

Université de Sherbrooke

**L'endothéline-1 module le calcium cytosolique et nucléaire ainsi que la
prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules du muscle lisse
aortique humain**

Par

SANAA CHOUFANI

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie Cellulaire

MAI 2002

***À Maman Linda et Papa Geryes
Pour votre amour inconditionnel et votre encouragement illimité
afin d'aller jusqu'au bout de mes rêves...***

***À Paul
Pour ta présence à mes côtés malgré la distance
et plus...***

***À Fadi, Véra et Chadi
Pour votre support et votre encouragement***

***À Sawsan
Pour ta précieuse amitié***

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	XIII
RÉSUMÉ	XVIII
I-INTRODUCTION.....	1
1.1. Le vaisseau sanguin.	2
1.2. L'endothélium vasculaire.....	5
1.3. Le muscle lisse vasculaire.....	8
1.4. L'interaction entre les CEs et les CMLVs.	9
1.5. L'endothéline.	10
1.5.1. Découverte et structure de l'endothéline.	10
1.5.2. Biosynthèse de l'endothéline.....	13
1.5.3. Sécrétion de l'endothéline.....	14
1.5.4. Les récepteurs de l'endothéline.	17
1.5.5. Mécanisme de signalisation intracellulaire de l'ET-1.	24
1.5.6. Implication de l'ET-1 dans l'internalisation des récepteurs ET _A et ET _B	33
1.5.7. Implication de l'ET-1 dans le contrôle du tonus vasculaire.	37
1.5.8. Implication de l'ET-1 dans la prolifération cellulaire.....	38
1.5.8.1. La prolifération cellulaire.	38
1.5.8.1.1. Mécanismes moléculaires de régulation de la prolifération cellulaire.....	38
1.5.8.1.1.1. La voie des MAPKs.	39
1.5.8.1.1.2. Signalisation par la voie des p42/p44 MAPKs.	39
1.5.8.1.1.3. Rôles des p42/p44 MAPK(s).	42
1.5.8.1.2. Le cycle cellulaire.	43
1.5.8.1.2.1. Assemblage des complexes cycline/cdk de la phase G ₁	46
1.5.8.1.2.2. Les inhibiteurs du cycle cellulaire.	47

1.5.8.2. Rôle de l'ET-1 dans la prolifération cellulaire.	48
1.5.8.3. L'apoptose.....	51
1.5.8.3.1. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.	51
1.5.8.3.2. Effet de l'ET-1 sur l'apoptose.....	55
1.5.9. Pathologies reliées à l'endothéline.	58
1.6. Le calcium.....	62
1.6.1. Les Canaux calciques.....	63
1.6.2. Mécanismes impliqués dans la régulation du taux du Ca^{2+} cytosolique libre.....	64
1.7. Hypothèse et objectifs de travail.....	69

II-MATÉRIELS ET MÉTHODES..... 75

2.1. Isolation et culture de cellules du muscle lisse d'aorte humaine adulte.	76
2.2. Microscopie confocale.	78
2.2.1. Principe de base.	78
2.2.2. Balayage de l'échantillon.....	81
2.3. Chargement des cellules avec la sonde calcique Fluo-3.	82
2.4. Études du noyau.....	86
2.4.1. Marquage du noyau.....	86
2.4.2. Étude de la fluorescence calcique du noyau.	86
2.4.3. La mesure du calcium nucléaire.	88
2.5. Immunofluorescence indirecte.....	89
2.5.1. Marquage de l'endothéline-1.	89
2.5.2. Marquage des récepteurs ET_A et ET_B	89
2.5.3. Prétraitement avec l'ET-1.	90
2.5.4. Technique de l'immunofluorescence indirecte.....	91
2.5.5. Détection du marquage par microscopie confocale.	92
2.6. Extraction des protéines totales.	94
2.6.1. Extraction des protéines cellulaires.	94
2.6.2. Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires.....	95
2.6.3. Extraction des protéines membranaires.	95
2.6.4. Buvarbage western.....	96
2.6.5. Détection des antigènes.....	98
2.7. Détection de l'apoptose.....	99
2.7.1. Fragmentation de l'ADN.	99
2.8. Statistiques.	100
2.9. Produits utilisés.....	101

III-RÉSULTATS 104

3.1. L'ET-1 extracellulaire augmente d'une façon dose-dépendante le niveau basal du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des cellules du muscle lisse aortique humain.	105
---	-----

3.2. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs ET _A et ET _B sur l'augmentation soutenue du [Ca] _c et du [Ca] _n induite par l'ET-1 dans les cellules du muscle lisse aortique humain.	112
3.2.1. Effet préventif et curatif de l'administration extracellulaire des antagonistes peptidique des récepteurs ET _A , le BQ-123 et non-peptidique le BMS-182874, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du [Ca] _c et du [Ca] _n induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.....	113
3.2.2. Effet, en modes préventif et curatif, de l'antagoniste peptidique du récepteur ET _B , le BQ-788, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du [Ca] _c et du [Ca] _n induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.....	123
3.3. Effet de l'agoniste de récepteur ET _B , l'IRL 1620, sur le niveau basal du [Ca] _c et du [Ca] _n des cellules du MLVh.	126
3.4. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est due à l'activation des récepteurs ET _A et /ou ET _B couplés à une protéine G sensible aux PTX et CTX. .	132
3.4.1. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est due à l'activation des récepteurs ET _A et /ou ET _B couplés à une protéine G sensible à la PTX.	133
3.4.2. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est due à l'activation des récepteurs ET _A et /ou ET _B couplés à une protéine G sensible à la CTX.....	136
3.5. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh n'est pas due à l'activation de la voie de la protéine Kinase C.	139
3.5.1. Effet de la préstimulation de la Protéine Kinase C par le phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) sur la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.....	140
3.5.2. Effet de la préinhibition de la Protéine Kinase C par le bisindolylmaleimide (BIS) sur la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.	143
3.6. Localisation et distribution de l'ET-1 ainsi que les récepteurs ET _A et ET _B dans les cellules du muscle lisse aortique humain.	146
3.7. Effet de l'ET-1 cytosolique sur le [Ca] _n basal des cellules du MLVh en utilisant la méthode d'une cellule à la membrane plasmique perforée.	150
3.8. L'ET-1 extracellulaire induit la mobilisation transcellulaire de ses récepteurs dans les cellules du MLVh.	156
3.8.1. L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET _B dans les cellules du MLVh.....	157
3.8.2. L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation des récepteurs ET _A dans les cellules du MLVh.....	161
3.9. L'ET-1 extracellulaire induit la synthèse <i>de novo</i> des récepteurs ET _B dans les cellules du MLVh.....	165

3.10. L'ET-1 s'internalise avec ses récepteurs de type ET _B dans les cellules du MLVh.....	171
3.11. Effet de l'ET-1 sur la modulation des fonctions cellulaires : son rôle dans la progression du cycle cellulaire et dans l'apoptose.	174
3.11.1. Effet de l'ET-1 et de l'IRL 1620 sur l'expression des molécules régulatrices du cycle cellulaire.....	175
3.11.2. Effet de l'activation des récepteurs ET _A et ET _B sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les cellules du muscle lisse aortique humain.	179
3.11.3. L'effet de différentes concentrations du [Ca] _c sur le niveau du calcium libre nucléaire des cellules du MLVh à la membrane plasmique perforée.....	182
3.11.4. L'augmentation de l'ET-1 cytosolique bloque la capacité tampon calcique du noyau dans les cellules du MLVh à la membrane plasmique perforée.....	183
3.11.5. Atténuation de l'apoptose des cellules du MLVh par l'activation des récepteurs ET _B	189

IV-DISCUSSION ET CONCLUSION..... 193

4.1. L'utilisation des cellules du MLVh et la sonde calcique Fluo-3 constitue un excellent moyen pour étudier l'effet de l'endothéline-1 sur le [Ca] _c et [Ca] _n	194
4.2. L'ET-1 extracellulaire induit d'une façon dose-dépendante une augmentation soutenue du [Ca] _c et du [Ca] _n dans les cellules du MLVh.	196
4.3. Implication des récepteurs ET _A et ET _B dans la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 extracellulaire.....	198
4.4. Mécanismes impliqués dans la signalisation intracellulaire de l'effet de l'ET-1 sur le [Ca] _i dans les cellules du MLVh.....	200
4.5. Localisation et distribution de l'ET-1 et de ces récepteurs ET _A et ET _B dans les cellules du MLVh.....	203
4.6. L'ET-1 provoque l'internalisation des récepteurs ET _A et ET _B ainsi que la translocation nucléaire des récepteurs ET _B dans les cellules du MLVh.	206
4.7. L'ET-1 induit la synthèse protéique <i>de novo</i> des récepteurs ET _B dans les cellules du MLVh.	210
4.8. Inhibition de la prolifération des cellules du MLVh par l'ET-1.....	212
4.9. L'ET-1 module l'effet tampon calcique du noyau dans les cellules du MLVh.....	216
4.10. L'ET-1 atténue l'apoptose induite par la génistéine dans les cellules du MLVh.....	218
4.11. Considérations physiologiques et pathologiques des résultats.	219

V-REMERCIEMENTS 226

VI-BIBLIOGRAPHIE..... 229

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Représentation schématique de la structure de la paroi vasculaire artérielle.	3
Figure 2	Interaction humorale entre les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vasculaire (MLV).	6
Figure 3	Structure primaire des endothélines-1, -2 et -3 humaines.	11
Figure 4	Voie de biosynthèse post-traductionnelle de l'endothéline-1.	15
Figure 5	Diversité des sous-unités G α des protéines G.	26
Figure 6	Mécanisme de signalisation par l'ET-1.	28
Figure 7	Mécanismes de transduction signalétique de l'endothéline-1 dans les cellules de muscle lisse vasculaire induisant la contraction.	31
Figure 8	Activation des p42/p44 MAPKs par les récepteurs couplés aux protéines G.	40
Figure 9	Régulation du cycle cellulaire.	44
Figure 10	Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.	53
Figure 11	Nouvelle schématisation du transport du Ca ²⁺ impliquant le noyau dans l'excitation-contraction d'un myocyte.	70
Figure 12	Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.	79
Figure 13	Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale.	84

