 nM; \blacktriangle) dans le poumon isolé et perfusé du cobaye. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins cinq expériences.

A)



B)



3.1.1 Effet des antagonistes BQ-788 et BQ-123 sur la libération d'eicosanoïdes induite par l'ET-1 et l'ET-1(1-31) dans le poumon de cobaye isolé et perfusé de cobaye

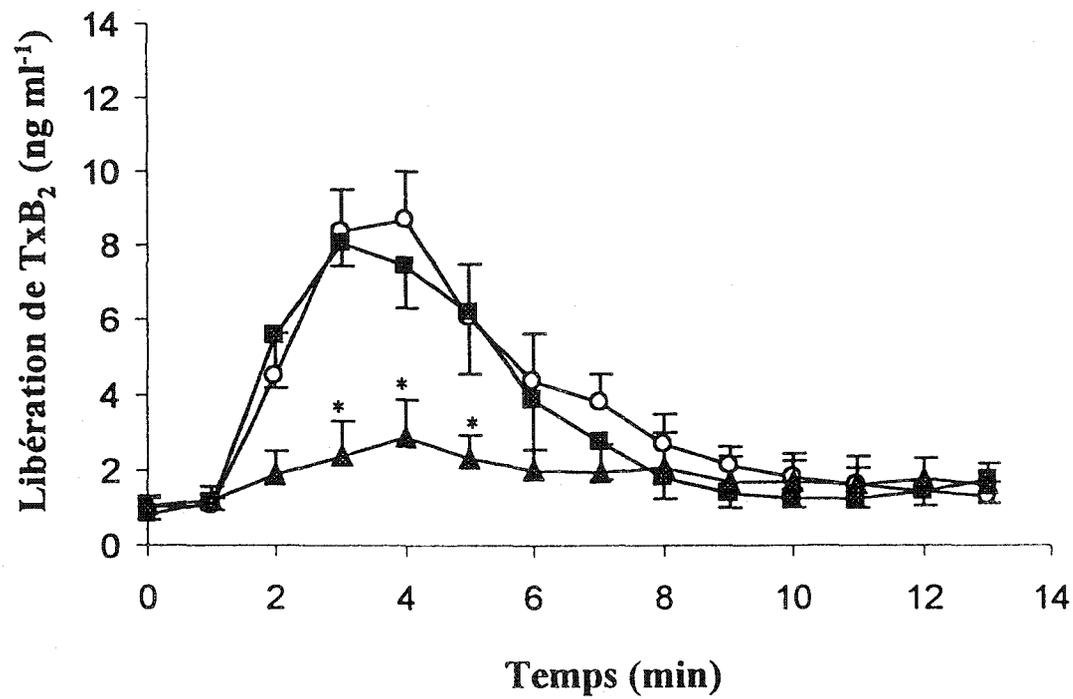
Dans une autre série d'expériences, le traitement du poumon perfusé de cobaye avec l'antagoniste sélectif du récepteur ET_B, BQ-788: 5 nM et 10 nM; 15 min, diminue significativement la libération de TxB₂ et de 6-céto-PGI_{1α} induite par l'ET-1 (libération maximale 2.9 ± 1.0 et 1.5 ± 0.2 , n = 5, BQ-788 à 5 nM) (Figure 12) et l'ET-1(1-31) (libération maximale 1.3 ± 0.3 et 0.9 ± 0.1 , n = 5, BQ-788 à 10 nM) (Figure 13). D'autre part, le traitement avec l'antagoniste sélectif du récepteur ET_A, BQ-123 (1 μM; 15 min), n'a aucun effet sur la libération d'eicosanoïdes par ces deux peptides.

3.1.2 Effet d'un inhibiteur enzymatique, le thiorphan sur la libération d'eicosanoïdes induite par l'ET-1 et l'ET-1(1-31) dans le poumon de cobaye isolé et perfusé de cobaye

Le traitement du poumon de cobaye perfusé avec le thiorphan (25 μM; 60 min), un inhibiteur de la NEP 24.11, abolit significativement la libération de TxB₂ (Figure 14A) et de 6-céto-PGI_{1α} (Figure 14B) induite par la big ET-1 (100 nM) (libération maximale 1.8 ± 0.5 et 0.8 ± 0.2 , n = 5) et l'ET-1(1-31) (50 nM) (libération maximale 1.9 ± 0.6 et 0.9 ± 0.1 , n = 5).

Figure 12 Libération de TxB_2 (A) et 6-céto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (B) induite par ET-1 (5 nM) en absence (\circ) et en présence de BQ-123 (1 μM ; \blacksquare) ou de BQ-788 (5 nM; \blacktriangle) dans le poumon isolé et perfusé du cobaye. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins cinq expériences. $*P < 0.05$ relatif à la valeur control en utilisant le test ANOVA suivit du Dunnett.

A)



B)

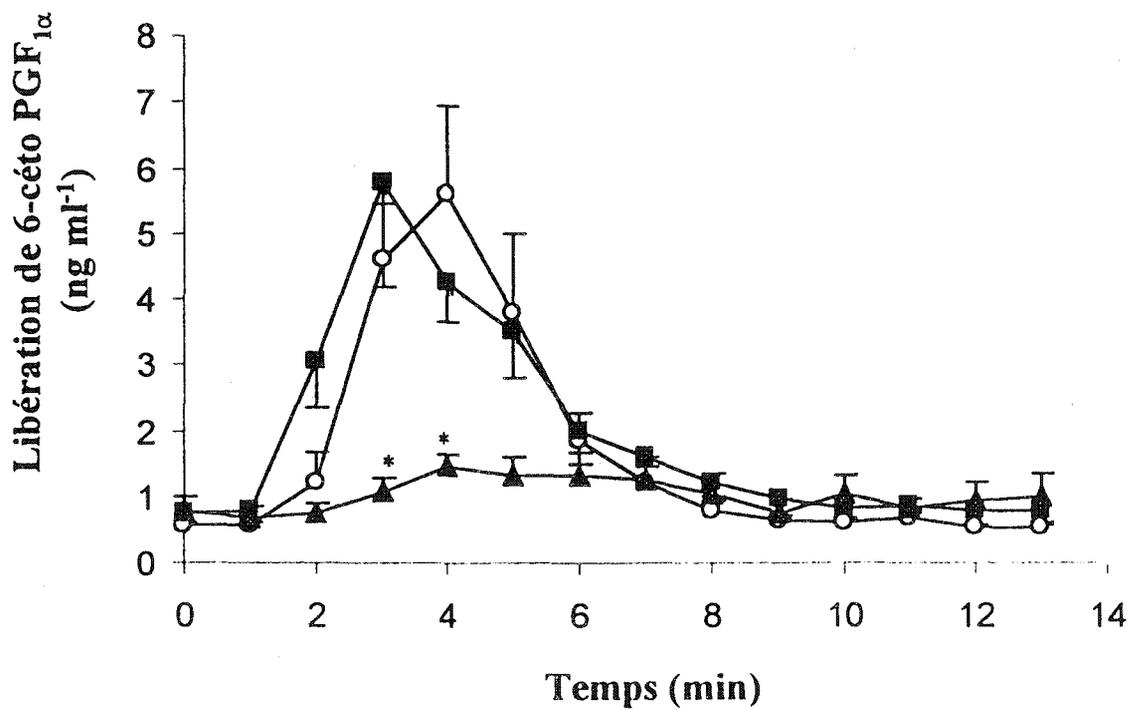
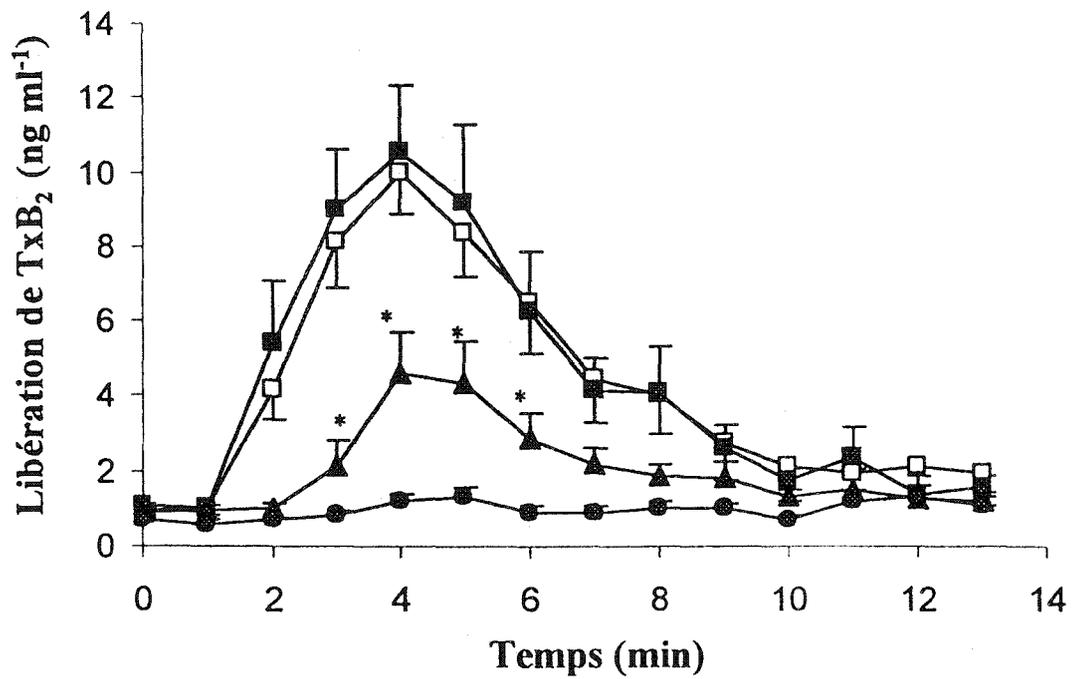


Figure 13 Libération de TxB_2 (A) et 6-céto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (B) induite par ET-1(1-31) (50 nM) en absence (\square) et en présence de BQ-123 (1 μM ; \blacksquare) ou de BQ-788 (5 nM; \blacktriangle et 10 nM \bullet) dans le poumon isolé et perfusé du cobaye. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins cinq expériences. $*P < 0.05$ relatif à la valeur control en utilisant le test ANOVA suivit du Dunnett.

A)



B)

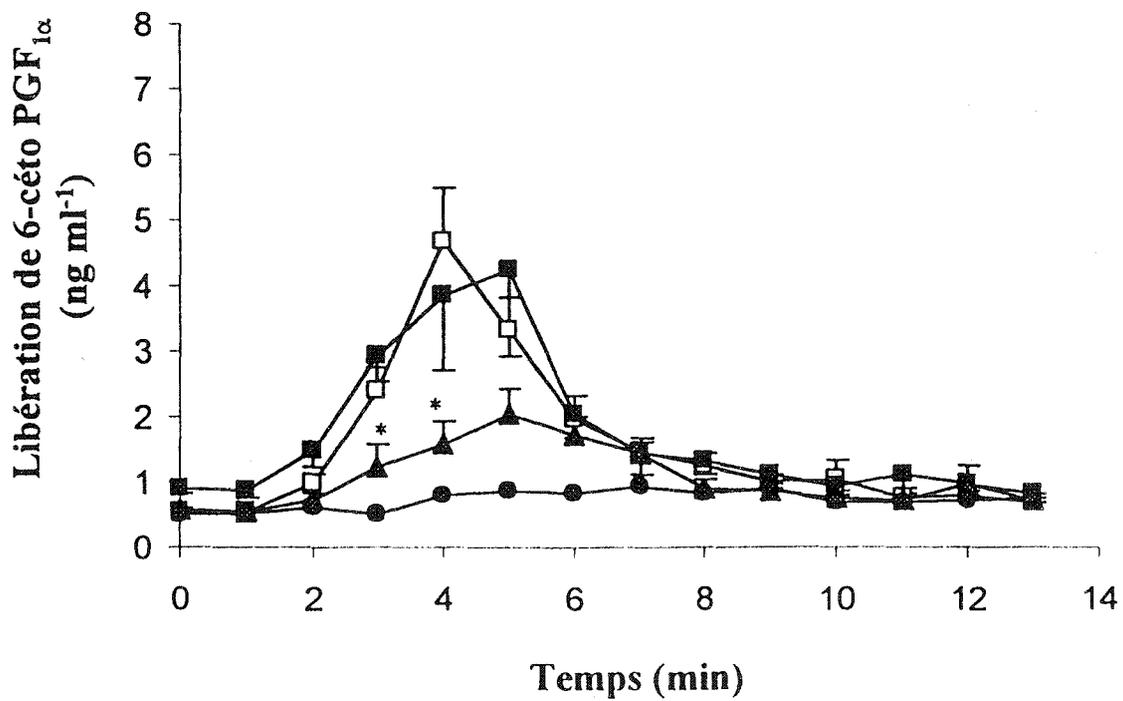
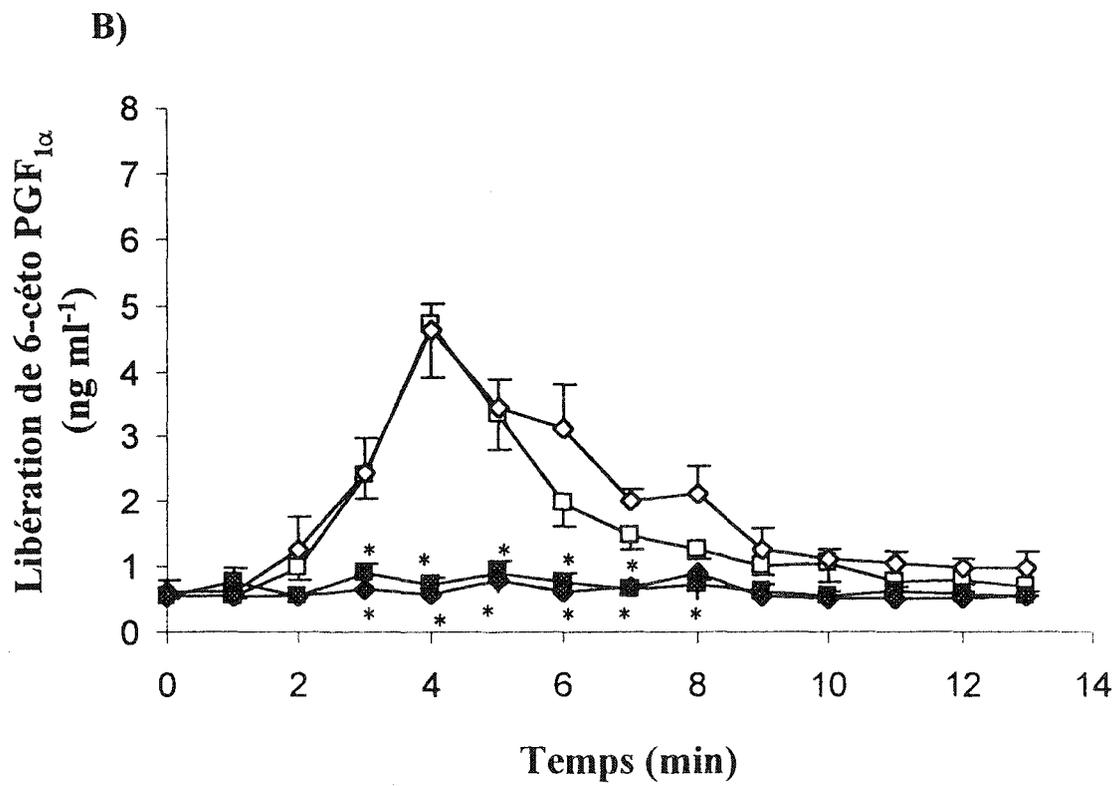
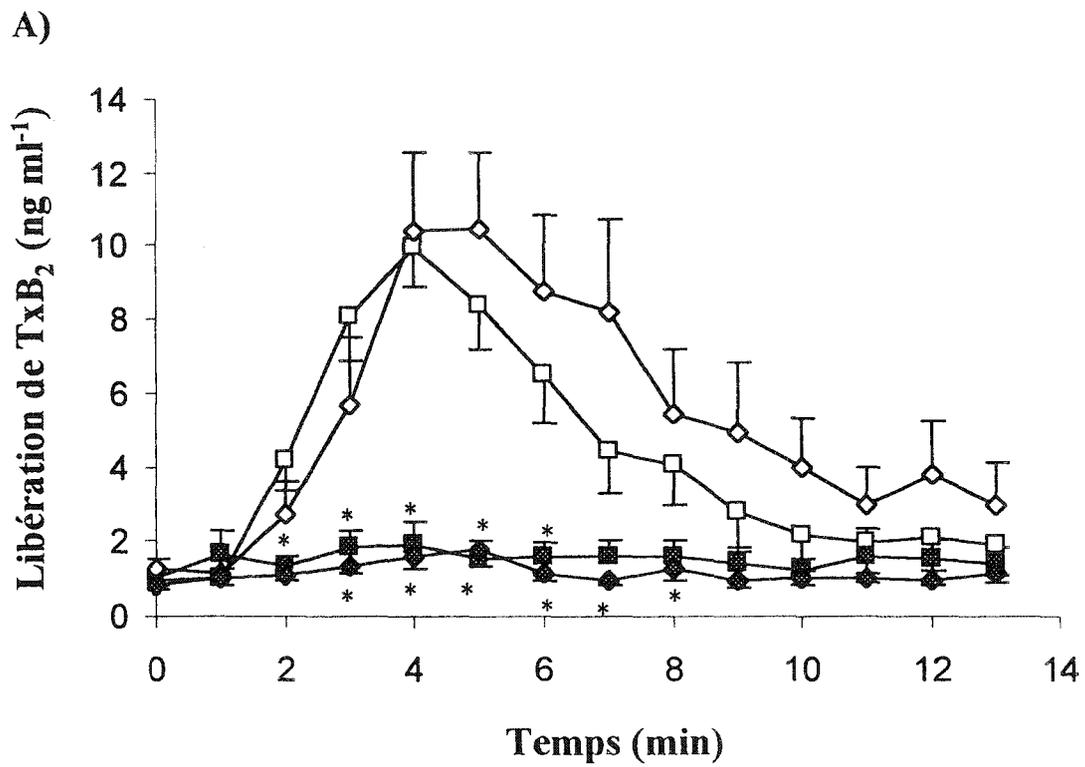


Figure 14 Libération de TxB_2 (A) et $\text{PGF}_{1\alpha}$ (B) induite par ET-1(1-31) (50 nM) en absence (\square) et en présence de thiorphan (25 μM ; \blacksquare), et par la big ET-1(100 nM) en absence (\diamond) et en présence de thiorphan (25 μM ; \blacklozenge) dans le poumon isolé et perfusé du cobaye. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard d'au moins cinq expériences. * $P < 0.05$ relatif à la valeur control en utilisant le test de t-Student.