Figure 14	Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations de l'ET-1 extracellulaire sur les niveaux de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du muscle lisse aortique humain étudiées en microscopie confocale.....	106
Figure 15	Effet de différentes concentrations de l'ET-1 extracellulaire sur les niveaux de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du muscle lisse aortique humain.	110
Figure 16	Effet, en préventif, des antagonistes peptidique (BQ-123) et non peptidique (BMS-182874) des récepteurs ET_A sur la réponse calcique induite par l'ET-1.....	114
Figure 17	Effet, en curatif, de l'antagoniste des récepteurs ET_A (BQ-123) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.	117
Figure 18	Effet, en curatif, de l'antagoniste non peptidique des récepteurs ET_A (BMS-182874) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.....	121
Figure 19	Effet, en préventif, de l'antagoniste des récepteurs ET_B (BQ-788) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.....	124
Figure 20	Effet, en curatif, de l'antagoniste des récepteurs ET_B (BQ-788) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.	127
Figure 21	Effet de l'agoniste sélectif des récepteurs ET_B (IRL 1620) et l'ET-1 sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du MLVh.	130
Figure 22	Effet de l'ET-1 sur la réponse calcique dans les cellules du MLVh prétraitées à la toxine de pertussis (PTX).	134

Figure 23	Effet de l'ET-1 sur la réponse calcique dans les cellules du MLVh prétraitées à la toxine de choléra (CTX).	137
Figure 24	Effet de l'ajout, en préventif, de l'activateur de la PKC (phorbol 12,13-dibutyrate /PDBu) sur la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.....	141
Figure 25	Effet de l'ajout, en préventif, de l'inhibiteur de la PKC (Bisindolylmaleimide/BIS) sur la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.....	144
Figure 26	Marquage de l'ET-1 et de ses récepteurs ET _A et ET _B dans les cellules du muscle lisse aortique humain.....	148
Figure 27	Double marquage des récepteurs ET _A et ET _B dans les cellules du muscle lisse aortique humain.	151
Figure 28	Effet de différentes concentrations de l'ET-1 cytosolique sur les niveaux de [Ca] _n des cellules du muscle lisse aortique humain dont la membrane de surface a été perforée par l'ionomycine.	154
Figure 29	L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET _B dans les cellules du MLVh....	159
Figure 30	L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation des récepteurs ET _A dans les cellules du MLVh.....	163
Figure 31	Expérience représentative de l'effet de l'ET-1 sur la synthèse protéique <i>de novo</i> des récepteurs ET _B dans les cellules du MLVh.....	166

Figure 32	L'ET-1 induit la synthèse protéique <i>de novo</i> des récepteurs ET _B dans les cellules du MLVh.	168
Figure 33	L'ET-1 s'internalise et transloque au niveau nucléaire avec ses récepteurs de type ET _B dans les cellules du MLVh.	172
Figure 34	Effet de l'ET-1 et de l'IRL 1620 sur l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire.	176
Figure 35	Effet de l'activation ou l'inhibition des récepteurs ET _A et ET _B sur l'activité des p42/p44 MAPK dans les cellules du muscle lisse aortique humain.	180
Figure 36	Effet tampon du noyau pour le calcium cytosolique des cellules du muscle lisse aortique humain, dont la membrane de surface a été perforée par l'ionomycine.	184
Figure 37	Effet de l'ET-1 cytosolique sur l'effet tampon calcique des noyaux des cellules du muscle lisse aortique humain, dont la membrane de surface a été perforée par l'ionomycine.	187
Figure 38	Effet de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase sur la fragmentation de l'ADN observée suite au traitement des cellules du MLVh avec l'ET-1 ou l'IRL 1620.	190
Figure 39	Représentation schématique de l'internalisation des récepteurs ET _A et ET _B dans les cellules du MLVh.	222

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs des endothélines.....	19
Tableau 2	Sommaire des produits utilisés dans nos expériences.....	102

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

[Ca]_c	Concentration de calcium libre cytosolique
[Ca]_n	Concentration de calcium libre nucléaire
°C	Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADN_c	ADN complémentaire
AMP_c	Adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
Ap-1	Protéine activatrice-1 (Activator protein-1)
ARN_m	Acide ribonucléotique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
bFGF	Facteur de croissance de fibroblastes (basic fibroblast growth factor)
BSA	Albumine de sérum bovin (bovine serum albumin)
Ca²⁺	Calcium
CAK	Kinase activatrice des cyclines (Cyclin activator kinase)
Cdk	Kinase dépendante des cyclines (cyclin dependent kinase)
CE	Cellule endothéliale
CHO	Chinese hamster ovary

Cip	Protéine inhibitrice des Cdk (Cdk inhibitory protein)
CKI	Inhibiteur de cycline/cdk (Cycline- kinase inhibitor)
cm	Centimètre
CMLV	Cellules du muscle lisse vasculaire
CTX	Toxine de choléra (Cholera toxin)
DAG	Diacylglycérol
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EC₅₀	Concentration produisant 50% de la réponse maximale
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDHF	Facteur hyperpolarisant de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium (Endothelium derived relaxing factor)
EDTA	Disodium éthylènediamide tétraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique
ERK	Kinase régulée par les signaux extracellulaires (Extracellular signal-regulated kinase)
ET-1	Endothéline-1
ET-2	Endothéline-2
ET-3	Endothéline-3

EtOH	Ethanol
FBS	Sérum de bovin foetal (fetal bovin serum)
g	Gramme
GDP	Guanidine diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GRK	G-protein receptor kinase
GTP	Guanosine triphosphate
h	Heure
HEK 293	Human embryonic kidney
HEPES	Acide (N-[2-hydroxyéthyl] piperazine-N'-[2-éthanesulfonique])
HMEM	Hank's minimal essential medium
IgG	Immunoglobuline G
IP3	Inositol triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	kilodalton
Kip	Protéine inhibitrice des kinases (kinase inhibitory protein)
Lamp-1	Lysosome-associated membrane protein-1
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes (Mitogen-activated protein kinase)
MAPKK	MAP kinase kinase
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase

mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
n	Nombre d'expériences
NGS	Sérum de chèvre (Normal goat serum)
nM	Nanomolaire
NO	Oxyde nitrique
p	Probabilité
PBS	Tampon phosphate saline (phosphate buffer saline)
PDGF	Facteur de croissance de plaquettes (Platelet derived growth factor)
PGI₂	Prostacycline
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Fluoride de phénylméthylsulfonyl (phenylmethylsulfonyl fluoride)
PMT	Multiplicateur de photon (Photon multiplier)
pRb	Protéine du rétinoblastome
PTX	Toxine de pertussis (Pertussis toxin)
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
rpm	Révolution par minute

RTK	Récepteurs tyrosine kinase
SDS	Sulfate de sodium dodécyl (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS) (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
SmGM	Milieu de croissance du muscle lisse (smooth muscle growth medium)
TXA₂	Thromboxane A₂

L'endothéline-1 module le calcium cytosolique et nucléaire ainsi que la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules du muscle lisse aortique humain

Par

SANAA GERYES CHOUFANI

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Université de Sherbrooke

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade
de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie Cellulaire

RÉSUMÉ

L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur qui a été amplement étudié dans différents modèles cellulaires. L'ET-1 provoque la contraction des aortes isolées humaines et de lapin d'une façon dose-dépendante. Afin de mieux caractériser l'effet vasoconstricteur de l'ET-1, nous avons voulu étudier l'effet de l'ET-1 sur les niveaux du $[Ca]_i$ dans les cellules du muscle lisse aortique humain (MLVh). Les effets de l'ET-1 sont médiés via l'activation d'au moins deux types de récepteurs, ET_A et ET_B . Dans le système vasculaire, les récepteurs ET_A sont présents dans les cellules du muscle lisse et médient une vasoconstriction prolongée, tandis que les récepteurs ET_B , sont présents au niveau de la sarcolème des cellules endothéliales, et sont primordialement considérés comme médiateur d'une vasodilatation NO-dépendante. Les récepteurs ET_B jouent également un rôle dans la clairance de l'ET-1 plasmatique de la circulation. Plusieurs études récentes ont tenté d'élucider le mécanisme moléculaire pouvant être impliqué dans la différence de la réponse physiologique de l'ET-1 suite à l'activation des récepteurs ET_A et ET_B . De plus, nous avons vérifié l'effet mitogène de l'ET-1 vu son importance dans certaines conditions physiopathologiques du système cardiovasculaire.

Dans cette étude, nous avons premièrement examiné l'effet de l'activation ou l'inhibition des récepteurs de l'ET-1 sur les niveaux de base du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ dans les cellules du MLVh en culture. Nous avons évalué par la suite la contribution des récepteurs ET_A et ET_B vasoconstricteurs dans la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1. Ensuite nous avons approfondi nos recherches afin de déterminer l'implication d'une protéine-G sensible au PTX et /ou CTX et l'indépendance de la voie de la protéine kinase C dans la réponse calcique induite par l'ET-1.

Dans la deuxième partie des travaux, nous avons caractérisé la localisation et la distribution de l'ET-1 et de ses récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du MLVh intactes à l'aide des anticorps spécifiques dirigés contre l'ET-1 et ses récepteurs. Cette partie de l'étude nous a permis de démontrer pour la première fois, que les récepteurs ET_B et non les récepteurs ET_A sont présents au niveau nucléaire. De plus, les récepteurs ET_B semblent moduler la

réponse calcique nucléaire de l'ET-1 cytosolique comme il a été montré avec les études sur les effets concentration-dépendante de l'ET-1 cytosolique dans les cellules dont la membrane de surface a été perforée avec l'ionomycine.

Dans la troisième partie de l'étude, nous avons tenté d'élucider le mécanisme d'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B suite à leur stimulation par l'ET-1 dans les cellules du MLVh. Les travaux réalisés au cours de cette partie d'étude ont montré que les récepteurs ET_A ainsi que les récepteurs ET_B sont internalisés en réponse à l'ET-1. Les récepteurs ET_A , surtout membranaires, se retrouvent localisés au niveau péricnucléaire suite à leur internalisation et sont par la suite recyclés au niveau de la membrane de surface. Les récepteurs ET_B , quant à eux, s'internalisent et transloquent au noyau avec l'ET-1. À noter que l'ET-1 induit non-seulement l'internalisation des récepteurs ET_B mais aussi l'augmentation de l'expression de ces récepteurs qui est bloquée par l'inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide.

Finalement, nous avons montré que l'ET-1 n'induit pas une augmentation soutenue de l'expression de la forme phosphorylée des p42/p44 MAPKs. De plus, nous avons montré que la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B atténue l'apoptose induite par la génistéine dans les cellules quiescentes du muscle lisse vasculaire aortique humain.

En conclusion, la présente étude suggère que l'activation des récepteurs ET_A et ET_B par l'ET-1 module le calcium cytosolique et nucléaire des cellules du MLVh et induit par la suite leur internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET_B avec son ligand. De plus l'activation des récepteurs ET_A et ET_B de la sarcolemme n'induit pas l'entrée des cellules du MLVh dans le cycle cellulaire en réponse à l'ET-1 mais par contre semble atténuer l'apoptose induite par la génistéine dans ces cellules.

I- INTRODUCTION

1.1. Le vaisseau sanguin.

Le vaisseau sanguin est un tissu dynamique qui fournit l'irrigation sanguine de tous les organes et tissus (LÉVY et MARTINEAUD, 1993)(livre). La structure de base commune à toutes les parois artérielles comprend trois tuniques concentriques et solidement réunies : l'intima, la média et l'adventice (LÉVY et MARTINEAUD, 1993) (Figure 1).

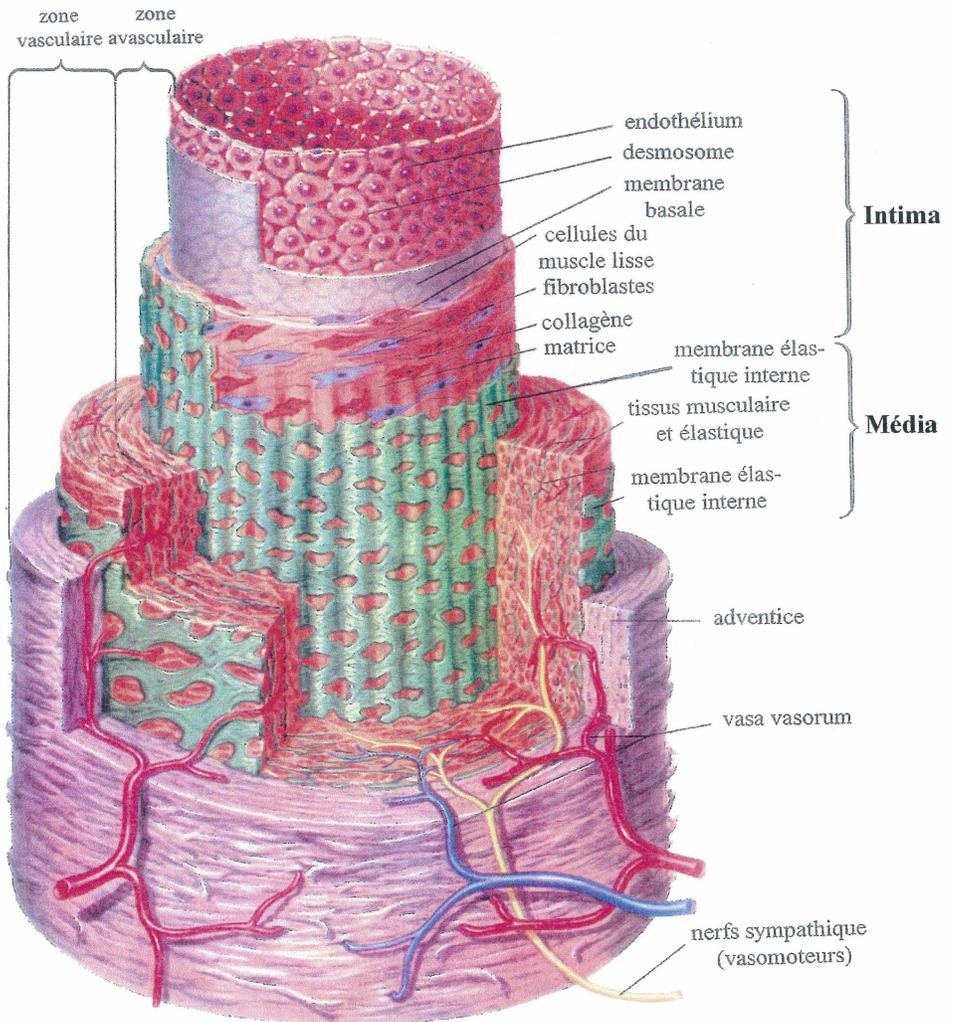
L'intima est la tunique interne, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CEs) qui tapisse la paroi interne du vaisseau sanguin, et constitue une barrière physique entre le sang circulant et les couches musculaires sous-jacentes. La média est la tunique moyenne de la paroi vasculaire, elle est constituée de fibres musculaires et de fibres élastiques. L'adventice est la tunique externe constituée, dans les artères, de fibres élastiques et de collagène. L'adventice reçoit des terminaisons de fibres nerveuses (*nervi vasorum*) qui commandent l'activité des fibres musculaires de la média et contient de petits vaisseaux appelés le *vasa vasorum* qui nourrissent la paroi des artères. L'artère est reliée aux tissus voisins par un tissu conjonctif lâche (pré-adventice) qui rend possibles les mouvements pulsatiles (LÉVY et MARTINEAUD, 1993).

Le vaisseau sanguin est impliqué dans une variété de processus homéostatiques ainsi que pathologiques, d'une manière directe ou indirecte (VANDER *et al.*, 1975).

Figure 1 Représentation schématique de la structure de la paroi vasculaire artérielle.

La paroi vasculaire est composée de trois couches ou tuniques : l'intima, la média et l'adventice. Les cellules endothéliales tapissent la paroi de l'intima, et constituent une barrière physique entre le sang circulant et les couches musculaires lisses sous-jacentes (média).

Modifié de « The CIBA collection of Medical Illustrations », Vol 5 (Heart), CIBA Pharmaceutica Company, NY, 1969, p. 212.



1.2. L'endothélium vasculaire.

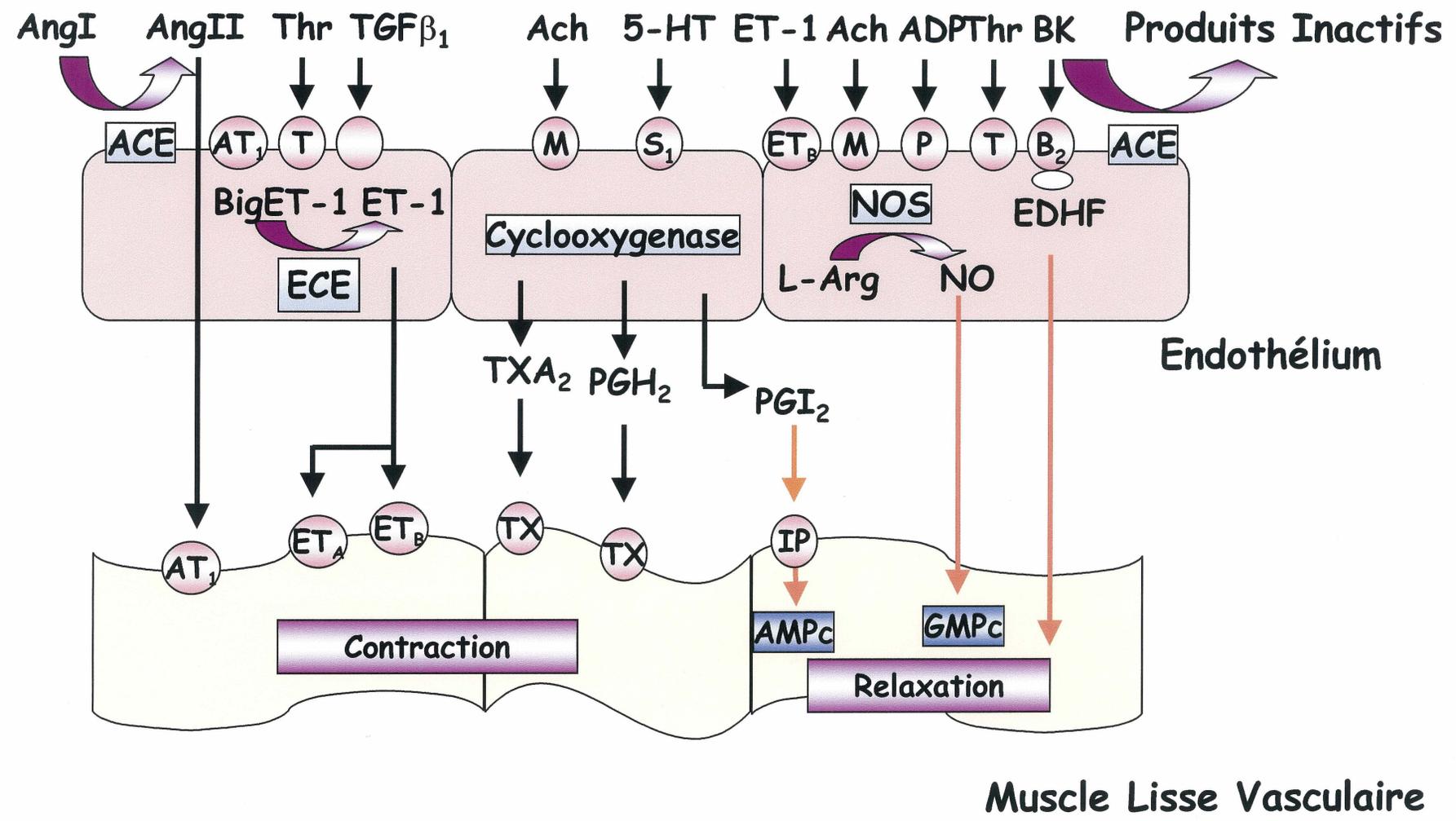
L'endothélium vasculaire est un tissu simple dans sa morphologie mais complexe dans sa fonction. Bien que formé d'une seule monocouche, il est capable de percevoir les changements hémodynamiques par des mécanismes dépendant de récepteurs membranaires (SHEPRO et D'AMORE, 1984). Les cellules endothéliales répondent à des stimuli chimiques et physiques par la synthèse ou la relâche d'une variété de substances vasoactives. L'équilibre entre ces substances est nécessaire pour la régulation du tonus vasculaire (SHEPRO et D'AMORE, 1984).