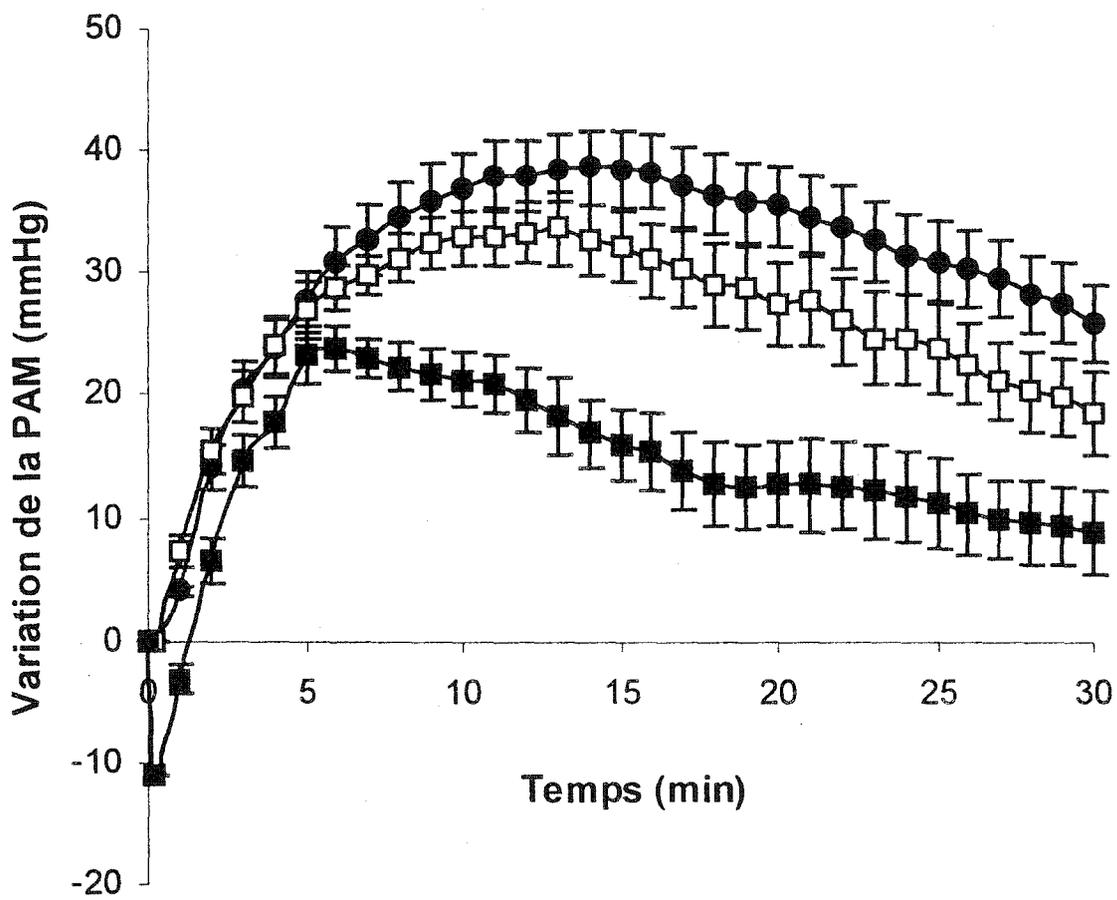
3.2 RÉPONSE HÉMODYNAMIQUE DE L'ET-1, LA BIG ET-1 ET DE L'ET-1(1-31) CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ

Afin d'évaluer et de caractériser les effets hémodynamiques ainsi que le métabolisme *in vivo* de l'ET-1(1-31), nous avons utilisé le modèle du lapin. Ainsi, nous avons étudié l'effet du ET-1(1-31) sur la PAM du lapin anesthésié. Nous avons ensuite utilisé des antagonistes des récepteurs de l'ET (BQ-123 et BQ-788) ainsi que des inhibiteurs de l'ECE et de la NEP (phosphoramidon, CGS 35066 et thiorphan) afin de caractériser cet effet hémodynamique. Finalement, nous avons étudié la métabolisation de l'ET-1(1-31) à l'aide de dosage plasmatique d'ET-1(1-31) et d'ET-1 afin de vérifier si l'ET-1(1-31) était converti en ET-1 *in vivo*.

Pour déterminer si l'ET-1(1-31) agissait comme un précurseur de l'ET-1, nous avons tout d'abord comparé le profil hémodynamique de l'ET-1(1-31) avec ceux de l'ET-1 et de la big ET-1, chez le lapin anesthésié.

La pression artérielle moyenne chez le lapin anesthésié est de 50.6 ± 3.5 mmHg ($n = 105$). L'administration intracardiaque d'ET-1 (0.25 nmol/kg) induit une réponse biphasique composée d'une phase dépressive (-11.0 ± 0.3 mmHg; $n = 6$), pendant la première minute suivant l'administration de l'ET-1, suivit d'une phase pressive soutenue (25.6 ± 4.7 mmHg; $n = 6$) (Figure 15). Contrairement à l'ET-1, la big ET-1 (1 nmol/kg) et l'ET-1(1-31) (1 nmol/kg) n'induisent qu'une phase pressive soutenue (monophasique) (37.3 ± 2.4 et 33.7 ± 3.4 mm Hg respectivement; $n = 10$ et $n = 5$ respectivement) (Figure 15). Nous observons donc que les profils hémodynamiques de la big ET-1 et de l'ET-1(1-31) à 1 nmol/kg sont similaires.

Figure 15 Cinétique de l'effet presseur provoquée par l'injection intra-cardiaque d'ET-1 (0.25 nmol/kg; ■), de big ET-1 (1 nmol/kg; ●) et d'ET-1(1-31) (1 nmol/kg; □) chez le lapin anesthésié. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins six expériences.



Les courbes doses-réponses de la big ET-1 (0.01 à 1 nmol/kg; $n \geq 4$) et de l'ET-1(1-31) (0.01 à 2.5 nmol/kg; $n \geq 4$) sont présentées à la **Figure 16**. La réponse pressive maximale de la big ET-1 et de l'ET-1(1-31) augmente en fonction de la dose injectée (i.e. effets presseurs dose-dépendantes).

3.2.1 Effet des antagonistes BQ-123 et BQ-788 sur la réponse hémodynamique de la big ET-1, l'ET-1(1-31) et l'ET-1) chez le lapin anesthésié

Dans une autre série d'expériences, nous avons voulu déterminer si l'ET-1(1-31) agissait via les deux types de récepteurs de l'endothéline.

Un prétraitement avec l'antagoniste du récepteur ET_A (BQ-123 :1 mg/kg intracardiaque), 5 minutes avant l'administration de la big ET-1 (1 nmol/kg) réduit significativement la phase pressive induite par l'injection de cet agoniste ($P < 0.05$; $n = 7$) (**Figure 17A**). Par contre, un prétraitement avec l'antagoniste du récepteur ET_B (BQ-788 : 0.25 nmol/kg intracardiaque) 5 min avant l'agoniste augmente la phase pressive ($P < 0.05$; $n = 8$) (**Figure 17A**).

Dans le cas de l'ET-1(1-31) (1 nmol/kg), et de façon similaire aux résultats obtenus avec la big ET-1, un prétraitement avec l'antagoniste du récepteur ET_A (BQ-123 : 1 mg/kg intra cardiaque) avant l'administration de ce peptide, réduit significativement la phase pressive ($P < 0.05$; $n = 8$) (**Figure 17B**). En revanche, un prétraitement avec l'antagoniste du récepteur ET_B (BQ-788 : 0.25 nmol/kg intracardiaque) augmente la phase pressive ($P < 0.05$; $n = 7$) (**Figure 17B**). Nous observons donc que les réponses pharmacologiques de l'ET-1(1-31), en absence et en présence d'antagonistes, sont similaires à celles rapportées par la big ET-1.

Figure 15 Cinétique de l'effet presseur provoquée par l'injection intra-cardiaque d'ET-1 (0.25 nmol/kg; ■), de big ET-1 (1 nmol/kg;●) et d'ET-1(1-31) (1 nmol/kg;□) chez le lapin anesthésié. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins six expériences.

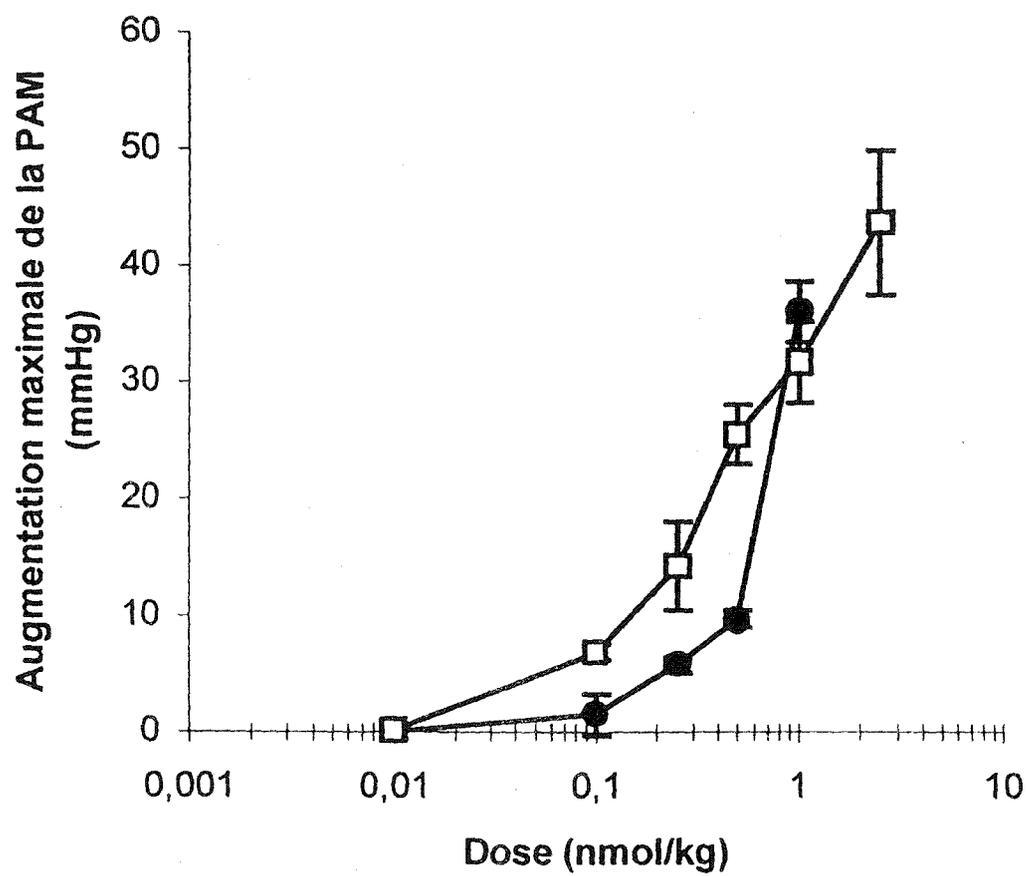
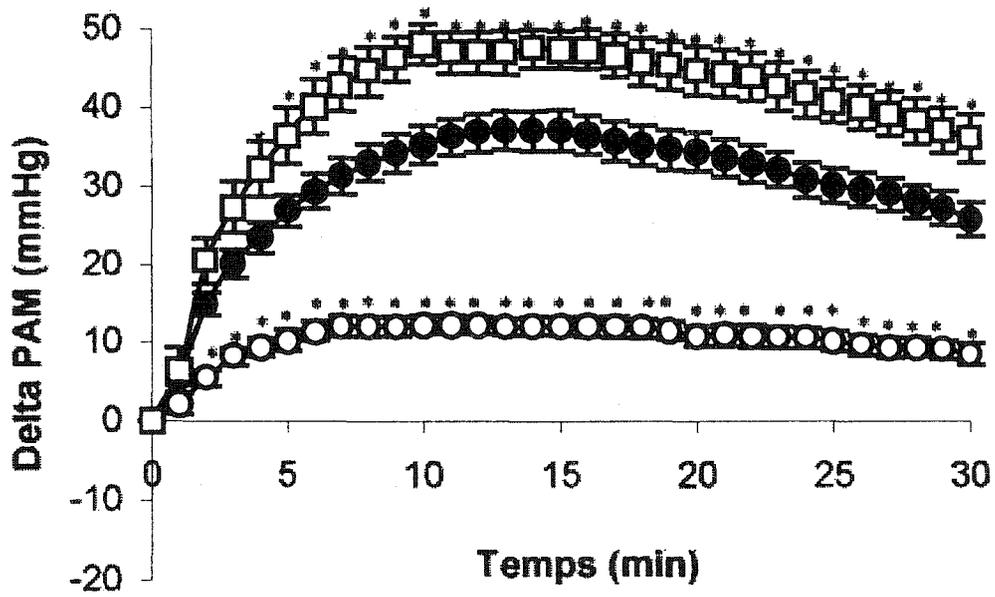
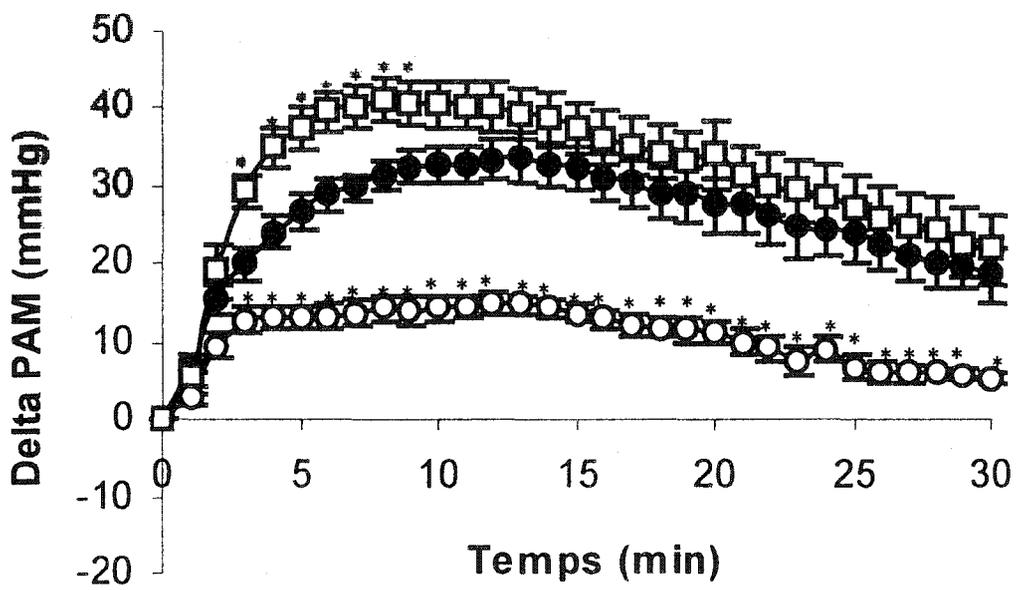


Figure 16 Courbes doses-réponses des augmentations maximales de la PAM provoquées par l'injection intra-cardiaque de big ET-1 (1 nmol/kg; □) et d'ET-1(1-31) (1 nmol/kg; ●) chez le lapin anesthésié. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins quatre expériences.