Parmi les substances vasoconstrictrices secrétées se trouvent l'endothéline-1 (ET-1) (YANAGISAWA *et al.*, 1988) et le thromboxane A₂ (TXA₂) (HAMBERG *et al.*, 1975). Ces deux agents sont connus pour leur action sur le muscle lisse vasculaire où ils agissent via leurs récepteurs respectifs pour provoquer une vasoconstriction et une élévation du calcium intracellulaire (YANAGISAWA *et al.*, 1988 ; HIRATA *et al.*, 1991). Le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) (FURCHGOTT ET ZAWADZKI, 1980) identifié aujourd'hui comme étant l'oxyde nitrique (NO) (PALMER *et al.*, 1987), la prostacycline (PGI₂) (MONCADA *et al.*, 1976) et le facteur hyperpolarisant de l'endothélium (EDHF) (FELETOU *et VANHOUTTE P.M.*, 1988), sont trois facteurs relaxants secrétés par les cellules endothéliales et considérés comme antagonistes physiologiques aux facteurs contractiles cités ci-haut (Figure 2) (pour revues HALLER, 1997; CELERMAJER, 1997).

Figure 2 Interaction humorale entre les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vasculaire (MLV).

L'endothélium produit des facteurs qui provoquent soit la relaxation (flèche rouge) , soit la contraction (flèche noire) du muscle lisse vasculaire. Ang : Angiotensine, ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine, Ach : acétylcholine, ADP: adénosine diphosphate, ATP: adénosine triphosphate, BK : bradykinine, AMPc/GMPc : adénosine / guanosine monophosphate cyclique, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, ET : endothéline-1, 5HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine), L-Arg : L-arginine, NO : oxyde nitrique, NOS : oxyde nitrique synthase, PGH₂ : prostaglandine H₂, PGI₂ : prostacycline, TGFβ1 : facteur de croissance transformant β1, Thr : thrombine, TXA₂ : thromboxane A₂. Les cercles représentent les récepteurs (AT : récepteur de l'angiotensine, B : récepteur de la bradykinine, ET : récepteur de l'endothéline, M : récepteur muscarinique, P : récepteur purinergique, S : récepteur sérotoninergique, T : récepteur de la thrombine, TX : récepteur du thromboxane).

Modifiée de Lucher et Barton (1997) .



Le tonus vasculaire est maintenu par un équilibre entre les facteurs vasodilatants et les facteurs vasoconstrictants relâchés par l'endothélium (GRIENGLING *et* ALEXANDER, 1996).

De plus, l'endothélium joue un rôle clé dans le contrôle de la migration et la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire (OBERHOFF *et al.*, 1998).

Le site de l'endothélium comme barrière entre le sang et les tissus sous-jacents lui permet de contrôler non seulement la coagulation mais également la perméabilité vasculaire à diverses molécules et cellules (WARREN, 1990). L'intégrité de la monocouche endothéliale est essentielle pour contrôler la perméabilité vasculaire et pour protéger le vaisseau contre la déposition des plaquettes et la formation de thrombus (LAMPUGNANI *et al.*, 1991).

1.3. Le muscle lisse vasculaire.

Le muscle lisse est présent dans plusieurs organes tels que le tube digestif, les voies respiratoires, la vessie, l'utérus, ainsi que les vaisseaux sanguins. Sa contraction joue un rôle clé dans le fonctionnement de l'organe correspondant (VANDER *et al.*, 1975). Le muscle lisse constitue une cible importante pour plusieurs facteurs constrictants ainsi que relaxants, l'équilibre desquels détermine son état contractile (pour revues FURCHGOTT *et* VANHOUTTE, 1989 ; RUBANYI, 1991).

Dans les couches de cellules du muscle lisse vasculaire (CMLVs), une synchronisation parfaite de l'activité cellulaire se produit durant la génération et la propagation de la contraction (HUIZINGA *et al.*, 1992).

1.4. L'interaction entre les CEs et les CMLVs.

L'interaction entre les CEs et les CMLVs *in vivo* peut être divisée généralement en deux catégories (DAVIES *et al.*, 1985): a) la communication intercellulaire via les jonctions gaps entre les différentes cellules et b) l'interaction humorale opérant via le liquide interstitiel (extracellulaire). Dans le premier mécanisme, soit la communication jonctionnelle, des ions et des métabolites de faible poids moléculaire passent à travers des canaux hautement structurés (les jonctions gaps) entre les cellules du même type ou de types différents (HASSAN, 2001 ; BÉNY et PACICCA, 1994 ; HIRSCHI *et al.*, 1999 ; pour revue DAVIES *et al.*, 1988). Dans le deuxième mécanisme, il s'agit d'une relâche de molécules effectrices par un type cellulaire, qui seront ensuite reconnues par l'autre type de cellules grâce à des sites spécifiques de récepteurs de surface (CASTELLO *et al.*, 1981 ; HIRSHI *et al.*, 1999 ; SCOTT-BURDEN et VANHOUTTE, 1993 ; pour revues ARNAL *et al.*, 1999; DODGE *et al.*, 1993 ; FRELIN, 1991 ; RYAN et RYAN, 1984; VAN BREEMAN *et al.*, 1997 ; VANHOUTTE *et al.*, 1991). Un exemple de cette interaction humorale est la contraction des muscles lisses vasculaires due à la relâche de l'endothéline-1 de l'endothélium (YANAGISAWA *et al.*, 1988; pour revues FURCHGOTT, 1983; VANHOUTTE et RIMELE, 1983).

Les deux processus sont importants dans le maintien de l'homéostasie de la paroi vasculaire (DAVIES *et al.*, 1988).

La production, l'activité, les rôles physiologiques et pathophysiologiques du puissant vasoconstricteur l'endothéline, dont la principale source vasculaire est l'endothélium, seront discutés dans les prochaines pages, l'étude de ce peptide étant un des éléments majeurs de cette thèse.

1.5. L'endothéline.

1.5.1. Découverte et structure de l'endothéline.

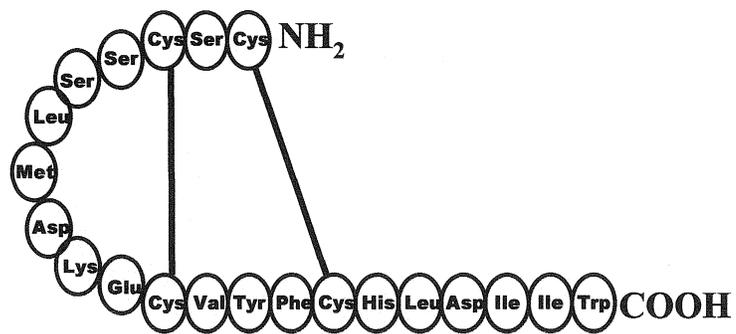
En 1985, HICKEY *et al.* ont rapporté l'existence d'un facteur vasoconstricteur dans un milieu de cellules endothéliales bovines en culture. En 1988, YANAGISAWA *et al.* ont identifié pour la première fois ce facteur vasoactif comme étant un peptide formé de 21 résidus d'acides aminés, ayant une taille de 2492 daltons. Dès sa découverte, ce puissant peptide a généré un grand intérêt dans la communauté scientifique, car il faisait partie d'une nouvelle classe de peptides endogènes impliqués dans une variété de phénomènes physiologiques et pathologiques.

L'endothéline (ET) est un peptide de 21 acides aminés contenant 4 résidus cystéines, qui forment deux ponts disulfures intramoléculaires dans la portion N-terminale du peptide (Figure3) (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Par criblage d'une librairie génomique humaine, dans des conditions

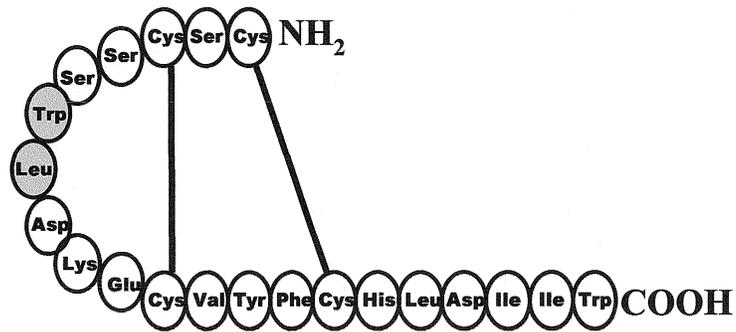
Figure 3 **Structure primaire des endothélines-1, -2 et -3 humaines.**

Les cercles pleins représentent les acides aminés de l'endothéline-2 et -3 qui diffèrent de ceux présents dans la structure de l'endothéline-1.

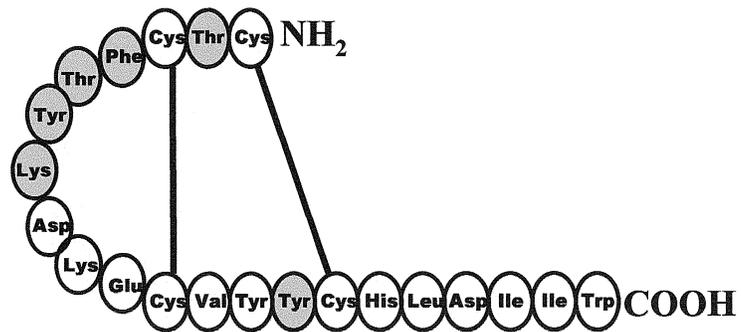
Modifié de GRAY et WEBB (1996) Structures des isopeptides de l'endothéline et de la Sarafotoxine-S6.



Endothéline-1



Endothéline-2



Endothéline-3

d'hybridation à faible stringence, avec une sonde nucléotidique codant pour une portion de la séquence de l'ET, trois gènes reliés à l'ET ont été clonés (INOUE *et al.*, 1989). Chaque gène codant pour des peptides distincts de 21 acides aminés. Ces trois isoformes ont été nommés endothéline-1 (ET-1), ET-2 et ET-3 (INOUE *et al.*, 1989a et 1989b; pour revues GRAY et WEBB, 1996 ; RUBANYI et POLOKOFF, 1994) (Figure3). Bien que l'ET-1 ait été découverte à partir de cellules endothéliales (TOKUNAGA *et al.*, 1992), elle est présente dans plusieurs tissus et organes tels que le cœur, le cerveau, l'intestin, les reins et les poumons (SAKURAI *et al.*, 1992). Les cellules endothéliales sont une source vasculaire importante du peptide ; cependant, les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) produisent aussi une quantité appréciable d'ET-1 (TOKUNAGA *et al.*, 1992). Le rôle possible de cette sécrétion et de l'action autocrine de l'ET-1 sur les CMLVs est encore spéculatif, mais plusieurs indications pointent déjà vers une action mitogénique (HIRATA *et al.*, 1989 et ALBERTS *et al.*, 1994). Ainsi dans une condition pathologique tel l'athérosclérose, l'endothéline agira de façon autocrine ou paracrine afin de stimuler la prolifération des CMLVs (HAUG *et al.*, 1996).

L'ET-2 est exprimée au niveau du rein alors que l'ET-3 est présente dans l'intestin et la glande surrénale (pour revue MASAKI, 1993).

1.5.2. Biosynthèse de l'endothéline.

Chez l'homme, l'endothéline-1 est encodée par un gène bien caractérisé sur le chromosome 6 (BLOCH *et al.*, 1989; ARINAMI *et al.*, 1991). L'analyse des séquences d'ADNc de l'endothéline a révélé que cette dernière est produite par la conversion de son précurseur la préproendothéline (INOUE *et al.*, 1989a et 1989b ; YANAGISAWA *et al.*, 1988). Un clivage au niveau de la séquence consensus Arg-X-X-Arg entre les résidus Lys⁵²-Arg⁵³ et les résidus Lys⁹⁰-Arg⁹¹ par une endopeptidase possiblement de type furine (DENAULT *et al.*, 1995) est la première étape dans la production d'un intermédiaire de 38 acides aminés nommé Big-endothéline-1 (Big-ET-1). Cette forme subit ensuite une transformation protéolytique à un site entre Trp⁷³-Val⁷⁴. Cette réaction est catalysée par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) afin de produire l'ET-1 mature (Figure 4) (YANAGISAWA *et al.*, 1988; ITOH *et al.*, 1988).

L'ET-2 et l'ET-3, quoique moins étudiées, sont aussi produites via une maturation spécifique de leur précurseur respectif, big-ET-2 et big-ET-3 (MASAKI, 1998).

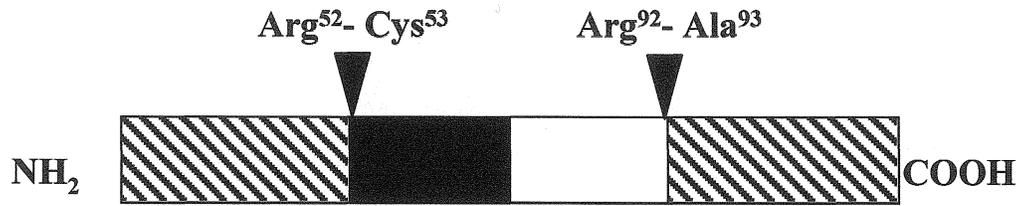
1.5.3. Sécrétion de l'endothéline.

La concentration de l'ET-1 dans le plasma de plusieurs espèces est de l'ordre de un picomolaire (BATTISTINI *et al.*, 1993). Alors, dans les conditions physiologiques normales, les très bas niveaux de l'ET-1 indiquent que ce peptide ne peut pas agir comme une hormone circulante mais plutôt comme un facteur exerçant une action autocrine ou paracrine à des sites

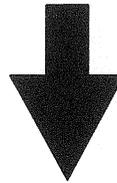
Figure 4 Voie de biosynthèse post-traductionnelle de l'endothéline-1.

Une endopeptidase spécifique à une paire d'acides aminés dibasiques, (endoprotéase « furine-like »), clive au site Arg-X-X-Arg pour produire « big ET-1 ». Puis l'enzyme de conversion de l'ET catalyse la conversion de big ET-1 à l'ET-1. aa : acides aminés.

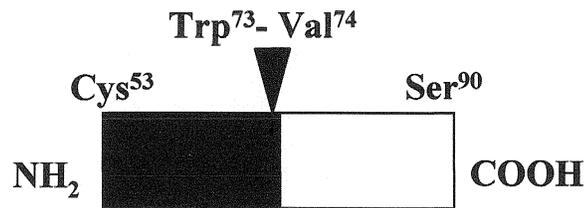
Modifié de MASAKI, 1998.



Pro-endothéline-1 humaine (212 aa)



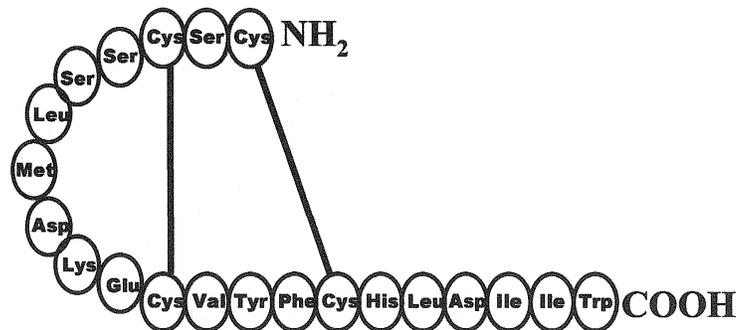
Endopeptidase (Furine)
+
Carboxypeptidases



Big-endothéline-1 humaine (38 aa)



Enzyme de conversion de
l'Endothéline(ECE)



Endothéline-1

multiples de l'organisme (BATTISTINI *et al.*, 1993). De plus, il a été montré que la libération d'endothéline par les cellules endothéliales se fait préférentiellement du côté abluminal, vers le muscle lisse vasculaire, où celle-ci pourra activer son récepteur et provoquer un effet vasoconstricteur (WAGNER *et al.*, 1992). La sécrétion de l'ET-1 est régulisée d'une façon prédominante au niveau de la synthèse du peptide et plus spécifiquement au niveau de la transcription et la traduction de son ARNm (KEDZIERSKI et YANAGISAWA, 2001). La régulation de la production de l'endothéline est contrôlée par de puissants mécanismes, autant stimulants qu'inhibiteurs. Dans la majorité des cellules, tous les stimuli qui induisent une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'ET-1, comme le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (KURIHARA *et al.*, 1989), l'interleukine-1 (YOSHIZUMI *et al.*, 1990), le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), la thrombine (EMORI *et al.*, 1992) et l'angiotensine II (KOHNO *et al.*, 1992a), causent une augmentation de la sécrétion de l'ET-1 par les cellules endothéliales. Cependant, l'ARNm de l'ET-1 diminue, dans les cellules endothéliales, en réponse à l'oxyde nitrique (BOULANGER et LÜCHER, 1990), la prostacycline (PRINS *et al.*, 1994) et le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) (KOHNO *et al.*, 1992b).

1.5.4. Les récepteurs de l'endothéline.

L'administration intraveineuse d'ET-1 chez le rat provoque une hypotension transitoire suivie d'un effet hypertenseur soutenu (YANAGISAWA *et al.*, 1988). L'ET-1 et l'ET-2 sont plus puissants que

l'ET-3 pour induire la phase hypertensive, tandis que les trois peptides sont équipotents pour provoquer la phase hypotensive transitoire via la libération de NO et de PGI₂ (GARDINER *et al.*, 1990 ; SPOKES *et al.*, 1990). Sur la base de ces résultats, deux différents types de récepteurs ont été proposés : un récepteur vasoconstricteur sur le muscle lisse et un récepteur vasodilatateur sur l'endothélium (LUSCHER et WENZEL, 1995). À partir de ces évidences pharmacologiques, deux types de récepteurs aux endothélines ont rapidement été isolés et clonés, les récepteurs ET_A et ET_B (ARAI *et al.*, 1990; LIN *et al.*, 1991; SAKURAI *et al.*, 1992). L'existence d'un troisième type de récepteurs, ET_C, a été suggérée par WEBB (1991). Celui-ci a été cloné dans les mélanophores dermaux de la grenouille *Xenopus Leavis* (KARNE *et al.*, 1993).

Chez l'homme, il existe une homologie de séquence en acides aminés de 63% entre les récepteurs ET_A et ET_B (GRAY et WEBB, 1996). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires car les membres de cette famille sont caractérisés par la présence de sept segments traversant la membrane plasmique, et de plus leur action est généralement connue pour être médiée par l'activation d'une protéine G insensible à la toxine de la pertussis (PTX), de type G $\alpha_{q/11}$ (GRAY et WEBB, 1996). Les récepteurs de l'endothéline peuvent être distingués selon leur affinité de liaison aux ligands, incluant les différents isoformes d'ET, les agonistes ou antagonistes spécifiques, ainsi qu'à leur distribution tissulaire et cellulaire (Tableau 1) (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1996).

Tableau 1 Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs des endothélines.

ET-1 : endothéline-1, ET-2 : endothéline-2, ET-3 : endothéline-3, TM : domaines transmembranaires.

Les antagonistes en caractères gras sont de nature non-peptidique.