A)



B)



Par ailleurs, nous avons noté qu'un prétraitement avec l'antagoniste du récepteur ET_A (BQ-123 : 1 mg/kg intracardiaque) prolonge la phase dépressive et réduit significativement la phase pressive induite par l'administration d'ET-1 (0.25 nmol/kg) ($P < 0.05$; $n = 4$) (**Figure 18**). Cependant un prétraitement avec l'antagoniste du récepteur ET_B (BQ-788 : 0.25 nmol/kg intracardiaque) abolit la phase dépressive mais augmente la phase pressive ($P < 0.05$; $n = 4$) (**Figure 18**).

3.2.2 Effet des inhibiteurs phosphoramidon, CGS 35066 et thiorphan sur la réponse hémodynamique de la big ET-1, l'ET-1(1-31) et l'ET-1 chez le lapin anesthésié

Par la suite, dans le but d'évaluer si l'ET-1(1-31) nécessitait un clivage via l'ECE ou la NEP pour médier son action, nous avons utilisé divers inhibiteurs de ces enzymes en présence d'ET-1(1-31).

Un prétraitement avec le phosphoramidon (5 mg/kg intra cardiaque), un inhibiteur non spécifique de l'ECE et de la NEP, 5 minutes avant l'administration de la big ET-1, réduit significativement la phase pressive induite par cet agoniste (de 37.3 ± 2.4 à 3.7 ± 1.5 mmHg; $P < 0.05$; $n = 4$) (**Figure 19**). Un prétraitement avec le CGS 35066 (1 mg/kg intracardiaque; 15 min avant l'agoniste), un inhibiteur sélectif de l'ECE (JENG *et al.*, 2000), réduit significativement la phase pressive (de 37.3 ± 2.4 à 6.5 ± 1.9 mmHg; $P < 0.05$; $n = 4$) (**Figure 19**). Un prétraitement avec le thiorphan (1 mg/kg intracardiaque; 15 min avant l'agoniste), un inhibiteur spécifique de la NEP, réduit significativement mais de façon beaucoup moins importante la phase pressive qui suit l'injection de big ET-1 (de 37.3 ± 2.4 à 28.5 ± 1.9 mm Hg; $P < 0.05$; $n = 5$) (**Figure 19**). Ainsi, on observe

Figure 17 Cinétique de l'effet presseur provoqué par la big ET-1 (1 nmol/kg) (A) et l'ET-1(1-31) (1 nmol/kg) (B), en absence (●) ou en présence des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B, le BQ-123 (1 mg/kg; ○) et le BQ-788 (0.25 mg/kg; □) respectivement, chez le lapin anesthésié. Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins cinq expériences. * $P < 0.05$ relatif à la valeur control en utilisant le test ANOVA suivit du Dunnett.

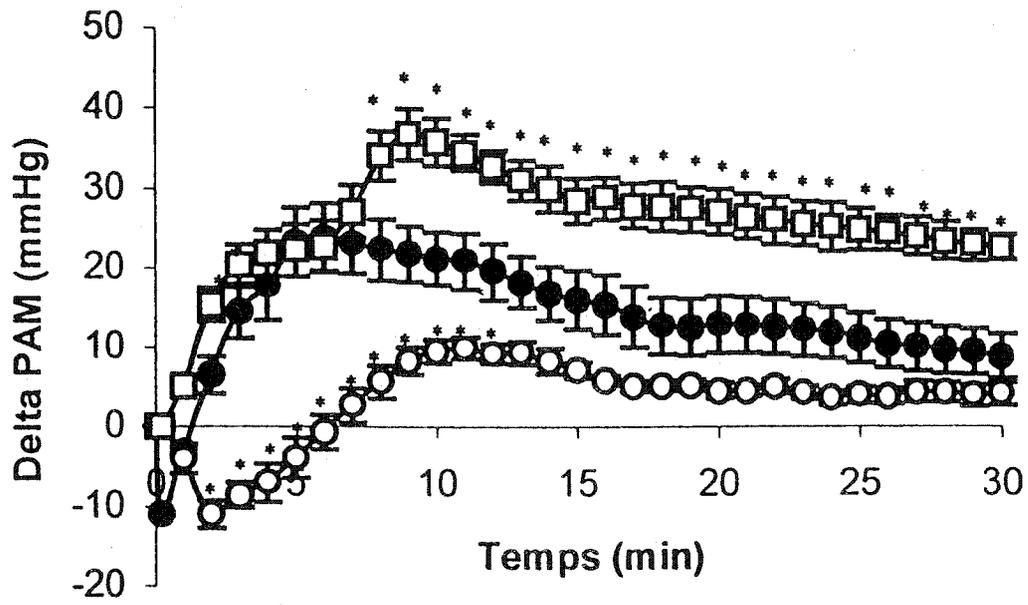
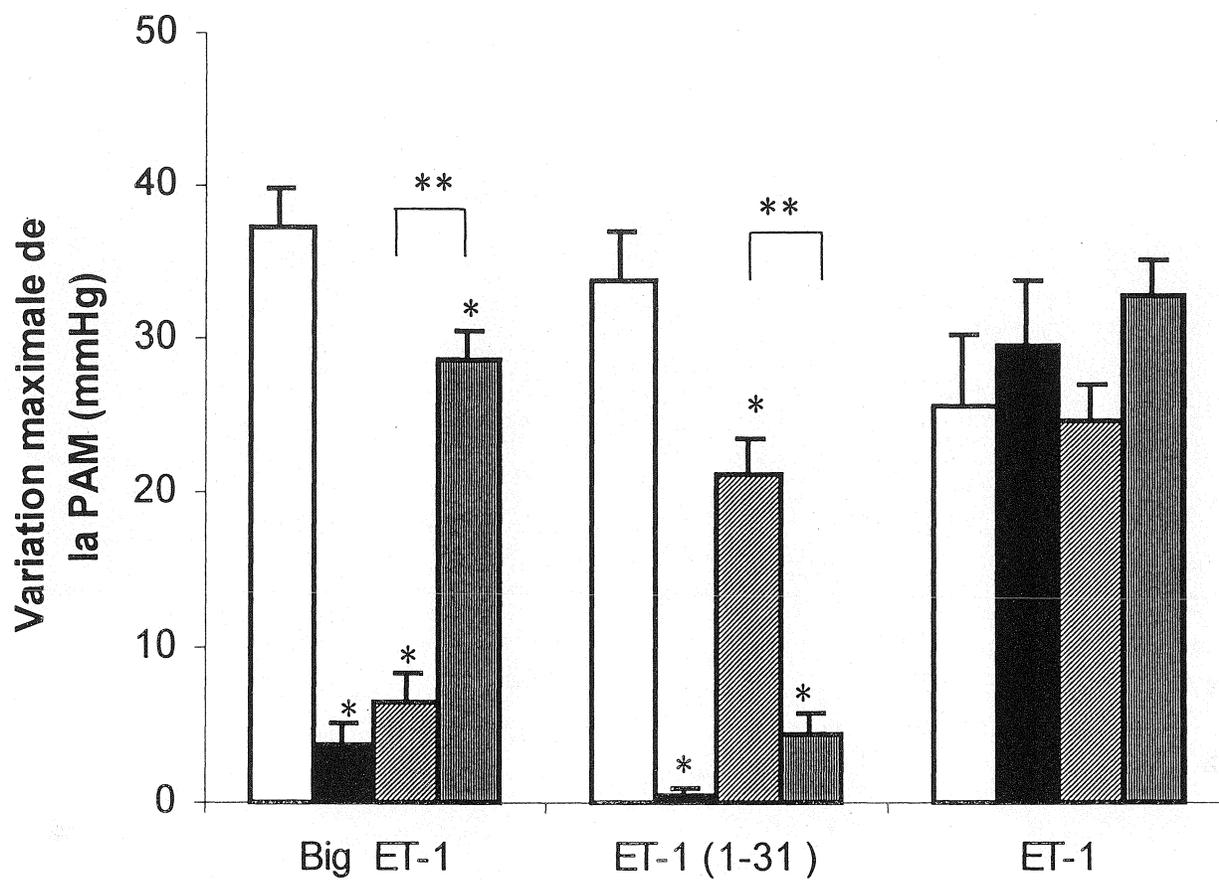


Figure 19 Effet du phosphoramidon (5 mg/kg; ■), du CGS 35066 (1 mg/kg; ▣) et du thiorphan (1 mg/kg; ▢) sur les variations maximales de la PAM provoquées par la big ET-1 (1 nmol/kg), l'ET-1(1-31) (1 nmol/kg) ou l'ET-1 (0.25 nmol/kg) (□) chez le lapin anesthésié. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins cinq expériences. * $P < 0.05$ relatif à la valeur control en utilisant le test ANOVA suivit du Dunnett. ** $P < 0.05$ relatif aux valeurs comparées en utilisant le test de t-Student.



que l'ECE semble jouer un rôle beaucoup plus important que la NEP, dans les effets hémodynamiques de la big ET-1.

Dans le cas de l'ET-1(1-31), un prétraitement avec le phosphoramidon (5 mg/kg intra cardiaque), abolit la phase pressive qui suit l'administration de cet agoniste (de 33.7 ± 3.4 à 0.5 ± 0.4 mmHg; $P < 0.05$; $n = 5$) (Figure 19). Un prétraitement avec le CGS 35066 (1 mg/kg intracardiaque) réduit significativement la phase pressive mais de façon beaucoup moins importante qu'avec le phosphoramidon (de 33.7 ± 3.4 à 21.1 ± 2.33 mm Hg; $P < 0.05$, $n = 4$) (Figure 19). Par contre, un prétraitement avec le thiorphan (1 mg/kg intracardiaque) réduit significativement la phase pressive et ce, de façon beaucoup plus efficace qu'avec le CGS 35066 (de 33.7 ± 3.4 à 4.4 ± 1.5 mmHg; $P < 0.05$, $n = 4$) (Figure 19). Dans le cas de l'ET-1(1-31), on note donc que la NEP semble jouer un rôle beaucoup plus important que l'ECE dans les effets hémodynamiques de ce peptide.

Les divers inhibiteurs utilisés dans cette étude (phosphoramidon, CGS 35066 et thiorphan) ne provoquent aucune variation significative de la réponse hémodynamique induite par l'ET-1 (Figure 19).

3.3 EFFET DE L'INJECTION INTRA CARDIAQUE D'ET-1(1-31) SUR LA PRÉSENCE PLASMATIQUE DE ET-1(1-31) ET D'ET-1 CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ

Afin de déterminer si l'ET-1(1-31) était bien métabolisé en ET-1 pour médier son action, nous avons effectué des dosages plasmatiques d'ET-1(1-31) et d'ET-1.

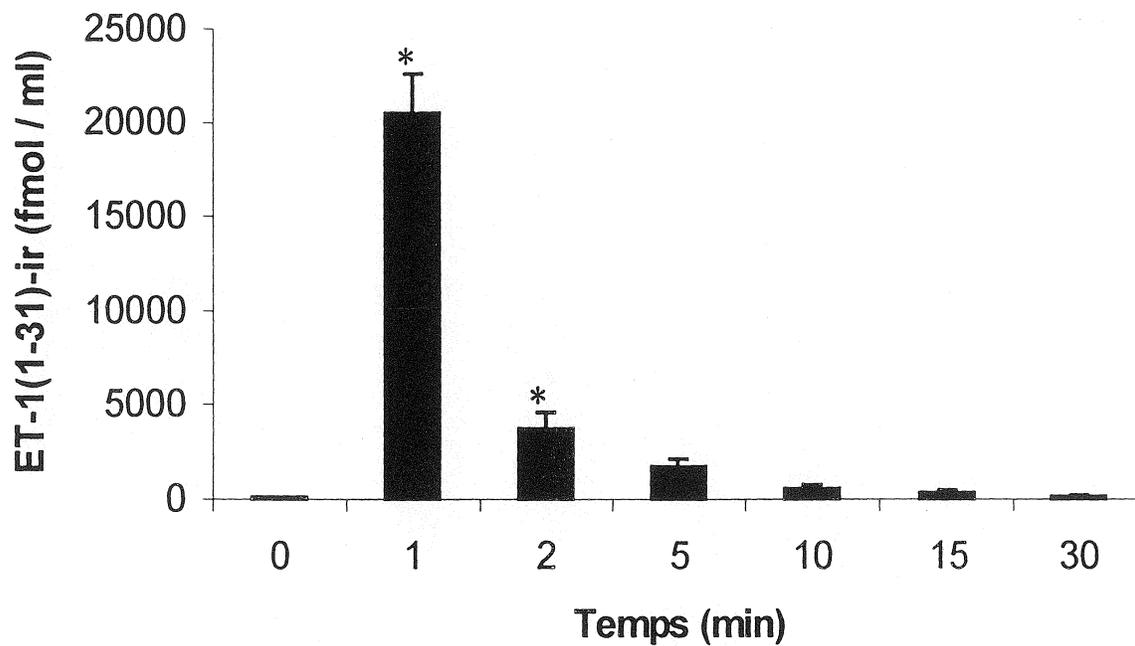
Ainsi, suite à l'injection intracardiaque d'ET-1(1-31), il y a une augmentation significative des concentrations d'ET-1(1-31) dans les échantillons sanguins prélevés

durant les 2 premières minutes suivant l'injection (de 91.5 ± 7 à 20481.9 ± 2076.5 pg/ml; 2 min : 3737.4 ± 851.5 pg/ml; $P < 0.05$, $n = 4$) (Figure 20). Cette concentration d'ET-1(1-31) diminue au fil du temps, jusqu'à revenir à la concentration retrouvée avant l'injection (5 min : 1717.35 ± 394.2 pg/ml; 10 min : 534.9 ± 161.9 pg/ml; 15 min : 330.8 ± 98.5 pg/ml; 30 min : 154.8 ± 28.15 ; $n = 4$) (Figure 20).

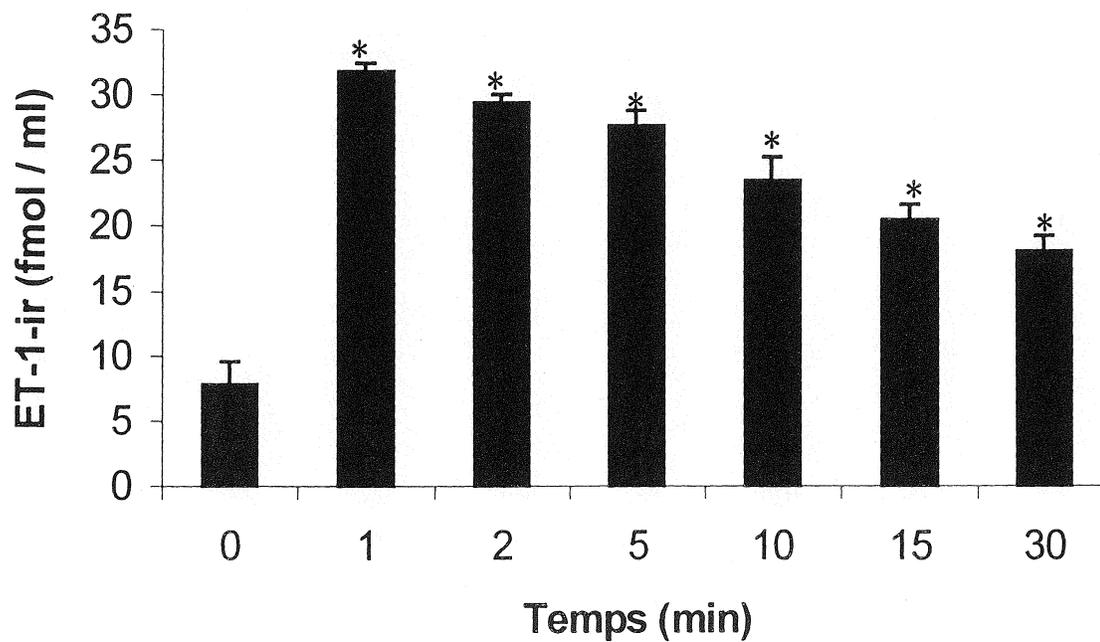
L'injection intracardiaque d'ET-1(1-31) provoque aussi en parallèle une augmentation significative des concentrations d'ET-1 dans les échantillons sanguins prélevés 1 minute après l'injection (de 7.8 ± 1.8 à 31.8 ± 0.6 fmol/tube; $P < 0.05$, $n = 5$) (Figure 20). Cette augmentation de la concentration d'ET-1 est significativement maintenue au fil du temps (2 min : 29.4 ± 0.6 fmol/tube, $P < 0.05$; 5 min : 27.6 ± 1.2 fmol/tube, $P < 0.05$; 10 min : 23.4 ± 1.8 fmol/tube, $P < 0.05$; 15 min : 20.4 ± 1.2 fmol/tube, $P < 0.05$; 30 min : 18.0 ± 1.2 , $P < 0.05$; $n = 5$) (Figure 20).