Nomenclature	ET_A	ET_B
Acides aminés	427	442
Ordre d'affinité	ET-1=ET-2>ET-3	ET-1=ET-2=ET-3
Agonistes sélectifs	—	IRL1620 BQ3020
Antagonistes sélectifs	BQ-123 A-127722 PD156707 BMS-182874	BQ-788 Ro 46-8443
Protéine G	G _{q/11}	G _{q/11}
Gène/chromosome	<i>ETRA</i> / 4	<i>ETRB</i> / 13
Structure	7 TM	7 TM

Malgré le fait que les principaux effets vasculaires associés aux récepteurs de type ET_A sont la vasoconstriction et pour le récepteur de type ET_B la vasodilatation, il devint évident que des récepteurs non- ET_A étaient responsables de la vasoconstriction induite par l'ET-1 dans certaines espèces animales (CLOZEL *et* GRAY, 1995). L'utilisation d'antagonistes spécifiques pour le récepteur ET_A , comme le BQ-123, a démontré que l'effet presseur, provoqué par l'ET-1, n'était pas complètement aboli même en présence de haute concentrations de cet antagoniste (CLOZEL *et al.*, 1992). De plus, des études *in vitro*, dans la vascularisation rénale du rat et dans certains tissus isolés d'origine veineuse, ont confirmé l'existence de récepteurs de type ET_B vasoconstricteurs localisés sur le muscle lisse vasculaire (MORELAND *et al.*, 1992). Le groupe de WARNER *et al.* (1993) a donc suggéré la sous-classification ET_{B1} pour le récepteur endothélial responsable de la vasodilatation (DOUGLAS *et al.*, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 1991; SAKURAI *et al.*, 1990), et ET_{B2} pour le récepteur situé sur le muscle lisse vasculaire responsable de la vasoconstriction (SUDJARWO *et al.*, 1993; BIGAUD & PELTON, 1992; CRISTOL *et al.*, 1993). En se basant sur des données pharmacologiques, il semble que les deux sous-types de récepteurs ET_B ne soient pas des entités distinctes du point de vue moléculaire (CLOZEL *et* GRAY, 1995). De plus, MIZUGUCHI *et al.*, (1997) ont montré chez les souris normaux que les réponses pharmacologiques hétérogènes du récepteur ET_B comme la réponse vasodilatatrice de l'aorte sensible au PD142893 et la réponse contractile résistante au PD142893 mais sensible à la sarafotoxin S6c

du fundus gastrique sont complètement absents chez les souris ET_B-knockout; cependant, les auteurs ont conclu que ces réponses hétérogènes sont médiées via des récepteurs dérivés du même gène du récepteur ET_B.

D'autre part, la différence pharmacologique observée entre les deux sous-types pourrait être due aussi à des différences entre les espèces ou à des modifications post-traductionnelles des récepteurs, comme la glycosylation, qui serait différente en fonction de la localisation tissulaire de ceux-ci (CLOZEL *et* GRAY, 1995).

Le récepteur de type ET_B, en plus de ses rôles de vasodilatateur et de vasoconstricteur, a aussi été associé à la clairance de l'endothéline plasmatique surtout au niveau des poumons (FUKURODA *et al.*, 1994). L'antagoniste sélectif des récepteurs ET_B, le BQ-788 et non l'antagoniste sélectif des récepteurs ET_A, le BQ-123, semble inhiber l'accumulation de l'ET-1 radioactif dans les poumons et les reins, suggérant ainsi la clairance de l'ET-1 de la circulation. Le mécanisme de clairance de l'ET-1 médié par les récepteurs de types ET_B est un phénomène très prononcé au niveau des poumons, du fait que 80% de l'ET-1 qui passe à travers cet organe est retenue (FUKURODA *et al.*, 1994).

Les niveaux d'expression des récepteurs sont en parallèle avec la régulation des niveaux d'ET. Par exemple, l'hypoxie provoque une augmentation de l'ET-1 et des récepteurs de type ET_A dans les cellules endothéliales et le muscle lisse vasculaire respectivement (SIMONSON, 1993). De plus, des agents comme l'insuline (FRANK *et al.*, 1993) et l'oxyde

nitrique (REDMOND *et al.*, 1996) augmentent l'expression des récepteurs ET_A dans les cellules du muscle lisse. Cependant, dans les cellules endothéliales, l'expression des récepteurs ET_B augmente en présence de TNF- α et du bFGF (facteur de base pour la croissance des fibroblastes) (SMITH *et al.*, 1998; LEVIN, 1995). Le niveau d'expression du récepteur ET_B sur les cellules du muscle lisse peut aussi augmenter dans certaines pathologies cardiovasculaires tel que l'hypertension (BATRA *et al.*, 1993). Ainsi, une interaction complexe des signaux locaux, affectant à la fois le peptide comme décrit précédemment ainsi que le récepteur, est à la base de la régulation du système endothélinien (KEDZIERSKI et YANAGISAWA, 2001).

La distribution vasculaire tissu-spécifique des deux types de récepteurs des endothélines contribue aux actions des trois isopeptides, comme mentionné précédemment. Il devint aussi évident que des sites de liaison saturables et à haute affinité pour l'endothéline-1 sont présents sur les membranes de divers types cellulaires. De plus, une seule étude menée par HOSHER *et al.* (1992) a suggéré la présence de sites de liaison de haute affinité à l'endothéline-1 sur des noyaux isolés d'hépatocytes de foie de rat. Plus tard, des évidences cumulatives de notre groupe ont suggéré aussi la présence des récepteurs à l'ET-1 dans les noyaux des cellules cardiaques et musculaires lisses (BKAILY *et al.*, 1997a; 1997b). Néanmoins, le(s) type(s) de ces récepteurs nucléaires n'a pas été caractérisé à date. Cependant, d'autres récepteurs couplés aux protéines G ont été identifiés au niveau nucléaire, dont l'Angiotensine II (Ang II) (BOOZ *et al.*, 1992; BKAILY *et al.*, 1997b) et la

prostaglandine (BHATTACHARYA *et al.*, 1999). Ces récepteurs nucléaires sont plus sensibles à leurs agonistes par rapport aux récepteurs présents au niveau de la membrane de surface (HOSHER *et al.*, 1992; BOOZ *et al.*, 1992). L'activation de ces récepteurs semble moduler l'expression de certains gènes tel le gène de la rénine suite à l'activation des récepteurs nucléaires à l'Ang II de type AT₁ dans les cellules neuronales humaines (LU *et al.*, 1998).

1.5.5. Mécanisme de signalisation intracellulaire de l'ET-1.

La signalisation transmembranaire consiste à transmettre le signal de l'extérieur à l'intérieur de la cellule. Contrairement à la théorie classique, il est maintenant établi qu'un même récepteur peut moduler des voies distinctes de signalisation, et que la réponse induite par l'activation d'un récepteur peut varier en fonction du ligand utilisé (DUPUIS *et* PAUWELS , 2001).

La liaison de l'ET-1 à son récepteur au niveau de la membrane plasmique, possiblement au niveau de son site de liaison présent dans la région N-terminale du récepteur (SOKOLOVSKY, 1995), active une protéine G hétérotrimérique insensible à la PTX, probablement de type G $\alpha_{q/11}$ (GRAY et WEBB, 1996). Par contre, dans des cellules COS-7 transfectées par les récepteurs ET_A et ET_B respectivement (TAKIGAWA *et al.*, 1995), ainsi que dans les cellules du muscle lisse aortique du lapin (BKAILY *et al.*, 1998), les auteurs ont montré que la protéine G couplée à ses récepteurs est doublement sensible aux PTX et CTX (toxine de choléra). De plus, dans les cellules du muscle lisse utérin, le prétraitement avec la PTX abolit complètement la synthèse d'ADN induite par l'activation des récepteurs ET_A, indiquant ainsi

que ces récepteurs sont couplés à une protéine G de type G_i (BREUILLER-FOUCHE *et al.*, 1998). Cependant, le couplage de l'ET-1 à une protéine G sensible ou non à la PTX et la CTX dans les cellules du muscle lisse vasculaire humain n'est pas encore connu. La figure 5 montre les différents types de protéines G et leur classification selon leur sensibilité ou non à la PTX et la CTX. Ainsi, le couplage du récepteur à la protéine G mène par la suite à l'activation des molécules effectrices et d'une cascade de seconds messagers.

Deux types de signalisation ont été décrits pour l'ET-1 (Figure 6), i) une signalisation à court-terme, caractérisée par le couplage excitation-contraction et/ou sécrétion (BKAILY *et al.*, 1997) et ii) une signalisation à long terme, aboutissant à la croissance cellulaire (SOKOLOVSKY, 1995). Dans le premier cas, la liaison de l'ET-1 à son récepteur déclenche une série d'événements intracellulaires. D'abord, l'activation de la phospholipase C par une protéine G, cause l'hydrolyse des phosphatidylinositols en inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) (GRIENDLING *et al.*, 1989; PANG *et al.*, 1989). L' IP_3 formé provoque la libération des ions de calcium (Ca^{2+}) du réticulum endoplasmique (RE) et facilite l'entrée de plus de Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire via des canaux calciques voltage-dépendants (MAGGI *et al.*, 1990 ; TURNER *et al.*, 1989). Le DAG formé, quant à lui, est un second messenger important pour l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui pourrait par la suite phosphoryler des protéines cibles comme le canal calcique de type L, favorisant de plus l'influx calcique intracellulaire

Figure 5 Diversité des sous-unités $G\alpha$ des protéines G.

Les protéines $G\alpha$ peuvent être réparties en quatre classes, en fonction des homologies de séquence : $G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ et $G_{12}\alpha$.

La classe $G_s\alpha$ ("s" pour : stimulant l'adénylate cyclase) est composée de quatre types de sous-unités G_s , issues d'un épissage alternatif, et de la protéine G_{olf} , spécifique de l'épithélium olfactif.

La classe $G_{i/o}\alpha$ ("i" pour : inhibant l'adénylate cyclase) comporte les deux types de transducine G_{t1} et G_{t2} (des cellules en bâtonnet et en cône de la rétine), trois sous-unités G_i , trois sous-unités G_o ("o" pour : other) et la sous-unité G_z .

La classe $G_{q/11}\alpha$ est constituée de G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15} , G_{16}

La classe $G_{12}\alpha$, enfin, est formée des sous unités G_{12} et G_{13} .

Il a pu être mis en évidence que le dimère $\beta\gamma$ peut lui aussi activer ou inhiber l'activité de certains effecteurs comme certaines adénylates cyclases, des canaux ioniques ou encore la voie ras-MAP kinases.

Tiré de Yves Stehle (1996), Internet.

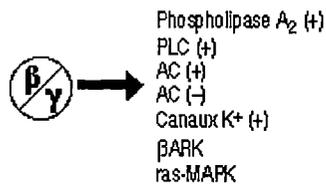
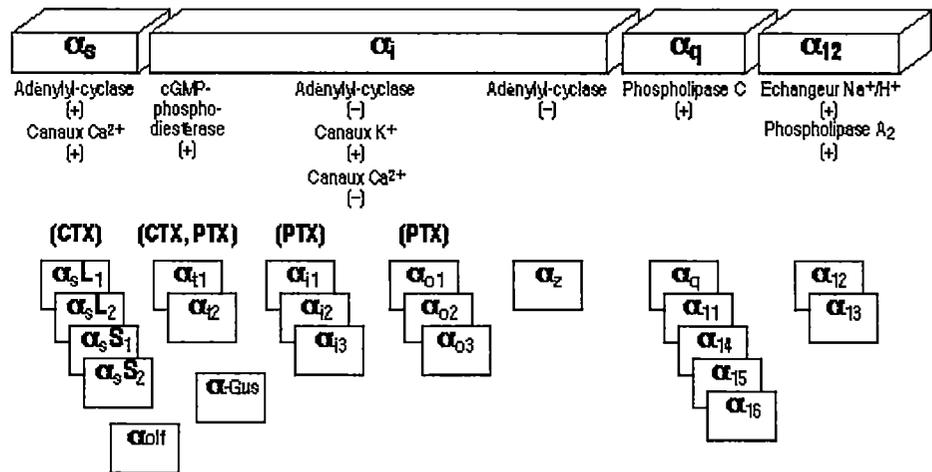
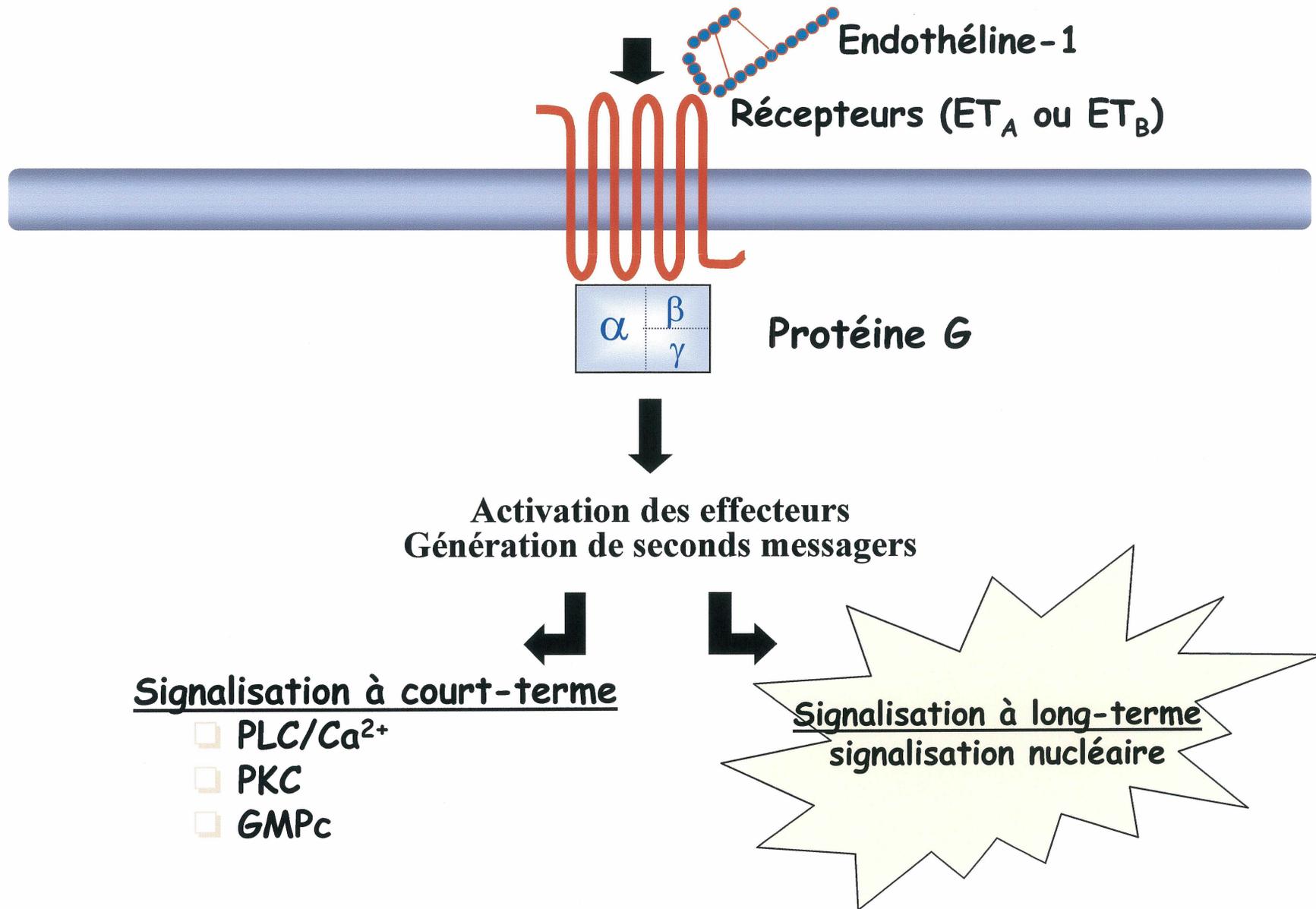


Figure 6 Mécanisme de signalisation par l'ET-1.

On distingue 2 types de signalisation par l'ET-1, i) une signalisation à court terme, caractérisée par la génération de seconds messagers et l'augmentation du calcium intracellulaire et ii) une signalisation à long terme, au cours de laquelle des processus nucléaires auront lieu tel l'expression de gènes.

Ca²⁺: calcium, PKC: protéine kinase C, PLC: phospholipase C.



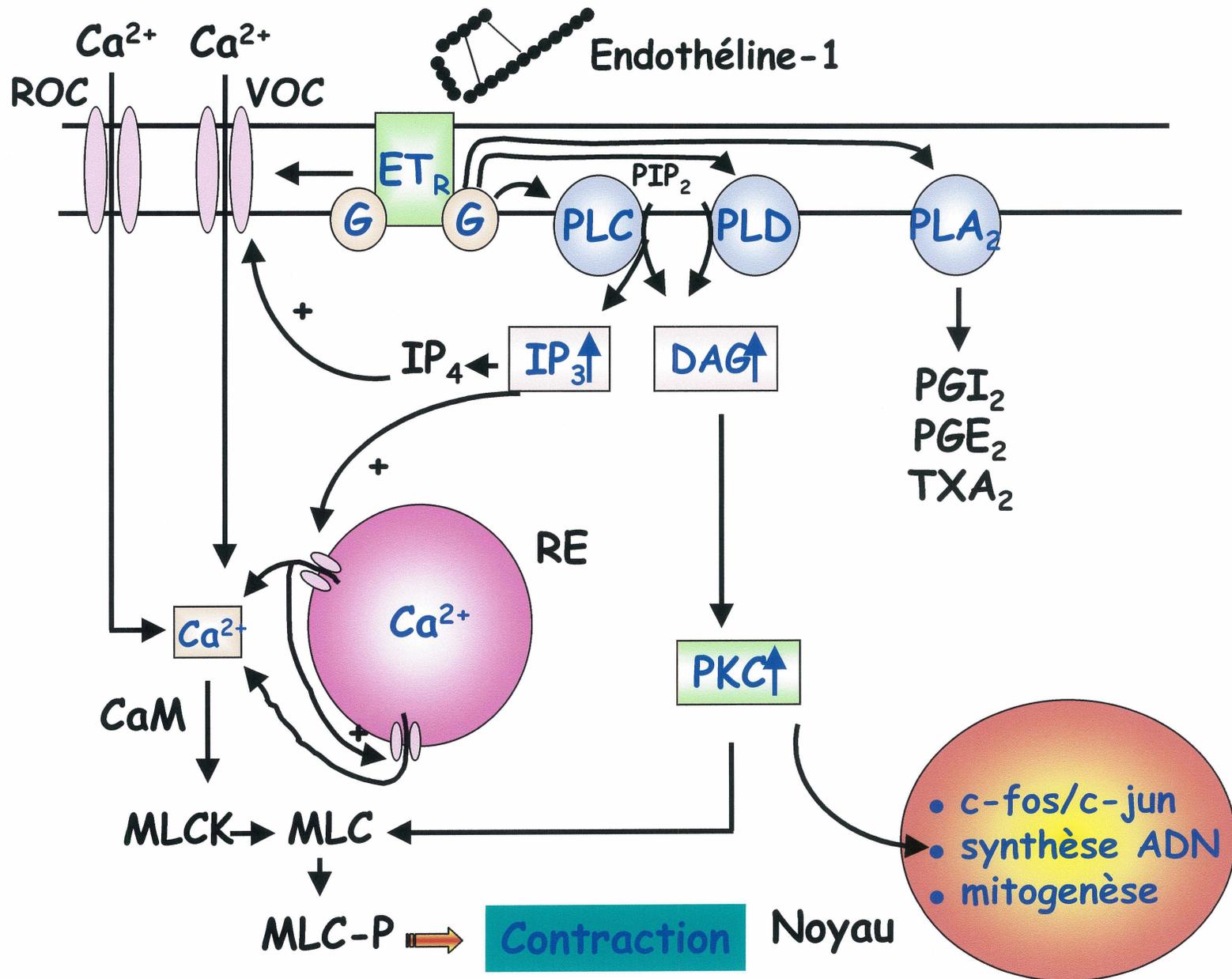
(HE *et al.*, 2000). Par conséquent, on assiste à une augmentation du taux de calcium libre cytosolique induit par l'ET-1 (EBIHARA *et al.*, 1996 ; pour revue NAMBI *et al.*, 1995). BKAILY et ses collaborateurs (1998) ont montré que l'ET-1 augmente la concentration du calcium intracellulaire, $[Ca]_i$, dans les cellules aortiques de lapin en activant les canaux calciques de type R. Cette augmentation du $[Ca]_i$, dans les CMLVs active la kinase de la chaîne légère de la myosine, stimulant ainsi la machinerie contractile intracellulaire (Figure 7), et dans les CEs le Ca^{2+} intracellulaire induit la sécrétion via l'activation d'enzymes ou autres machineries cellulaires (DE NUCCI *et al.*, 1988; NAMIKI *et al.*, 1992 ; pour revues KANAIDE, 1996 ; MILLER *et al.*, 1993 ;). Donc, le $[Ca]_i$ basal module l'état de sécrétion ou de contraction dans les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vasculaire, et il est vital à l'excitation-sécrétion et l'excitation-contraction, respectivement (BKAILY *et al.*, 1997a, 2000 ; pour revues DOOHAN *et al.*, 1993; REMBOLD, 1992).