Figure 20 Effet de l'injection intracardiaque d'ET-1(1-31) (1 nmol/kg) sur la concentration plasmatique d'ET-1(1-31) (A) ou d'ET-1 (B) immunoréactif (ir), en fonction du temps, chez le lapin anesthésié. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'erreur standard moyenne d'au moins quatre expériences. T 0 = avant injection. *P < 0.05 relatif à la valeur T 0 en utilisant le test ANOVA suivit du Dunnett.

A)



B)



DISCUSSION

4.1 IMPLICATION DE L'ENDOPEPTIDASE NEUTRE 24.11 ET DU RÉCEPTEUR ET_B DANS LA LIBÉRATION D'EICOSANOÏDES INDUITE PAR L'ET-1(1-31) DANS LE POUMON DE COBAYE ISOLÉ ET PERFUSÉ

Dans les expériences *in vivo* de HONORÉ *et al.* (2002) chez le cobaye anesthésié, il avait été entre autre observé que l'ET-1(1-31), tout comme l'ET-1 et la big ET-1, provoquait une augmentation de la pression d'insufflation pulmonaire (PIP) suite à son injection systémique chez le cobaye anesthésié. De plus, il a été démontré que ces augmentations de la PIP étaient inhibées par l'indométhacine, un inhibiteur de la COX, ce qui suggérait une implication des eicosanoïdes dans ces effets. Des études antérieures dans notre laboratoire ont démontré que l'ET-1 ou la big ET-1 provoquait la libération d'eicosanoïdes lorsqu'ils étaient infusés, via l'artère pulmonaire, dans le poumon de cobaye isolé et perfusé (D'Orléans-Juste *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1999). Ainsi, il était intéressant de vérifier l'effet de l'ET-1(1-31) sur la libération d'eicosanoïdes dans ce modèle expérimental.

Dans une première série d'expériences, nous avons démontré que l'ET-1(1-31), comme l'ET-1, induit la libération de thromboxane A₂ et de prostacycline dans le poumon de cobaye perfusé, suggérant que l'ET-1 et l'ET-1(1-31) partage des propriétés pharmacologiques similaires dans cet organe. D'autre part, nous rapportons que l'ET-1(1-31) est moins puissant que l'ET-1 puisqu'il faut des concentrations dix fois plus élevées que celle de l'ET-1 pour observer un effet significatif de l'isoforme à 31 acides aminés, sur la libération d'eicosanoïdes.

Dans une deuxième série d'expériences, nous démontrons que la libération de thromboxane A_2 et de prostacycline survient uniquement via l'activation des récepteurs ET_B dans le poumon de cobaye par les deux agonistes (ET-1, ET-1(1-31)). Ces résultats confirment les résultats antérieurs d'une autre étude de notre laboratoire concernant la libération ET_B -dépendante de thromboxane A_2 dans ce modèle expérimental (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1994). De plus, nos résultats indiquent que l'ET-1(1-31) ne démontre pas une plus grande sélectivité pour le récepteur ET_A , puisque qu'il doit agir sur le récepteur ET_B pour induire la libération d'eicosanoïdes, ce qui n'est pas en accord avec les hypothèses rapportés dans certaines études qui avancent que l'ET-1(1-31) est un agoniste sélectif du récepteur ET_A (MAZZOCCHI *et al.*, 2000; REBUFFAT *et al.*, 2001).

Finalement, nous avons déterminé la contribution de la NEP 24.11 dans les propriétés pharmacologiques de l'ET-1(1-31) dans ce modèle expérimental. L'effet inhibiteur du thiorphan sur la libération d'eicosanoïdes stimulée par l'ET-1(1-31) suggère la production d'un métabolite bioactif de l'ET-1(1-31) généré par la NEP 24.11. De plus, la réponse de la big ET-1 est aussi inhibée par le thiorphan comme rapporté précédemment par LEBEL *et al.* (1996) dans leurs études effectuées sur des bandelettes de tissu parenchymateux de poumon de cobaye. Ainsi, la NEP régule l'action de l'ET-1(1-31) et de la big ET-1.

Nous pouvons ainsi suggérer que l'ET-1(1-31) nécessite un clivage enzymatique (via la NEP), générant ainsi de l'ET-1 qui agira via les récepteurs ET_B pour induire la libération d'eicosanoïdes. Ces résultats confirment ceux obtenus *in vivo* par HONORÉ *et*

al. (2002) qui avait observé une diminution importante de l'effet du ET-1(1-31) sur la PIP en présence de thiorphan.

Suite à cette étude, nous avons utilisé le modèle du lapin *in vivo* afin de continuer la caractérisation de ce nouveau peptide.

4.2 IMPLICATION DES RÉCEPTEURS ET_A ET ET_B AINSI QUE DES ENZYMES NEP 24.11 ET ECE DANS LES RÉPONSES HÉMODYNAMIQUES DE L'ET-1(1-31) CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ

Tout d'abord, nous avons vérifié si l'ET-1(1-31) agissait comme un précurseur lorsqu'il était injecté, de façon intracardiaque via la carotide, chez le lapin. Nous avons constaté que l'ET-1(1-31), tout comme la big ET-1 à la même dose, a un profil hémodynamique monophasique (vasoconstriction). L'ET-1 pour sa part a un profil biphasique (une phase de vasodilatation suivit d'une phase de vasoconstriction). Ainsi, l'ET-1(1-31) adopte un profil hémodynamique qui ressemble beaucoup plus à celui de la big ET-1 (un précurseur) qu'à celui de l'ET-1 (un métabolite actif). Les courbes doses-réponses de la big ET-1 et de l'ET-1(1-31) nous démontrent que ces peptides ont des effets vasoconstricteurs et ce, de façon dose-dépendante.

Par la suite, nous avons fait des études avec les antagonistes des récepteurs ET_A (BQ-123) et ET_B (BQ-788) afin de vérifier si l'ET-1(1-31) agissait via les deux récepteurs de l'endothéline. Ces études nous ont révélé que l'ET-1(1-31) agit, comme la big ET-1 et l'ET-1, via les deux récepteurs de l'endothéline puisque les antagonistes des deux récepteurs de l'ET affectent la réponse hémodynamique du ET-1(1-31) chez le lapin anesthésié. Ainsi, comme dans l'étude sur le poumon de cobaye perfusé, nous réfutons

l'hypothèse selon laquelle l'ET-1(1-31) serait un agoniste sélectif ET_A (MAZZOCHI *et al.*, 2000; REBUFFAT *et al.*, 2001). De plus, notre étude confirme d'autres travaux réalisés dans notre laboratoire, sur ce même modèle animal, qui mentionnent que le récepteur ET_B est impliqué dans les effets hypotenseurs des endothélines et le récepteur ET_A dans les effets vasoconstricteurs (GRATTON *et al.*, 1997, 2000). La différence de profil entre l'ET-1 (biphasique) et la big ET-1 (monophasique) s'expliquerait par le fait que l'ET-1 générée suite à la conversion de la big ET-1 n'active que peu ou pas les récepteurs ET_B vasodilatateurs (HALEEN *et al.*, 1993). De plus, les études de GRATTON *et al.* (1997, 2000) ont suggéré que l'absence d'effet hypotenseur de la big ET-1 est due à une conversion lente de celle-ci par l'ECE, mais aussi par une production insuffisante d'ET-1 pour activer massivement les récepteurs ET_B, même en présence d'un antagoniste ET_A. Il est à noter que la libération d'ET-1 par les cellules endothéliales se fait de façon polarisé. En effet, les cellules endothéliales produisent l'ET-1 mature (suite à la conversion de la big ET-1 par l'ECE) principalement du côté des cellules musculaires lisses vasculaires et non vers la lumière des vaisseaux (Davenport & Russell, 1999). L'ET-1 produite est ainsi plus facilement accessible aux récepteurs ET_A présents sur les cellules musculaires lisses (médié une vasoconstriction) qu'aux récepteurs ET_B présents sur les cellules endothéliales (médié une vasodilatation) (**Figure 8**). Expérimentalement, l'ET-1 injecté de façon systémique est donc tout d'abord accessible aux récepteurs ET_B des cellules endothéliales exposées à la lumière des vaisseaux sanguins (effet hypotenseur) et ensuite aux récepteurs ET_A des muscles lisses vasculaire (effet vasoconstricteur). Dans le cas de l'injection systémique de big ET-1, le lieu de conversion en ET-1 mature, face basolatérale des cellules endothéliales, facilite

l'accessibilité du peptide actif aux récepteurs ET_A (sur les muscles lisses), favorisant la vasoconstriction sur la vasodilatation dans les premières minutes suivant l'injection (masquant ainsi l'effet hypotenseur). Les résultats obtenus suite à l'injection systémique d'ET-1(1-31) nous laisse croire que celui-ci agirait par un mécanisme similaire à celui de la big ET-1 (et donc subirait un clivage du côté des cellules musculaires lisses).

Dans une autre série d'expériences, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques et non spécifiques de l'ECE et de la NEP (phosphoramidon, thiorphan et CGS 35066) afin de vérifier si l'ET-1(1-31) nécessitait un clivage en un métabolite pour effectuer son action vasoconstrictrice, comme démontré précédemment dans le cas de la big ET-1 (FUKURODA *et al.*, 1990; GRATTON *et al.*, 1997). Il a été démontré que le thiorphan, un inhibiteur spécifique de la NEP, est significativement plus efficace que le CGS 35066, un inhibiteur spécifique de l'ECE, pour inhiber l'effet du ET-1 (1-31), suggérant une contribution plus importante de la NEP que de l'ECE dans le mécanisme d'action du ET-1 (1-31). De plus, nous avons observé que l'ECE semble beaucoup plus importante que la NEP vis à vis les effets engendrés par la big ET-1. Ainsi, les résultats de ces expériences supportent l'hypothèse selon laquelle l'ET-1 (1-31) agit via la production d'un métabolite actif (HAYASAKI-KAJIWARA *et al.*, 1999). A noter que l'absence de sept acides aminés en C-terminal de la big ET-1 (pour produire de l'ET-1(1-31)) provoquerait une diminution de l'affinité pour l'ECE mais une augmentation de l'affinité dans le cas de la NEP. L'étude de OHNAKA *et al.* (1993) avait d'ailleurs démontré l'importance de la région C-terminale de la big ET-1 dans le processus de clivage par l'ECE. Ainsi, la NEP serait beaucoup moins importante que l'ECE dans la production d'ET-1 à partir de la big ET-1 *in vivo* chez le lapin anesthésié.

Finalement, nous avons fait des expériences de dosages plasmatiques afin de vérifier si l'injection intracardiaque d'ET-1(1-31) chez le lapin anesthésié se traduisait par le métabolisme de cette nouvelle molécule pour produire un peptide vasoactif, en occurrence l'ET-1. Des études réalisés dans notre laboratoire ont déjà démontré que la big ET-1 était métabolisée en ET-1 (augmentation des niveaux plasmatiques d'ET-1, sensible au phosphoramidon, suite à l'injection de big ET-1) afin de produire son effet vasoconstricteur chez le lapin anesthésié (GRATTON *et al.*, 1997; 2000). Cette même observation a été faite chez l'homme (PLUMPTON *et al.*, 1995). Nos résultats démontrent qu'il y a une augmentation de l'ET-1(1-31) dans le plasma sanguin suite à l'injection intracardiaque d'ET-1(1-31) et que ce peptide disparaît en fonction du temps par un processus de métabolisation (via l'ECE et la NEP pour produire de l'ET-1?), de dégradation (divers peptidase) ou d'élimination (lors de son passage au niveau d'organes tel le foie, le rein et le poumon). D'autre part, nous avons observé une augmentation de l'ET-1 dans le plasma sanguin suite à l'injection d'ET-1(1-31) immunoréactive. Cette augmentation d'ET-1 est probablement dû à la transformation de l'ET-1(1-31). L'ET-1(1-31) agirait donc en tant que précurseur, comme la big ET-1.

Ainsi, nous confirmons l'hypothèse selon laquelle l'ET-1(1-31) n'a pas d'action en lui-même mais agit plutôt via son métabolisme en ET-1, un peptide vasoactif qui agit sur les deux récepteurs de l'endothéline pour produire ses effets hémodynamiques chez le lapin anesthésié. Ces résultats représentent la deuxième étude *in vivo* avec l'ET-1(1-31) et démontrent enfin une nouvelle voie de biosynthèse de l'ET-1 (via l'ET-1(1-31)).

4.3 PERSPECTIVES

Pour faire suite à ces expériences, il serait pertinent de faire des études de dosages plasmatiques d'ET-1(1-31) et d'ET-1 suite à l'administration d'ET-1(1-31) en présence d'un inhibiteur de la NEP (phosphoramidon ou thiorphan). Ceci afin de vérifier, en un premier temps, si cet inhibiteur peut bloquer la disparition (ou métabolisme) de l'ET-1(1-31) dans le plasma, et en un deuxième temps s'il peut bloquer l'apparition d'ET-1 dans le plasma (métabolite de l'ET-1(1-31)). De plus, ces études permettraient de vérifier l'effet de la réactivité croisée de l'ET-1(1-31) pour le kit RIA de l'ET-1, sur nos résultats de dosages de l'ET-1 (comme il a été fait pour la big ET-1 dans l'étude de GRATTON et al., 1997). Ainsi, ces expériences renforceraient notre conclusion selon laquelle l'ET-1(1-31) est métabolisé en ET-1 *in vivo* via la NEP.

Nous avons observé dans notre étude que la spécificité pour l'ECE et la NEP n'était pas la même vis à vis la big ET-1 et l'ET-1(1-31). L'ECE est plus spécifique que la NEP pour la big ET-1 et vice versa dans le cas de l'ET-1(1-31). Il y a une différence de 7 acides aminés entre ces deux peptides. Il serait pertinent d'étudier les interactions des différentes endothélines avec l'ECE et la NEP (sur les sites d'action de ces enzymes). Pour ce faire, il existe des structures tridimensionnelles de ces différents peptides et protéines qui pourraient servir à cette étude d'interactions (big ET-1 : PETO *et al.*, 1996; ECE-1 : SAMSON *et al.*, 1998, BUR *et al.*, 2001; NEP : OEFNER *et al.*, 2000, Tiraboschi *et al.*, 1999).

Finalement, plusieurs études mentionnent que l'ET-1(1-31) serait potentiellement impliqué dans diverses maladies telles l'athérosclérose (NAKANO *et al.*, 1997; YOSHIZUMI *et al.*, 1999; NAGATA *et al.*, 2000) et l'asthme (GOLDIE *et al.*, 2000). Il

a d'ailleurs été démontré qu'il y a une présence accrue de la chymase dans ces maladies (HAMADA *et al.*, 1999; MITANI *et al.*, 1999). Il serait donc intéressant de faire des études sur l'ET-1(1-31) en condition pathologique en utilisant des modèles animaux tel le cobaye asthmatique ou le lapin athérosclérose. Nous pourrions ainsi vérifier l'implication de l'ET-1(1-31) dans ces conditions pathologiques afin d'élaborer des traitements plus efficaces pour ces maladies.

CONCLUSION

Les résultats présentés dans cette étude caractérisent *in vitro* (poumon de cobaye isolé et perfusé) et *in vivo* (lapin anesthésié; deuxième étude *in vivo* à ce jour avec ce nouveau peptide) les effets pharmacologiques de l'ET-1(1-31) et permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action de ce nouveau peptide de la famille des endothélines.

Nous avons tout d'abord constaté *in vitro*, dans le poumon de cobaye perfusé, que l'ET-1(1-31) induisait la libération d'eicosanoïdes via le récepteur ET_B. Nous avons aussi montré que la NEP régule l'action de l'ET-1(1-31) en le clivant en un métabolite actif (possiblement le ET-1).

Nous avons ensuite observé *in vivo*, chez le lapin anesthésié, que l'ET-1(1-31) induisait une vasoconstriction, similaire à celle de la big ET-1. De plus, nous avons démontré que l'ET-1(1-31) agit sur les deux récepteurs de l'endothéline et qu'il produit son action via sa conversion (principalement par la NEP et de façon moins importante par l'ECE) en un métabolite actif (potentiellement l'ET-1).

Finalement, nous avons démontré que l'ET-1(1-31) est métabolisé en ET-1 *in vivo* chez le lapin anesthésié. Ainsi, l'ET-1(1-31) agit via son métabolisme (par la NEP et

l'ECE) en ET-1, un peptide actif qui agit sur les deux récepteurs de l'endothéline pour produire ses effets.

Il existe maintenant deux voies de biosynthèse de l'ET-1 : une première passant directement de la big ET-1 en ET-1 via un clivage par l'ECE; et une seconde, récemment découverte, impliquant une nouvelle endothéline comme intermédiaire, l'ET-1(1-31), qui est clivé en ET-1 par la NEP et l'ECE.

Des études ultérieures *in vivo* et *in vitro* permettront d'établir le rôle de ce nouveau peptide de la famille des endothélines dans la physiologie du système cardiovasculaire, ainsi que son implication en conditions pathophysiologiques.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. D'Orléans-Juste pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il m'a donné l'occasion de travailler sur plusieurs projets et d'apprendre plusieurs techniques. Je le remercie aussi de m'avoir fait découvrir le côté international de la science par les divers congrès auxquels j'ai participé et les étudiants de d'autre pays que j'ai eu la chance de rencontrer.

Je désirerais remercier mes collègues de laboratoire: Jean-Claude Honoré, Martine Duval, Gabrielle Gendron, Isabelle Brochu, Émilie Carrier, Marie-Hélène Fecteau et Julie Labonté avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à collaborer et à discuter. Un merci spécial à Jean-Claude Honoré pour son aide, nos nombreuses discussions scientifiques et son amitié. Je remercie aussi les stagiaires « globe-trotter » qui m'ont fait voyager avec eux en pensée : Raphaël Faucard (France) et Biba (Brésil).

Je remercie les membres du département de pharmacologie, en particulier : Martin Montagne, Isabelle Renaud, Stephan Perron, Annie Larouche, Daniel Dion, Patrice Leclerc, Antony Boucard, Simon Sauvé et Dung Pham pour leur amitié et les merveilleux moments que nous avons passés ensemble.

Je voudrais aussi remercier mon frère, mon père, ma copine, ma « famille adoptive » ainsi que tous mes amis qui m'ont soutenus tout au long de mes études.

Finalement, je remercie le Dr. Lavigne, le Dr. Thorin ainsi que mon directeur de recherche le Dr. D'Orléans-Juste pour avoir accepté de corriger ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- ABASSI, Z.A., GOLOMB, E., BRIDENBAUGH, R. & KEISER, H.R. (1993)
Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase
EC.3.4.24.11. *Br J Pharmacol.* **109(4)**:1024-8
- ABDEL LATIF, A.A., ZHANG, Y. & YOUSUFZAI, S.Y. (1991) Endothelin-1
stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandins in rabbit iris sphincter
smooth muscle : activation of phospholipase A2. *Curr. Eye Res.* **10** :259-265
- AMES, R.S., SARAU, H.M., CHAMBERS, J.K., WILLETTE, R.N., AIYAR, N.V.,
ROMANIC, A.M., LOUDEN, C.S., FOLEY, J.J., SAUERMECH, C.F., COATNEY,
R.W., AO, Z., DISA, J., HOLMES, S.D., STADEL, J.M., MARTIN, J.D., LIU, W.S.,
GLOVER, G.I., WILSON, S., MCNULTY, D.E., ELLIS, C.E., ELSHOURBAGY,
N.A., SHABON, U., TRILL, J.J., HAY, D.W. & DOUGLAS, S.A. (1999) Human
urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14.
Nature **401(6750)**:282-6
- ANDO, K., HIRATA, Y., SHICHIRI, M., EMORI, T. & MARUMO, F. (1989) Presence
of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Letters* **245(1-2)**:164-6
- ANONYMOUS (1988) Similarity of endothelin to snake venom toxin. *Nature*
335(6188):303
- ARAI, H., HORI, S., ARAMORI, I., OHKUBO, H. & NAKANISHI, S. (1990) Cloning
and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348(6303)**:730-2

- AZARANI, A., BOILEAU, G. & CRINE, P. (1998) Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Biochemical Journal* **333** (Pt 2):439-48
- BARNES, K., WALKDEN, B.J., WILKINSON, T.C. & TURNER, A.J. (1997) Expression of endothelin-converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its localization in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. **68**(2):570-7
- BARNES, K. & TURNER, A.J. (1999) Endothelin converting enzyme is located on alpha-actin filaments in smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. **42**(3):814-22
- BENCHEKROUN, M.T., GROS-LOUIS, N., BKAILY, G. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1995) R-type calcium channel involved in endothelin-1-induced contraction of rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* **26 Suppl 3**:S300-2
- BENCHETRIT, T., BISSERY, V., MORNON, J.P., DEVAULT, A., CRINE, P. & ROQUES, B.P. (1988) Primary structure homologies between two zinc metallopeptidases, the neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase") and thermolysin, through clustering analysis. *Biochemistry*. **27**(2):592-6
- BENIGNI, A. & REMUZZI, G. (1999) Endothelin antagonist. *The Lancet* **353** : 133-138
- BERTHIAUME, N., CLAING, A., YANO, M. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1995) Characterization of receptors for endothelins in the guinea pig mesenteric vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* **Suppl 3**:S317-9

BERTHIAUME, N., YANAGISAWA, M., LABONTE, J. & D'ORLEANS-JUSTE, P.

(2000) Heterozygous knock-Out of ET(B) receptors induces BQ-123-sensitive hypertension in the mouse. *Hypertension* **36(6)**:1002-7

BLAIS, V., FUGERE, M., DENAULT, J.B., KLARSKOV, K., DAY, R. & LEDUC, R.

(2002) Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett* **524(1-3)** :43-48

BLOCH, K.D., EDDY, R.L., SHOWS, T.B. & QUERTERMOUS, T. (1989) cDNA

cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J. Biol. Chem.* **264** : 18156-18161

BOTTING, R.M. & VANE, J.R. (1990) Endothelins : potent releasers of prostacyclin and

EDRF. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **42** :203-218

BREMNES, T., PAASCHE, J.D., MEHLUM, A., SANDBERG, C., BREMNES, B.,

ATTRAMADAL, H. (2000) Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* **275(23)**:17596-604

BRUNET, F. & DOHERTY, A.M. (1996) Role of ET(B) receptors in local clearance

of endothelin-1 in rat heart: studies with the antagonists PD 155080 and BQ-788. *FEBS Lett.* **396(2-3)**:238-42.

BUR, D., DALE, G.E. & OEFNER C. (2001) A three-dimensional model of endothelin-

converting enzyme (ECE) based on the X-ray structure of neutral endopeptidase 24.11 (NEP). *Protein Engineering* **14(5)** : 337-341

- CADE, C., LUMMA, W.C., Jr., MOHAN, R., RUBANYI, G.M. & PARKER-BOTELHO, L.H. (1990) Lack of biological activity of preproendothelin [110-130] in several endothelin assays. *Life Sciences*. **47(23)**:2097-103
- CALO, G., GRATTON, J.P., TÉLÉMAQUE, S. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1996) Pharmacology of endothelins: vascular preparations for studying ETA and ETB receptors. *Mol Cell Biochem*. **154(1)**:31-7
- CLOZEL, M., BREU, V., BURRI, K., CASSAL, J.M., FISCHLI, W., GRAY, G.A., HIRTH, G., LOFFLER, B.M., MULLER, M. & NEIDHART, W. (1993) Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature*. **365(6448)**:759-61
- CLOZEL, M., BREU, V., GRAY, G.A., KALINA, B., LOFFLER, B.M., BURRI, K., CASSAL, J.M., HIRTH, G., MULLER, M. & NEIDHART, W. (1994) Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **270(1)**:228-35
- CODY, W.L., DOHERTY, A.M., HE, J.Z., *et al.* (1992) Design of a functional hexapeptide antagonist of endothelin. *J. Med. Chem.* **35** :3301-3303
- CORDER, R., DOUTHWAITE, J.A., LEES, D.M., KHAN, N.Q., VISEU, DOS SANTOS, A.C., WOOD, E.G. & CARRIER, M.J. (2001) Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*. **414(6866)**:863-4

- CUI, P., TANI, K., KITAMURA, H., OKUMURA, Y., YANO, M., INUI, D., TAMAKI, T., SONE, S. & KIDO, H. (2001) A novel bioactive 31-amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **70(2)** :306-12
- DAI, J., SHEN, R., SUMITOMO, M., GOLDBERG, J.S., GENG, Y., NAVARRO, D., XU, S., KOUTCHER, J.A., GARZOTTO, M., POWELL, C.T. & NANUS, D.M. (2001) Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **7(5)**:1370-7
- DASGUPTA, F., MUKHERJEE, A.K. & GANGADHAR, N. (2002) Endothelin receptor antagonists : an overview. *Curr. Med. Chem.* **9(5)** :549-75
- DE LOMBAERT, S., GHAI, R.D., JENG, A.Y., TRAPANI, A.J., & WEBB, R.L. 1994. Pharmacological profile of a non-peptidic dual inhibitor of neutral endopeptidase 24.11 and endothelin-converting enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 407-412.
- DE LOMBAERT, S., BLANCHARD, L., STAMFORD, L.B., TAN, J., WALLACE, E.M., SATOH, Y., FITT, J., HOYER, D., SIMONSBERGEN, D., MOLITERNI, J., MARCOPOULOS, N., SAVAGE, P., CHOU, M., TRAPANI, A.J. & JENG, A.Y. (2000) Potent and selective non-peptidic inhibitors of endothelin-converting enzyme-1 with sustained duration of action. *J Med Chem* **43(3)** : 488-504
- DE MEY, J.G. & VANHOUTTE P.M. (1982) Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall importance of the endothelium. *Circ Res* **57(4)** :439-47

- DE NUCCI, G., THOMAS, R., D'ORLÉANS-JUSTE, P., ANTUNES, E., WALDER, C., WARNER, T.D. & VANE, J.R. (1988a) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85(24)**:9797-800
- DE NUCCI G, GRYGLEWSKI RJ, WARNER TD & VANE JR. (1988b) Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85(7)**:2334-8.
- DEVAULT, A., LAZURE, C., NAULT, C., LEMOUAL, H., SEIDAH, N.G., CHRÉTIEN, M., KAHN, P., POWELL, J., MALLET, J., BEAUMONT, A, *et al.* (1987) Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) deduced from complementary DNA. *EMBO J* **6** :1317-1322
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., LIDBURY, P.S., WARNER, T.D. & VANE, J.R. (1990) Intravascular big endothelin increases circulating levels of endothelin-1 and prostanoids in the rabbit. *Biochem Pharmacol* **39(9)**:R21-2
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., LIDBURY, P.S., TELEMAQUE, S., WARNER, T.D. & VANE, J.R. (1991a) Human big endothelin releases prostacyclin in vivo and in vitro through a phosphoramidon-sensitive conversion to endothelin-1. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. **17 Suppl 7**:S251-5
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., TELEMAQUE, S. & CLAING, A. (1991b) Different pharmacological profiles of big-endothelin-3 and big-endothelin-1 in vivo and in vitro. *British Journal of Pharmacology*. **104(2)**:440-4

- D'ORLÉANS-JUSTE, P., YANO, M. & TÉLÉMAQUE, S. (1993) ETA-dependent pressor effects and release of prostacyclin induced by endothelins in pulmonary and renal vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* **Suppl 8**:S235-8
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., CLAING, A., TÉLÉMAQUE, S., MAURICE, M.C., YANO, M. & GRATTON, J.P. (1994) Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A₂ from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ETB receptor antagonist, BQ-788. *Br J Pharmacol* **113(4)**:1257-62
- DOUGLAS, S.A., BECK, G.R. Jr, ELIOTT, J.D. & OHLSTEIN, E.H. (1995) Pharmacologic evidence for the presence of three functional endothelin receptor subtypes in rabbit saphenous vein. *J. Cardiovasc Pharmacol.* **26 Suppl 3**:S163-8.
- DUPUIS, J., GORESKY, C.A. & FOURNIER, A. (1996) Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol.* **81(4)**:1510-5.
- DUVAL, M. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2000) Endothelin-1 induces an endothelin-A-receptor-dependent and L-NAME-sensitive vasoconstriction in the isolated perfused guinea-pig kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* **36(5 Suppl 1)**:S241-3
- EL-MOWAFY, A.M. & WHITE, R.E. (1999) Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Letters.* **451(1)**:63-7

- EMOTO, N., & YANAGISAWA, M. (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem.* **270(25)**:15262-8.
- FERREIRA, S.H., MONCADA, S. & VANE, J.R. (1971) Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature - New Biology* **231(25)**:237-9
- FERREIRA, S.H., MONCADA, S. & VANE, J.R. (1973) Further experiments to establish that the analgesic action of aspirin-like drugs depends on the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *British Journal of Pharmacology.* **47(3)**:629P-630P
- FERREIRA, S.H., MONCADA, S. & VANE, J.R. (1973) Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *British Journal of Pharmacology.* **49(1)**:86-97
- FERRO, C.J. & WEBB, D.J. (1996) The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine. *Drugs* **51(1)**:12-27.
- FERRO, C.J., SPRATT, J.C., HAYNES, W.G. & WEBB, D.J. (1998) Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels in vivo. *Circulation* **97 (23)** :2323-30
- FILEP, J.G., ROUSSEAU, A., FOURNIER, A. & SIROIS, P. (1992) Structure-activity relationship of analogues of endothelin-1 : dissociation of hypotensive and pressor actions. *Eur J Pharmacol* **220(2-3)** :263-6

- FORGET, M.A., LEBEL, N., SIROIS, P., BOULANGER, Y. & FOURNIER, A. (1996) Biological and molecular analyses of structurally reduced analogues of endothelin-1. *Mol Pharmacol* **49(6)**:1071-9
- FOZARD, J.R. & PART, M.L. (1992) The role of nitric oxide in the regional vasodilator effects of endothelin-1 in the rat. *Br J Pharmacol* **105(3)**:744-50
- FUKURODA, T., NOGUCHI, K., TSUCHIDA, S., NISHIKIBE, M., IKEMOTO, F., OKADA, K. & YANO, M. (1990) Inhibition of biological actions of big endothelin-1 by phosphoramidon. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **172(2)**:390-5
- FUKURODA, T., FUJIKAWA, T., OZAKI, S., ISHIKAWA, K., YANO, M. & NISHIKIBE, M. (1994) Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. **199(3)**:1461-5.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288(5789)**:373-6
- GARDNER, J.P., MAHER, E., & AVIV, A (1989) Calcium mobilization and Na⁺/H⁺ antiport activation by endothelin in human skin fibroblasts. *FEBS Lett*. **256** :38-42
- GARDNER, J.P., TOKUDOME, G., TOMONARI, H., MAHER, E., HOLLANDER, D. & AVIV, A. (1992) Endothelin-induced calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. **262(1 Pt 1)**:C148-55.

- GARDINER, S.M., COMPTON, A.M., KEMP, P.A. & BENNETT, T. (1990) Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Br J Pharmacol* **101**(3):632-9
- GOLDIE, R.G., D'APRILE, A.C., SELF, G.J., RIGBY, P.J. & HENRY, P.J. (2000) Influence of endothelin-1(1-31) on smooth muscle tone and cholinergic nerve-mediated contraction in rat isolated trachea. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**(5 Suppl. 1) : S228-31
- GOTO, K., KASYIA, Y., MATSUKI, N., TAKUWA, Y., KURIHARA, H., ISHIKAWA, T., KIMURA, S., YANAGISAWA, M. & MASAKI, T. (1989) Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(10):3915-8
- GRATTON, J.P., MAURICE, M.C. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1995a) Characterization of endothelin receptors and endothelin-converting enzyme activity in the rabbit lung. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26** :S88-90
- GRATTON, J.P., RAE, G.A., CLAING, A., TÉLÉMAQUE, S. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1995b) Different pressor and bronchoconstrictor properties of human big endothelin-1, 2 (1-38) and 3 in ketamine/xylazine-anaesthetized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* **114** : 720-6

- GRATTON, J.P., RAE, G.A., CLAING, A., TELEMAQUE, S. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1995c) Different pressor and bronchoconstrictor properties of human big-endothelin-1, 2 (1-38) and 3 in ketamine/xylazine-anaesthetized guinea-pigs. *Br J Pharmacol* **114**(3):720-6
- GRATTON, J.P., COURNOYER, G., LÖFFLER, B.-M., SIROIS, P. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1997) ETB receptor and nitric oxide synthase blockade induce BQ-123-sensitive pressor effects in the rabbit. *Hypertension* **30**(5):1204-9
- GRATTON, J.P., COURNOYER, G. & D'ORLEANS-JUSTE, P. (1998) Endothelin-B receptor-dependent modulation of the pressor and prostacyclin-releasing properties of dynamically converted big endothelin-1 in the anesthetized rabbit. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. **31 Suppl 1**:S161-3
- GRATTON, J.P., RAE, G.A., BKAILY, G. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2000) ETB receptor blockade potentiates the pressor response to big endothelin-1 but not big endothelin-2 in the anesthetized rabbit. *Hypertension* **35**(3):726-31
- GRAY, G.A. & WEBB, D.J. (1996) The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* **72**(2):109-48.
- GU, X.H., LIU, J.J., DILLON, J.S. & NAYLER, W.G. (1989) The failure of endothelin to displace bound, radioactively labelled, calcium antagonists (PN 200/110, D888 and diltiazem). *Br. J. Pharmacol.* **96** :262-264

- HALEEN, S.J., DAVIS, L.S., LADOUCEUR, D.M. & KEISER, J.A. (1993) Why big endothelin-1 lacks a vasodilator response. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22** :S271-3
- HAMADA, H., TERAJ, M., KIMURA, H., HIRANO, K., OANA, S. & NIIMI, H. (1999) Increased expression of mast cell chymase in the lungs of patients with congenital heart disease associated with early pulmonary vascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* **160(4)**:1303-8
- HAMILTON, M.G., FREW, R. & LUNDY, P. M. (1989) Effect of endothelin on Ca²⁺ influx, intracellular free Ca²⁺ levels and ligand binding to N and L type Ca²⁺ channels in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162** :1332-1338
- HANSON, G.C., ANDERSON, K.E., GYLLSTEDT, E., HOGESTATT, E.D. & LINDBERG, B.F. (1997) Hydrolysis of big endothelin-1 by a serine protease in the membrane fraction of human lung. *Regulatory Peptides* **68** :63-69
- HARTTER, E. & WOLOSZCZUK, W. (1989) Radioimmunoassay of endothelin. *Lancet* **1(8643)**:909
- HASEGAWA, H., HIKI K, S.A., WAMURA, T., AOYAMA, T., OKAMOTO, Y., MIWA, S., SHIMOHAMA, S., KIMURA, J. & MASAKI, T. (1998) Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.* **428(3)**:304-8.

- HASHIDO, K., GAMOU, T., ADACHI, M., TABUCHI, H., WATANABE, T.,
FURUICHI, Y. & MIYAMOTO, C. (1992) Truncation of N-terminal extracellular or
C-terminal intracellular domains of human ETA receptor abrogated the binding activity
to ET-1. *Biochem Biophys Res Commun* **187**(3):1241-8
- HAYASAKI-KAJIWARA, Y., NAYA, N., SHIMAMURA, T., IWASAKI, T. &
NAKAJIMA, M. (1999) Endothelin generating pathway through endothelin 1-31 in
human cultured bronchial smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **127**(6) :1415-21
- HAYNES, W.G. & WEBB, D.J. (1994) Contribution of endogenous generation of
endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* **344** :852-854
- HAYNES, W.G., FERRO, C.J., O'KANE, K.P.J., SOMERVILLE, D., LOMAX, C.C. &
WEBB, D.J. (1996) Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral
vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* **93** :1860-1870
- HEMSEN, A., AHLBORG, G., OTTOSSON-SEEBERGER, A. & LUNDBERG, J.M.
(1995) Metabolism of Big endothelin-1 (1-38) and (22-38) in the human circulation in
relation to production of endothelin-1 (1-21). *Regul Pept.* **55**(3):287-97.
- HENRY, P.J. & GOLDIE, R.G. (1995) Potentiation by endothelin-1 of cholinergic nerve-
mediated contractions in mouse trachea via activation of ETB receptors.
Br J Pharmacol **114**(3):563-9

HIOKI, Y., OKADA, K., ITO, H., MATSUYAMA, K. & YANO, M. (1991) Endothelin converting enzyme of bovine carotid artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res* **174** :446-451

HIRATA, Y., YOSHIMI, H., TAKAICHI, S., YANAGISAWA, M. & MASAKI, T. (1988) Binding and receptor down regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **239** :13-17

HISAKI, K., MATSUMURA, Y., NISHIGUCHI, S., FUJITA, K., TAKAOKA, M. & MORIMOTO, S. (1993) Endothelium independent pressor effect of big endothelin-1 and its inhibition by phosphoramidon in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* **241** :75-81

HOANG, V.M., SAMSOM, C.E. & TURNER, A.J. (1996) Mutagenesis and modeling of endothelin converting enzyme. *Biochem Soc Trans* **24(3)** :471S

HOANG, M.V. & TURNER, A.J. (1997) Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. *Biochemical Journal* **327 (Pt 1)**:23-6

HOANG, M.V., SANSOM, C.E. & TURNER, A.J. (1997) Mutagenesis of Glu403 to Cys in rabbit neutral endopeptidase-24.11 (neprilysin) creates a disulphide-linked homodimer: analogy with endothelin-converting enzyme. *Biochemical Journal.* **327 (Pt 3)**:925-9

- HOM, G.J., SCHUTT, W.A. & RUBANYI, G.M. (1990) Potential mechanisms of endothelin-induced transient decreases in arterial pressure in SHR. In Endothelium-derived Contracting Factors, edited by B.M. Rubanyi and P.M. Vanhoute, Karger, Basel, Switzerland, 98-103
- HONORÉ, J.C., PLANTE, M., BKAILY, G., RAE, G.A. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2002) Endothelin-1(1-31) induces pressor responses and increases in pulmonary insufflation pressure in the guinea pig. *Br. J. Pharmac.* **136** :819-828
- HOSADA, K., NAKAO, K., HIROSHI, A., SUGA, S., OGAWA, Y., MUKOYAMA, M., & AL. (1991) Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.* **287** :23-26
- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. (1992) Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol. Res.* **26** :223-242
- HUNT, J.T., LEE, V.G., LIU, E.C., MORELAND, S., MCMULLEN, D., WEBB, M.L. & BOLGAR, M. (1993) Control of peptide disulfide regioisomer formation by mixed cysteine-penicillamine bridges. Application to endothelin-1. *International Journal of Peptide & Protein Research.* **42(3)**:249-58
- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. (1992) Vasoactive mediators released by endothelins. *Pharmacol Res.* **26(3)**:223-42.

- IHARA, M., FUKURODA, T., SAEKI, T., NISHIKIBE, M., KOJIRI, K., SUDA, H. & YANO, M. (1991a) An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178** :132-137
- IHARA, M., NOGUCHI, K., SAEKI, T., FUKURODA, T., TRUCHIDA, S., KIMURA, S., FUKAMI, T., ISHIKAWA, K., NISHIKIBE, M. & YANO, M. (1991b) Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* **50** :247-255
- IKEDA, S., EMOTO, N., ALIMASARDJONO, H., YOKOYAMA, M. & MATSUO, M. (2002) Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. *Biochem Biophys Res Commun* **293(1)**:421-6.
- IKEGAWA, R., MATSUMURA, Y., TSUKAHARA, Y., TAKAOKA, M. & MORIMOTO, S. (1991) Phosphoramidon inhibits the generation of endothelin-1 from exogenously applied big endothelin-1 in cultured vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *FEBS Letters* **293(1-2)**:45-8
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K. & MASAKI, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86(8)**:2863-7
- INUI, D., YOSHIZUMI, M., OKISHIMA, N., HOUCHI, H., TSUCHIYA, K., KIDO, H. & TAMAKI, T. (1999) Mechanism of endothelin-1-(1-31)-induced calcium signaling in human coronary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **276(6 Pt 1)** : E1067-72

INUI, D., YOSHIKAWA, M., SUZAKI, Y., KIRIMA, K., TSUCHIYA, K., HOUCHI, H., KAGAMI, S. & TAMAKI, T. (2000) Effect of endothelin-1 (1-31) on p38 mitogen-activated protein kinase in cultured human mesangial cells. *Life Sci.* **68(6)** :635-45

ISHIKAWA, K., FUKAMI, T., NAGASE, T., FUJITA, K., HAYAMA, T., NIIYAMA, K., MASE, T., IHARA, M. & YANO, M. (1992) Cyclic pentapeptide endothelin antagonists with high ETA selectivity. Potency- and solubility-enhancing modifications. *J. Med. Chem.* **35** :2139-2142

ISHIKAWA, K., IHARA, N., NOGUCHI, K., MASE, T., MINO, N., SAEKI, T., FUKURODA, T., FUKAMI, T., OZAKI, S., NAGASE, T., NISHIKIBE, M. & YANO, M. (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** :4892-4896

ITOH, Y., YANAGISAWA, M., OHKUBO, S., KIMURA, C., KOSAKA, T., INOUE, A., ISHIDA, N., MITSUI, Y., ONDA, H. & FUJINO, M. (1988) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Letters* **231(2)**:440-4

IWAMURO, Y., MIWA, S., ZHANG, X.F., MINOWA, T., ENOKI, T., OKAMOTO, Y., HASEGAWA, H., FURUTANI, H., OKAZAWA, M., ISHIKAWA, M., HASHIMOTO, N. & MASAKI, T. (1999) Activation of three types of voltage-independent Ca²⁺ channel in A7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca²⁺ channel blocker LOE 908. *Br J Pharmacol.* **126(5)**:1107-14.

- IWAMURO, T., MIWA, S., ZHANG, Z.-F., KOMURO, T., MINOWA, T. & MASAKI, T. (1999) Activation of three types of voltage-independent Ca^{2+} -entry channel in A7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca^{2+} -entry channel blocker LOE 908. *Br. J. Pharmacol.* **126** :893-902
- JENG, A.Y., DE LOMBAERT, S., BEIL, M.E., BRUSEO, C.W., SAVAGE, P., CHOU, M. & TRAPANI, A.J. (2000) Design and synthesis of a potent and selective endothelin-converting enzyme inhibitor, CGS 35066. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* **36(5 Suppl 1)**:S36-9
- JENG, A.Y., MULDER, P., KWAN, A.-L., & BATTISTINI, B. 2002. Nonpeptidic endothelin-converting enzyme inhibitors and their potential therapeutic applications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**: 440-449.
- JOHNSON, G.D., STEVENSON, T. & AHN, K. (1999) Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *Journal of Biological Chemistry.* **274(7)**:4053-8
- KARNE, S., JAYAWICKREME, C.K. & LERNER, M.R. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (Etc receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J.Biol. Chem* **268** :19126-19133
- KASHIWABARA, T., INAGAKI, Y., OHTA, H., IWAMATSU, A., NOMIZU, M., MORITA, A. & NISHIKORI, K. (1989) Putative precursors of endothelin have less vasoconstrictor activity in vitro but a potent pressor effect in vivo. *FEBS Letters* **247(1)**:73-6

- KASUYA, Y., ISHIKAWA, T., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., GOTO, K. & MASAKI, T. (1989a) Mechanism of contraction to endothelin in isolated porcine coronary artery. *Am. J. Physiol.* **257** : H1828-H1835
- KASUYA, Y., TAKUWA, Y, YANAGISAWA, M., MASAKI, T. & GOTO, K. (1989b) A pertussis toxin sensitive mechanism of endothelin action in porcine coronary artery smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **107** :456-462
- KAW, S., HECKER, M. & VANE, J.R. (1992) The two-step conversion of big endothelin 1 to endothelin 1 and degradation of endothelin 1 by subcellular fractions from human polymorphonuclear leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **89(15)**:6886-90
- KEDZIERSKI, R.M. & YANAGISAWA, M. (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology.* **41**:851-76
- KENNY, A.J. & STEPHENSON, S.L.(1988) Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett* **232(1)**:1-8
- KERR, M.A. & KENNY, A.J. (1974) The purification and specificities of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* **137**:477-488

- KIDO, H., NAKANO, A., OKISHIMA, N., WAKABAYASHI, H., KISHI, F.,
NAKAYA, Y., YOSHIZUMI, M. & TAMAKI, T. (1998) Human chymase, an enzyme
forming novel bioactive 31-amino acid length endothelins. *Biological Chemistry*.
379(7):885-91
- KIMURA, S., KASUYA, Y., SAWAMURA, T., SHINIMI, O., SUGITA, Y.,
YANAGISAWA, M., GOTO, K. & MASAKI, T. (1989) Conversion of big endothelin-
1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity:
structure-activity relationships of big endothelin-1. *Journal of Cardiovascular
Pharmacology*. **13 Suppl 5**:S5-7; discussion S18
- KINOSHITA, A., URATA, H., BUMPUS, F.M. & HUSAIN, A. (1990) Identification of
a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human
heart. *J. Biol. Chem.* **266** :19192-19197
- KISHI, F., MINAMI, K., OKISHIMA, N., MURAKAMI, M., MORI, S., YANO, M.,
NIWA, Y., NAKAYA, Y. & KIDO, H. (1998) Novel 31-amino-acid-length endothelins
cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochemical & Biophysical Research
Communications*. **248(2)**:387-90
- KITAZYMI, K., SHIBA, T., NISHIKI, K., FURUKAWA, Y., TAKASAKI, C. &
TASAKA, K. (1990) Structure-activity relationship in vasoconstrictor effects of
sarafotoxins and endothelin-1. *FEBS Letters*. **260(2)**:269-72
- KLOOG, Y. & SOKOLOVSKY, M. (1988) Similarities in mode and sites of action of
sarafotoxins and endothelins. *Trends in Pharmacological Sciences* **10(6)**:212-4

- KOBAYSHI, T., MIYAUCHI, T., SAKAI, S., MAEDA, S., YAMAGUCHI, I., GOTO, K. & SUGISHITA, Y. (1998) Down-regulation of ET(B) receptor, but not ET(A) receptor, in congestive lung secondary to heart failure. Are marked increases in circulating endothelin-1 partly attributable to decreases in lung ET(B) receptor-mediated clearance of endothelin-1? *Life Sci.* **62(2)**:185-93.
- KORTH, P., BOHLE, R.M., CORVOL, P. & PINET, F. (1999) Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J Histochem Cytochem* **47(4)** :447-62
- KOYAMA, H., TABATA, T., NISHIZAWA, Y., INOUE, T., MORII, H. & YAMAJI, T. (1989) Plasma endothelin levels in patients with uraemia. *Lancet* **i** :991-992
- LABONTÉ, J., BROCHU, I., HONORÉ, J.C., D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2001) Role of ETB and B2 receptors in the ex vivo platelet inhibitory properties of endothelin and bradykinin in the mouse. *Br J Pharmacol.* **132(4)**:934-40.
- LAPORTE, J., D'ORLÉANS-JUSTE, SINGH, G. & SIROIS, P. (1995) Dexamethasone and phosphoramidon inhibit endothelin release by cultured nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells. *J Cardiovasc Pharmacol Suppl* **3**:S53-5
- LAPORTE, J., D'ORLÉANS-JUSTE, P. & SIROIS, P. (1996) Guinea pig Clara cells secrete endothelin 1 through a phosphoramidon-sensitive pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14(4)**:356-62

- LAPORTE, J. & SIROIS, P. (1997) Phosphoramidon and thiorphan suppress the generation of endothelin (ET) from exogenous big-endothelin by guinea pig Clara cells. *Regulatory Peptides* **68(2)** : 105-109
- LAPORTE, S., DENAULT, J.B., D'ORLÉANS-JUSTE, P. & LEDUC, R. (1993) Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **22 Suppl 8**:S7-10
- LAUTH, M., BERGER, M.M., CATTARUZZA, M. & HECKER, M. (2000) Elevated perfusion pressure upregulates endothelin-1 and endothelin B receptor expression in the rabbit carotid artery. *Hypertension* **35(2)**:648-54
- LEBEL, N. LEBEL, N., D'ORLÉANS-JUSTE, P., FOURNIER, A. & SIROIS, P. (1995) Characterization of the endothelin-converting enzyme in guinea pig upper bronchus. *J Cardiovasc Pharmacol* **26 Suppl 3**:S81-3
- LEBEL, N., D'ORLÉANS-JUSTE, P., FOURNIER, A. & SIROIS, P. (1996) Role of the neutral endopeptidase 24.11 in the conversion of big endothelins in guinea-pig lung parenchyma. *British Journal of Pharmacology* **117(1)** : 184-8
- LEE, S., LIN, M., MELE, A., CAO, Y., FARMAR, J., RUSSO, D. & REDMAN, C. (1999) Proteolytic processing of big endothelin-3 by the kell blood group protein. *Blood*. **94(4)**:1440-50

- LERMAN, A., HILDEBRAND, F.L. Jr., AARHUS, L.L. & BURNETT, J.C.Jr. (1991)
Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations. *Circulation*
83(5):1808-14
- LEWIS, K., CADIEUX, A., RAE, G.A. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1998) L-NAME
potentiates endothelin-stimulated thromboxane release from guinea pig lung. *J*
Cardiovasc Pharmacol **31 Suppl 1**:S109-11
- LEWIS, K., CADIEUX, A., RAE, G.A., GRATTON, J.P. & D'ORLÉANS-JUSTE, P.
(1999) Nitric oxide limits the eicosanoid-dependent bronchoconstriction and
hypotension induced by endothelin-1 in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* **126(1)**:93-102
- 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
- LINDBERG, B.F., BENGTSSON, H.I., LUNDIN, S. & ANDERSSON, K.E. (1992)
Degradation and inactivation of rat atrial natriuretic peptide 1-28 by neutral
endopeptidase-24.11 in rat pulmonary membranes. *Regul Pept* **42(1-2)**:85-96
- LINDBERG, B.F., GYLLSTEDT, E. & ANDERSSON, K.E. (1997) Conversion of
angiotensin I to angiotensin II by chymase activity in human pulmonary membranes.
Peptides 1997;**18(6)**:847-53

- LITTLE, P.G., NEYLON, C.B., TKACHUK, V.A. & BOBIK, A. (1992) Endothelin-1 and endothelin-3 stimulate calcium mobilization by different mechanisms in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183** :694-700
- LIU, J., CHEN, R., CASLEY, D. J. & NAYLER, W.G. (1990) Ischemia and reperfusion increase I labeled endothelin-1 binding in rat cardiac membranes. *Am. J. Physiol.* **258** :829-835
- LOFFLER, B.M. (2000) Endothelin-converting enzyme inhibitors : current status and perspectives. *J. Cardiovasc Pharmacol* **34 (4 suppl 2)** :S79-82
- MAGUIRE, J.J., KUC, R.E. & DAVENPORT, A.P. (2001) Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1(1 - 31), in human mammary and coronary arteries in vitro. *British Journal of Pharmacology.* **134(6)**:1360-6
- MALFROY, B., SWERTS, J.P., GUYON, A. & ROQUES, B.P. (1978) High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* **276** :523-526.
- MARIE-CLAIRE, C., RUFFET, E., TIRABOSCHI, G. & FOURNIE-ZALUSKI MC (1998) Differences in transition state stabilization between thermolysin (EC 3.4.24.27) and neprilysin (EC 3.4.24.11). *FEBS Letters.* **438(3)**:215-9
- MARSDEN, P.A., SCHAPPERT, K.T., CHEN, H.S., FLOWERS, M., SUNDELL, C.L., WILCOX, J.N., LAMAS, S. & MICHEL, T. (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* **307** :287-93

- MASAKI, T., VANE, J.R. & VANHOUTTE, P.M. (1994) International Union of PharmacologieNomenclature of Endothelin Receptors. *Pharmacol Rev.* **46** :137-142
- MASAKI, T., NINOMIYA, H., SAKAMOTO, A., OKAMOTO, Y. (1999) Structural basis of the function of endothelin receptor. *Mol Cell Biochem* **190**(1-2):153-6
- MATSAS, R., FULCHER, I.S., KENNY, A.J. & TURNER, A.J. (1983) [Leu]enkephalin are hydrolysed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci USA* **80** :3111-3115
- MATSUMURA, Y., IKEGAWA, R., TSUKAHARA, Y., TAKAOKA, M. & MORIMOTO, S. (1990) Conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 by two types of metalloproteinases derived from porcine aortic endothelial cells. *FEBS Letters* **272**(1-2):166-70
- MATSUMURA, Y., TSUKAHARA, Y., KUNINOBU, K., TAKAOKA, M. & MORIMOTO, S. (1992) Phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in vascular endothelial cells converts big endothelin-1 and big endothelin-3 to their mature form. *FEBS Letters.* **305**(2):86-90
- MAZZOCCHI, G., ROSSI, G.P., MALENDOWICZ, L.K., CHAMPION, H.C. & NUSSDORFER, G.G. (2000) Endothelin-1(1-31), acting as an ETA-receptor selective agonist, stimulates proliferation of cultured rat zona glomerulosa cells. *FEBS Letters.* **487**(2) :194-8

- MCMAHON, E.G., PALOMO, M.A., MOORE, W.M., W.M., MCDONALD, J.F. & STERN, M.K. (1991) Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1(1-39) in vivo and conversion of big endothelin-1(1-39) to endothelin-1(1-21) in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **88(3)** :703-7
- MIASIRO, N., NAKAIE, C.R. & PAIVA, A.C. (1993) Endothelin (16-21): biphasic effect and no desensitization on the guinea-pig isolated ileum. *Br J Pharmacol* **109(1)**:68-72
- MITANI, Y., UEDA, M., MARUYAMA, K., SHIMPO, H., KOJIMA, A., MATSUMURA, M., AOKI K & SAKURAI, M. (1999) Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax* **54(1)**:88-90
- MIYAUCHI, T. & MASAKI, T. (1999) Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35** :235-255
- MCMAHON, E.G., PALOMO, M.A., MOORE, W.M., MCDONALD, J.F. & STERN, M.K. (1991) Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1-(1-39) in vivo and conversion of big endothelin-1-(1-39) to endothelin-1-(1-21) in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **88(3)**:703-7
- MILLS, R.G., ATKINS, A.R., HARVEY, T., JUNIUS, F.K., SMITH, R. & KING, G.F. (1991) Conformation of sarafotoxin-6b in aqueous solution determined by NMR spectroscopy and distance geometry. *FEBS Letters.* **282(2)**:247-52

- MONCADA, S., FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. (1973) Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature* **246** :217-9
- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S., & VANE, J.R. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263(5579)**:663-5.
- MONCADA, S., HIGGS, A. & FURCHGOTT, R. (1997) International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* **49** :137-42
- MURPHY, L.J., CORDER, R., MALLET, A.I. & TURNER, A.J. (1994) Generation by the phosphoramidon-sensitive peptidases, endopeptidase-24.11 and thermolysin, of endothelin-1 and c-terminal fragment from big endothelin-1. *British Journal of Pharmacology.* **113(1)**:137-42
- NAKANO, A., KISHI, F., MINAMI, K., WAKABAYASHI, H., NAKAYA, Y. & KIDO H. (1997) Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *Journal of Immunology.* **159(4)**:1987-92
- NAGATA, N., NIWA, Y. & NAKAYA, Y. (2000) A novel 31-amino-acid-length endothelin, ET-1(1-31), can act as a biologically active peptide for vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275(2)** :595-600

- NISHIKORI, K., AKIYAMA, H., INAGAKI, Y., OHTA, H., KASHIWABARA, T., IWAMATSU, A., NOMIZU, M. & MORITA, A. (1991) Receptor binding affinity and biological activity of C-terminal elongated forms of endothelin-1. *Neurochem. Int.* **18** : 535-539
- NISHIYAMA, M., MOROI, K., SHAN, L., YAMAMOTO, M., TAKASAKI, C., MASAKI, T. & KUMURA, S. (1995a) Two distinct endothelin B receptor subtypes mediate constriction of rabbit saphenous vein. *Jpn. J. Pharmacol.* **68** :235-243
- NISHIYAMA, M., SHAN, L.H., MOROI, K., MASAKI, T. & KIMURA, S. (1995b) Heterogeneity of endothelin ETA receptor-mediated contractions in the rabbit saphenous vein. *Eur J Pharmacol* **286(2)**:209-12
- NIWA, Y., NAGATA, N., OKA, M., TOYOSHIMA, T., AKIYOSHI, H., WADA, T. & NAKAYA, Y. (2000) Production of nitric oxide from endothelial cells by 31-amino-acid-length endothelin-1, a novel vasoconstrictive product by human chymase. *Life Sci.* **67(9)** :1103-9
- NUSSDORFER, G.G., ROSSI, G.P., MALENDOWICZ, L.K. & MAZZOCCHI, G. (1999) Autocrine-paracrine endothelin system of the physiology and pathology of steroid-secreting tissue. *Pharmacol Rev* **51(3)**:403-38
- OEFNER, C., D'ARCY, A., HENNIG, M., WINKLER, F.K., DALE, G.E. (2000) Structure of human neutral endopeptidase (neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* **296** : 341-349

OGAWA, Y., NAKAO, K., ARAI, H., NAKAGAWA, O., HOSADA, K., SUGA, S., & AL. (1991) Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **178** :248-255

OHKUBO, S., OGI, K., HOSAYA, M., MATUMOTO, H., SUZYKI, N. & KIMURA, C. et al. (1990) Specific expression of human endothelin-2 (ET-2) gene in renal adenocarcinoma cell line. Molecular cloning of cDNA encoding precursor of ET-2 and its characterization. *FEBS Lett.* **274** :136-140

OHNAKA, K., TAKAYANAGI, R., NISHIKAWA, M., HAJI, M. & NAWATA, H. (1993) Purification and characterization of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in porcine aortic endothelium. *Journal of Biological Chemistry.* **268(35)**:26759-66,

OHUCHI, T., KUWAKI, T., LING, G.-Y., DEWIT, D., JU., K., ONODERA, M., CAO, W.-H., YANAGISAWA, M. & KUMEDA, M. (1999) Elevation of blood pressure by genetic and pharmacologic disruption of the endothelin-B receptor in mice. *Am. J. Physiol* **276(4 Pt 2)**:R1071-7.

OHUCHI, T., YANAGISAWA, M. & GARIEPY, C.E. (2000) Renal tubular effects of endothelin-B receptor signaling: its role in cardiovascular homeostasis and extracellular volume regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **9(4)**:435-9

OKADA, K., ARAI, Y., HATA, M., MATSUYAMA, K. & YANO, M. (1993) Big endothelin-1 structure important for specific processing by endothelin-converting enzyme of bovine endothelial cells. *European Journal of Biochemistry.* **218(2)**:493-8

- OKADA, M., NISHIKIBE, M. (2002) BQ-788 a selective endothelin ETB receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev.* **20(1)**:53-66
- OHNAKA, K., TAKAYANAGI, R., NISHIKAWA, M., HJI, M. & NAWATA, H. (1993) Purification and characterization of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in porcine aortic endothelium. *J. Biol. Chem.* **268** : 26759-26766
- OKISHIMA, N., YOSHIZUMI, M., TSUCHIYA, K., CUI, P., KITAMURA, H., TAMAKI, T. & KIDO, H. (2001) Determination of the levels of novel 31-amino acid endothelins and endothelins in human lungs. *Life Sci* **68(18)** :2073-80
- ORZECZOWSKI, H.D., GUNTHER, A., MENZEL, S., ZIMMERMANN, A., FUNKE-KAISER, H., REAL, R., SUBKOWSKI, T., ZOLLMANN, F.S., PAUL, M. (2001) Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Mol Pharmacol* **60(6)** :1332-42
- PAASCHE, J.D., ATTRAMADAL, T., SANDBERG, C., JOHANSEN, H.K., ATTRAMADAL, H. (2001) Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J Biol Chem* **276(36)**:34041-50
- PALMER, R.M. FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327** :524-6
- PALMER, R.M., ASHTON, D.S. & MONCADA, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333** :664-6

- PANG, D.C., JOHNS, A., PATTERSON, K., BOTELHO, L.H. & RUBANYI, G.M.
(1989) Endothelin-1 stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and calcium uptake in isolated canine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 (Suppl.5)** : S75-S79
- PANPANDREOU, C.N., USMANI, B.A., GENG, Y., BOGENREIDER, T., FREEMAN, R., WILK, S., FINSTAD, C.L., REUTER, V.E., POWELL, C.T., SCHEINBERG, D., *et al.* (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Med* **4**:50-57
- PATTERSON, K., MACNAUL, R., RUBANYI, G.M. & PARKER-BOTELLO, L.H.
(1990) Separation and biological activity of chymotrypsin and cathepsin G cleavage products of big-endothelin (1-39). *FASEB J.* **4** : A909
- PETO, H., CORDER, R., JANES, R.W., WALLACE, B.A. (1996) A molecular model for human Big-Endothelin-1 (Big ET-1). *FEBS Lett* **394(2)** : 191-5
- PLUMPTON, C., HAYNES, W.G., WEBB, D.J., DAVENPORT, A.P. (1995)
Phosphoramidon inhibition of the in vivo conversion of big ET-1 to ET-1 in the human forearm. *Br J Pharmacol* **116(2)** : 1821-8
- PLUMPTON, C., FERRO, C.J., HAYNES, W.G., WEBB, D.J. & DAVENPORT, A.P.
(1996) The increase in human plasma immunoreactive endothelin but not big endothelin-1 or its C-terminal fragment induced by systemic administration of the endothelin agonist TAK-044. *Brit. J. Pharmacol.* **119** :311-314

- RAE, G.A., CALIXTO, J.B. & D'ORLEANS-JUSTE, P. (1993) Big-endothelin-1 contracts rat isolated uterus via a phosphoramidon-sensitive endothelin ETA receptor-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* **240(2-3)**:113-9
- RAE, G.A., CALIXTO, J.B. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1994) Effects and mechanisms of action of endothelins on non-vascular smooth muscle. *Regul. Pept.* **55** :1-46
- RAPOPORT, R.M., DRAZNIN, M.B. & MURAD, F. (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* **306** : 174-6
- REBUFFAT, P., MALENDOWICZ, L.K., NERI, G. & NUSSDORFER, G.G. (2001) Endothelin-1[1-31] acts as a selective ETA-receptor agonist in the rat adrenal cortex. *Histology & Histopathology.* **16(2)**:535-40
- REYNOLDS, E.E., MOK, L.L. & KUROKAWA, S. (1989) Phorbol ester dissociates endothelin stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160** :868-873
- RESINK, T.J., SCOTT-BURDEN, T., WEBER, E. & BUHLER, F.R. (1989) Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158** :279-286
- ROBERTS-THOMSON, P., MCRITCHIE, R.J. & CHALMERS, J.P. (1994) Endothelin-1 causes a biphasic response in systemic vasculature and increases myocardial contractility in conscious rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* **24(1)**:100-7

- ROQUES, B.P., FOURNIE-ZALUSKI, M.C., SOROCA, E., LECOMTE, J.M., MALFROY, B., LLORENS, C. & SCHWARTZ, J.C. (1980) The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature*. **288(5788)**:286-8
- ROQUES, B.P., NOBLE, F., DAUGÉ, V., FOURNIÉ-ZALUSKI, M-C. & BEAUMONT, A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11. Structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* **45(1)** :87-146
- ROQUES, B.P. (1998) Cell surface metallopeptidases involved in blood pressure regulation: structure, inhibition and clinical perspectives. *Pathol Biol (Paris)* **46(3)**:191-200
- ROSSI, G.P., ANDREIS, P.G., COLONNA, S., ALBERTIN, G., ARAGONA, F., BELLONI, A.S. & NUSSDORFER, G.G. (2002) Endothelin-1 (1-31) : a novel autocrine-paracrine regulator of human adrenal cortex secretion and growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87(1)** :322-8
- ROVERO, P., PATACCHINI, R. & MAGGI, C.A. (1990) Structure-activity studies on endothelin (16-21), the C-terminal hexapeptide of the endothelins, in the guinea-pig bronchus. *Br J Pharmacol* **101(1)**:232-4
- ROVERO, P., GALOPPINI, C., LARICCHIA-ROBBIO, L., MAZZONI, M.R. & REVOLTELLA, R.P. (1998) Structure-activity analysis of C-terminal endothelin analogues. *J Cardiovasc Pharmacol* **31 Suppl 1**:S251-4

- RUBANYI, G.M. & VANHOUTTE, P.M. (1986) Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* **250**(5 Pt 2):H815-21
- RUBANYI, G.M. & POLOKOFF, M.A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews*. **46**(3):325-415
- RUSSELL, F.D. & DAVENPORT, A.P. (1999) Evidence for intracellular endothelin-converting enzyme-2 expression in cultured human vascular endothelial cells. *Circ Res*. **84**(8):891-6
- RUSSELL, F.D. & DAVENPORT, A.P. (1999) Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* **126**(2): 391-8
- SAEKI, T., IHARA, M., FUKURODA, T., YAMAGIWA, M. & YANO, M. (1991) [Ala^{1,3,11,15}]endothelin-1 analogs with ETB agonistic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **179**(1):286-92
- SAKAI, S., MIYAUCHI, T., KOBAYASHI, M., YAMAGUCHI, E., GOTO, K. & SUGISHITA, Y. (1996) Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* **384** :353-355

- SAKAMOTO, A., YANAGISAWA, M., SAKURAI, T., TAKUWA, Y.,
YANAGISAWA, H. & MASAKI, T. (1991) Cloning and functional expression of
human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
178 :656-663
- 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(6303)**:732-5
- SAKURAI, T., YANAGISAWA, M.,INOUE, A., TYAN, U.S., KIMURA, S. &
MITSUI, Y.(1991) cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat
preproendothelin-1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166** :324-329
- SANSOM, C.E., HOANG, M.V. & TURNER, A.J. (1998) Molecular modelling and site
directed mutagenesis of the active site of endothelin-converting enzyme. *Protein*
Engineering **11(12)** : 1235-1241
- SESSA, W.C., HARRISON, J.K., BARBER, C.M., ZENG, D., DURIEUX, M.E.,
D'ANGELO, D.D., LUNCH, K.R. & PEACH, M.J. (1992) Molecular cloning and
expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*
267 :15274-6
- SCHMIDT, M., KROGER, B., JACOB, E., SEULBERGER, H., SUBKOWSKI T.,
OTTER, R., MEYER, T., SCHMALZING, G. & HILLEN, H. (1994) Molecular
characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS*
Letters. **356(2-3)**:238-43

- SCHMITZ-SPANKE, S. & SCHIPKE, J. (2001) Role of endothelin-1 receptors in healthy anaesthetized rabbits. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. **28(8)**:647-50
- SCHUMACHER, W.A., STEINBACHER, T.E. ALLEN, G.T. & OGLETREE, M.L. (1990) Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins* **40** :71-79
- SCHWEIZER, A., VALDENAIRE, O., NELBOCK, P., DEUSCHLE, U., DUMAS MILNE EDWARDS, J.B., STUMPF, J.G. & LOFFLER, B.M. (1997) Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochemical Journal*. **328 (Pt 3)**:871-7
- SCHWEIZER, A., VALDENAIRE, O., KOSTER, A., LANG, Y., SCHMITT, G., LENZ, B., BLUETHMANN, H. & ROHRER, J. (1999) Neonatal lethality in mice deficient in XCE, a novel member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family. *Journal of Biological Chemistry*. **274(29)**:20450-6
- SHIMADA, K., TAKAHASHI, M. & TANZAWA, K (1994) Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. **269(28)**:18275-8
- SHIMADA, K., TAKAHASHI, M., IKEDA, M. & TANZAWA, K. (1995) Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Letters*. **371(2)**:140-4

SHIMADA, K., TAKAHASHI, M., TURNER, A.J. & TANZAWA, K. (1996) Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochemical Journal*. **315 (Pt 3)**:863-7

SHIPP, M.A., TARR, G.E., CHEN, C.Y., SWITZER, S.N., HERSH, L.B., STEIN, H., SUNDAY, M.E. & REINHERZ, E.L. (1991) CD10/neutral endopeptidases-24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates growth of small-cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** :10662-10666

SKOLOVSKY, M., GALRON, R., KLOOG, Y., BDOLAH, A., INDIG, F.E., BLUMBERG, S. & FLEMINGER, G. (1990) Endothelins are more sensitive than sarafotoxins to neutral endopeptidase: possible physiological significance. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87(12)**:4702-6

SCHMIDT, M., KRÖGER, B., JACOB, E., SEULBERGER, H., SUBKOWSKI, T., OTTER, R., MEYER, T., SCHMALZING, G. & HILLEN, H. (1994) Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* **356** :238-243

SHIPP, M.A., TARR, G.E., CHEN, C.Y., SWITZER, S.N., HERSH, L.B., STEIN, H., Sunday, M.E. & REINHERZ, E.L. (1991) CD10/neutral endopeptidase-24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small-cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** :10662-10666

SCHMITZ-SPANKE, S. & SCHIPKE, J. (2001) Role of endothelin-1 receptors in healthy anaesthetized rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28(8)**:647-50

SCHUMACHER, W.A., STEINBACHER, T.E., ALLEN, G.T., OGLETREE, M.L. (1990) Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins*. **40(1)**:71-9.

SOKOLOVSKY, M. (1992) Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmacology & Therapeutics*. **54(2)**:129-49

SPERR, W.R., BANKL, H.C., MUNDIGLER, G., KLAPPACHER, G., GROSSSCHMIDT, K., AGIS, H., SIMON, P., LAUFER, P., IMHOF, M., RADASZKIEWICZ, T., & al. (1994) The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization. *Blood* **84(11)**:3876-84

SUDJARWO, S., HORI, M., TAKAI, M., URADE, Y., OKADA, T. & KARAKI, H. (1993) A Novel subtype of endothelin B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. *Life Sci*. **53** :431-437

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 contraction. *Br J Pharmacol* **107(3)**:858-60

- SUMITOMO, M., SHEN, R., GOLDBERG, J.S., DAI, J., NAVARRO, D. & NANUS, D.M. (2000) Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuropeptide-induced protein kinase C delta degradation. *Cancer Res* **60(23)**:6590-6
- SUZUKI, N., MATSUMOTO, H., KITADA, C., YANAGISAWA, M. & MIYAUCHI, T., MASAKI, T., ET AL. (1989) Immunoreactive endothelin-1 in plasma detected by a sandwich-type enzyme immunoassay. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 (suppl 5)** : 151-152
- TAKAHASHI, M., FUKUDA, K., SHIMADA, K., BARNES, K., TURNER, A.J., IKEDA, M., KOIKE, H., YAMAMOTO, Y. & TANZAWA, K. (1995) Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells. *Biochem J.* **311 (Pt 2)**:657-65
- TAKAHASHI, M., MATSUSHITA, Y., IJIMA, Y. & TANZAWA, K. (1993) Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* **268** :21394-21398
- TAKAOKA, M., TAKENOBU, Y., MIYATA, Y., IKEGAWA, R., MATSUMURA, Y. & MORIMOTO, S. (1990a) Pepsin, an aspartic protease, converts porcine big endothelin to 21-residue endothelin. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* **166(1)**:436-42

- TAKAOKA, M., MIYATA, Y., TAKENOBU, Y., IKEGAWA, R., MATSUMURA, Y. & MORIMOTO, S. (1990b) Mode of cleavage of pig big endothelin-1 by chymotrypsin. Production and degradation of mature endothelin-1. *Biochemical Journal*. **270(2)**:541-4
- TAKASAKI, C., TAMIYA, N., BDOLAH, A., WOLLBERG, Z. & KOCHVA, E. (1988) Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. *Toxicon*. **26(6)**:543-8
- TAKEJI, T., NAKAYA, Y., KAMADA, M., MAEDA, K., SAIJO, Y., MITANI, R., IRAHARA, M. & AONO, T. (2000) Effect of a novel vasoconstrictor endothelin-1 (1-31) on human umbilical artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270(2)** :622-4
- TAKIGAWA, M., SAKURAI, T., KASUYA, Y., ABE, Y., MASAKI, T. & GOTO, K. (1994) Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins wich couple endothelin receptors. *Eur. J. Biochem.* **228** :102-108
- TAKAGI, Y., NINOMIYA, H., SAKAMOTO, A., MIWA, S. & MASAKI, T. (1995) Structural basis of G-protein specificity of human endothelin receptor : a study with endothelin A/B chimeras. *J. Biol. Chem.* **270** :10072-10078
- TÉLÉMAQUE, S., LEMAIRE, D., CLAING, A. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1992) Phosphoramidon-sensitive effects of big endothelins in the perfused rabbit kidney. *Hypertension* **20(4)**:518-23

- TELEMAQUE, S, GRATTON, J.P., CLAING, A. & D'ORLÉANS-JUSTES, P. (1993a)
Endothelin-1 induces vasoconstriction and prostacyclin release via the activation of
endothelin ETA receptors in the perfused rabbit kidney. *Eur J Pharmacol* **237(2-3)**:275-
81
- TELEMAQUE, S, GRATTON, J.P., CLAING, A. & D'ORLÉANS-JUSTES, P. (1993b)
Pharmacologic evidence for the specificity of the phosphoramidon-sensitive
endothelin-converting enzyme for big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* **22 Suppl**
8:S85-9
- TRAPANI, A.J., BEIL, M.E., BRUSEO, C.W., DE LOMBAERT, S. & JENG, A.Y.
(2000) Pharmacological properties of CGS 35066, a potent and selective endothelin-
converting enzyme inhibitor, in conscious rats. *Journal of Cardiovascular*
Pharmacology. **36(5 Suppl 1)**:S40-335
- TURNER, A.J. & MURPHY, L.J. (1996) Molecular pharmacology of endothelin
converting enzymes. *Biochemical Pharmacology*. **51(2)**:91-102
- TURNER, A.J. & TANZAWA, K. (1997) Mammalian membrane metallopeptidases:
NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB Journal*. **11(5)**:355-64
- TURNER, A.J., BARNES, K., SCHWEIZER, A. & VALDENAIRE, O. (1998) Isoforms
of endothelin-converting enzyme : why and where. *TiPS*. **19** : 483-486
- TURNER, A.J., ISAAC, R.E. & COATES, D. (2001) The neprilysin (NEP) family of
zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* **23(3)**:261-9

URATA, H., HEALY, B., STEWART, R.W., BUMPUS, F.M. & HUSAIN, A. (1990a)

Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res.*

66 :883-90

URATA, H., KINOSHITA, A., MISONO, M.S., BUMPUS, F.M. & HUSAIN, A.

(1990b) Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J. Biol. Chem* **265** :22348-57

URATA, H., BOEHM, K.D., PHILLIP, A., & al. (1993) Cellular localization and

regional distribution of a major angiotensin II-forming chymase in the heart. *J. Clin.*

Invest. **91** :1269-81

VALDENAIRE, O., ROHRBACHER, E., MATTEI, M.G. (1995) Organization of the

gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem*

270(50):29794-8

VALDENAIRE, O., LEPAILLEUR-ENOUF, D., EGIDY, G., THOUARD, A.,

BARRET, A., VRANCKX, R., TOUGARD, C. & MICHEL, J.B. (1999a) A fourth

isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional

promoter molecular cloning and characterization. *European Journal of Biochemistry.*

264(2):341-9

VALDENNAIRE, O., RICHARDS, J.G., FAULL, R.L. & SCHWEIZER, A. (1999b) XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Brain Research. Molecular Brain Research*.

64(2):211-21

VIJAYARAGHAVAN, J., SCICLI, A.G., CARRETERO, O.A., SLAUGHTER, C., MOOMAW, C. & HERSH, L.B. (1990) The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *Journal of Biological Chemistry*. **265(24):14150-**

5

WALDER, C.E., THOMAS, G.R., THIERMERMANN, C. & VANE, J.R. (1989) The hemodynamic effects of endothelin-1 in the pithed rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol*.

13 :S93-7

WARNER, T.D., MITCHELL, J.A., DE NUCCI, G. & VANE, J.R. (1989a) Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* **13 Suppl 5:S85-8**; discussion S102

WARNER, T.D., DE NUCCI, G. & VANE, J.R. (1989b) Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur J Pharmacol* **159(3):325-6**

WILKINS, M.R. (1993) Clinical potential of endopeptidase-24.11 inhibitors in cardiovascular disease. *Biochemical Society Transactions*. **21 (Pt 3)(3):673-8**

- WILLIAMS, D.L., JR. JONES K.L., PETTIBONE D.J., LIS, E.V. & CLINESCHMIDT, B.V. (1991) Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* **15**,175(2):556-61
- WYPIJ, D.M., NICHOLS, J.S., NOVAK, P.J., STACY, D.L., BERMAN, J. & WISEMAN, J.S. (1992) Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem Pharmacol* 1992 **43(4)**:845-53
- XU, D., EMOTO, N., GIAID, A., SLAUGHTER, C., KAW, S., DEWIT, D. & YANAGISAWA, M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*. **78(3)**:473-85
- YANAGISAWA, H., YANAGISAWA. M., KAPUR, R.P., RICHARDSON, J.A., WILLIAMS, S.C., CLOUTHIER, D.E., DEWIT, D., EMOTO, N. & HAMMER, R.E. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* **125(5)**:825-36
- YANAGISAWA, H., HAMMER, R.E., RICHARDSON, J.A., EMOTO, N., WILLIAMS, S.C., TAKED, A.S., CLOUTHIER, D.E. & YANAGISAWA M (2000) Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest* **105**: 1373-1382

- 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(6163)**:411-5
- YANAGISAWA, M. & MASAKI, T. (1989) Biochemistry and molecular biology of the endothelins. *Trend Pharmacol. Sci.* **10** : 374-378
- YANG, Q., BATTISTINI, B., D'ORLÉANS-JUSTE, P., JENG, A.Y. & SIROIS, P. (1997) Modulation of endothelin production and metabolism in guinea-pig tracheal epithelial cells by peptidase inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med* **155(6)**:1884-9
- YASUOKA, H., YOSHIZUMI, M., INUI, D., OKISHIMA, N., HOUCHI, H., KIRIMA, K., OSHITA, S., KIDO, H. & TAMAKI, T. (1999) Effect of endothelin-1 (1-31) on intracellular free calcium in cultured human mesangial cells. *Life Sci.* **65(22)** :PL267-72
- YORIMITSU, K., SHINMI, O., NISHIYAMA, M., MOROI K., SUGITA, Y., SAITO, T., INAGAKI, Y., MASAKI, T. & KIMURA, S. (1992) Effect of phosphoramidon on big endothelin-2 conversion into endothelin-2 in human renal adenocarcinoma (ACHN) cells. Analysis of endothelin-2 biosynthetic pathway. *FEBS Letters.* **314(3)**:395-8
- YOSHIZUMI, M., INUI, D., OKISHIMA, N., HOUCHI, H., TSUCHIYA, K., WAKABAYASHI, H., KIDO, H. & TAMAKI, T. (1998a) Endothelin-1(1-31), a novel vasoactive peptide, increase $[Ca^{2+}]_i$ in human coronary artery smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **348(2-3)** :305-9

- YOSHIZUMI, M., KIM, S., KAGAMI, S., HAMAGUCHI, A., TSUCHIYA, K., HOUCHI, H., IWAO, H., KIDO, H. & TAMAKI, T. (1998b) Effect of endothelin-1(1-31) on extracellular signal-regulated kinase and proliferation of human coronary artery smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **125(5)** :1019-27
- YOSHIZUMI, M., KAGAMI, S., SUZAKI, Y., TSUCHIYA, K., HOUCHI, H., HISAYAMA, T., FUJUI, H. & TAMAKI, T. (2000) Effect of endothelin-1 (1-31) on human mesangial cell proliferation. *Jpn. J. Pharmacol.* **84(2)** :146-55
- ZHANG, Z.-F., IWAMURO, Y., ENOKI, T., OKAZAWA, M., LEE, K., KOMURO, T., MINOWA, T., OKAMOTO, T., HASAGAWA, H., FURUTANI, H., MIWA, S. & MASAKI, T. (1999) Pharmacological characterization of Ca^{2+} entry channels in endothelin-1-induced contraction of rat aorta using LOE 908 and SK and F96365. *Br J Pharmacol* **127(6)**:1388-98