Dans le deuxième cas, l'ET-1 joue un rôle mitogène pour plusieurs types cellulaires, entre autres les CMLVs (BOBIK *et al.*, 1990; HIRATA *et al.*, 1989; pour revue ROSENDORFF, 1996). Suite à la liaison de l'ET-1 à son récepteur, une cascade d'évènements intracellulaires est déclenchée, soit l'activation successive de la protéine G, la phospholipase C, la protéine kinase C, le raf-1, la MAP kinase kinase, la MAP kinase, et la translocation de cette dernière au noyau pour activer la transcription de plusieurs gènes cibles

Figure 7 Mécanismes de transduction signalétique de l'endothéline-1 dans les cellules de muscle lisse vasculaire induisant la contraction.

Ca²⁺: calcium, CaM : calmoduline, DAG: diacylglycérol, ET_R : récepteurs de l'endothéline, G: protéine G, IP₃: inositol tétraphosphate, IP₃: inositol triphosphate, MLC : chaîne légère de la myosine, MLCK: kinase de la chaîne légère de la myosine, MLC-P : phosphatase de la chaîne légère de la myosine, PGE₂ : prostaglandine E₂, PGI₂ : prostacycline, PIP₂: inositols phosphates, PKC: protéine kinase C, PLA₂ : phospholipase A2, PLC: phospholipase C, PLD: phospholipase D, RE: réticulum endoplasmique, ROC: canal opéré par un récepteur, TXA₂ : thromboxane A₂, VOC: canal opéré par voltage.

Modifié de POLLOCK et al., 1995.



impliqués dans la prolifération cellulaire, tel les gènes des facteurs de transcription, c-myc et c-jun (pour revues DOUGLAS et OHLSTEIN, 1996; GOTO *et al.*, 1996). De plus, WANG *et al.* (1992) ont montré que l'ET-1 active la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) dans les cellules mésangiales de rat, et ce processus induit de plus l'activation d'une protéine kinase C (PKC) et d'une tyrosine kinase.

1.5.6. Implication de l'ET-1 dans l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B.

Comme déjà mentionné dans les sections précédentes, les effets physiologiques multiples de l'ET-1 sont médiés par l'activation d'au moins deux types de récepteurs couplés aux protéines G, ET_A et ET_B (SAKURAI *et al.*, 1992). Dans le vaisseau, les récepteurs ET_A sont présents dans les cellules du muscle lisse et médient une vasoconstriction prolongée (MARSAULT *et al.*, 1993; BKAILY *et al.*, 1994), tandis que les récepteurs ET_B sont présents au niveau de la sarcolème des cellules endothéliales, et sont primordialement considérés comme médiateurs d'une vasodilatation NO-dépendante (YANAGISAWA et MASAKI, 1989). Ces récepteurs jouent également un rôle dans la clairance de l'ET-1 plasmatique de la circulation (DUPUIS *et al.*, 1996 ; FUKURODA *et al.*, 1994; OPGENORTH *et al.*, 2000 et BERTHIAUME *et al.*, 2000).

En se basant sur ces données, plusieurs études récentes ont tenté de découvrir le mécanisme moléculaire pouvant être impliqué dans la différence

de réponse physiologique de l'ET-1 suite à l'activation de ces deux récepteurs connus.

Tout d'abord, le groupe de CHUN (1994) a démontré dans les cellules COS en utilisant la microscopie confocale, une co-localisation du récepteur ET_A et de la cavéoline (protéine structurale des caveolae, invaginations membranaires) dans des micropatches au niveau ou proches de la membrane plasmique. De plus, il a été rapporté que l'ET-1 reste intacte pendant une heure après l'internalisation et reste couplée au récepteur ET_A (SAWAMURA *et al.*, 1990). Ces résultats suggèrent un rôle de ces vésicules dans l'internalisation du complexe ET-1/ ET_A -R, et que la transduction du signal peut avoir lieu dans les caveolae internalisées avec le complexe ET-1/ ET_A -R; ces résultats expliquent ainsi l'effet soutenu de l'augmentation du calcium suite à la stimulation par l'ET-1 (CHUN *et al.*, 1994).

Plus tard, plusieurs études ont tenté d'étudier les voies d'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B . BHOWMICK *et al.* (1997) ont démontré dans les cellules HEK 293, en utilisant la microscopie confocale, que l'ET-1 ainsi que l'antagoniste sélectif des récepteurs ET_A (BQ-123) promouvoit l'endocytose des récepteurs ET_A . Le récepteur ET_B , quant à lui, est internalisé dans les cellules CHO (ovaire du hamster chinois) par la voie des vésicules à clathrine, suivi d'une diminution transitoire et une réapparition du R- ET_B au niveau de la membrane de surface, qui est due à une synthèse protéique *de novo* (OKSCHE *et al.*, 2000). Par contre, ABE *et al.* (2000) ont étudié la localisation ainsi que l'internalisation subcellulaire des récepteurs à

l'ET-1 dans plusieurs lignées cellulaires transfectées par ET_A-GFP (protéine fluorescente verte), et/ou ET_B-GFP. Ils ont montré que les récepteurs ET_A-GFP sont prédominants au niveau de la membrane plasmique, alors que les récepteurs ET_B-GFP se trouvent aussi dans des vésicules intracellulaires contenant Lamp-1 (marqueur lysosomal). La délétion de la queue cytoplasmique des deux récepteurs ET_A et ET_B emmène à la localisation dans des vésicules intracellulaires suivie d'une dégradation (ABE *et al.*, 2000). Leurs résultats ont montré que le récepteur ET_A possède, dans la queue cytoplasmique, un signal responsable de son ancrage dans la membrane plasmique. Par contre, le récepteur ET_B possède un déterminant pour son internalisation et sa dégradation dans la queue cytoplasmique (ABE *et al.*, 2000). D'autre part, les auteurs ont aussi montré que l'ET-1 augmente le nombre des récepteurs ET_A et ET_B même en présence de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique), ce qui suggère qu'une stimulation prolongée avec l'ET-1 augmente le nombre intact des récepteurs ET_A et ET_B non pas en renforçant l'expression des ces protéines mais en les stabilisant (ABE *et al.*, 2000). Ces résultats sont supportés par PAASCHE *et al.* (2001) qui ont démontré que la queue cytoplasmique du récepteur ET_A est responsable de cibler le récepteur à la voie de recyclage, puisque l'élimination des résidus carboxyl-terminaux du récepteur ET_A et ET_B induit une internalisation. Les deux récepteurs mutants vont s'accumuler dans les lysosomes après 60 min d'internalisation, suggérant ainsi que les signaux impliqués dans le triage vers une voie d'internalisation intracellulaire résident

dans la queue cytoplasmique des récepteurs ET_A et ET_B (PAASCHE *et al.*, 2001).

BREMNES *et al.* (2000) ont montré dans les cellules COS, que les récepteurs ET_A et ET_B s'internalisent rapidement suite à leur stimulation par l'ET-1. Le processus d'internalisation dépend de GRK (kinase des récepteurs couplés aux protéines G), l'arrestine, la dynamine et la clathrine. Les récepteurs ET_A et ET_B internalisés sont dirigés aux endosomes précoces positifs à la protéine Rab 5. Par contre, à partir de cette localisation chaque récepteur se dirige vers une voie distincte (BREMNES *et al.*, 2000). Les récepteurs ET_B sont dirigés vers un compartiment de recyclage péricentriolaire et colocalisent avec la transferrine, ce qui est suivi d'une réapparition subséquente au niveau de la membrane plasmique (BREMNES *et al.*, 2000). Par contre, les récepteurs ET_A sont dirigés vers les endosomes tardifs positifs au Lamp-2 et ensuite aux lysosomes pour la dégradation après de longues périodes d'internalisation. (BREMNES *et al.*, 2000).

Finalement, et très récemment, des études menées par LEE *et al.* (2001) ont montré un rôle particulier du récepteur ET_A internalisé suite à la stimulation avec l'ET-1 dans les cellules COS. Ces auteurs ont montré que la stimulation de l'ET-1 induit la redistribution de tip60 (protéine acétylase) et HDAC7 (protéine désacétylase) du noyau vers une région périnucléaire où ces protéines colocalisent avec le récepteur internalisé de type ET_A. Ces auteurs ont suggéré ainsi que l'afflux des protéines acétylases et désacétylases du noyau pourrait moduler la transcription de certains gènes en réponse à l'ET-1

comme c-jun et c-fos ou que l'interaction de tip60 et HDAC7 avec le récepteur ET_A pourrait affecter la voie de signalisation cytoplasmique de l'ET-1, comme la phosphorylation de ERK (kinase régulée par un signal extracellulaire).

Alors, le recyclage rapide des récepteurs ET_A (BREMNES *et al.*, 2000), et /ou la stabilisation des ces récepteurs (ABE *et al.*, 2000) pourraient fournir une base pour la réponse contractile prolongée médiée via l'activation de ces types de récepteurs. Par contre, le ciblage des récepteurs ET_B vers les lysosomes pourrait apporter les évidences courantes suggérant un rôle de ces récepteurs dans la clairance de l'ET-1 de la circulation (BREMNES *et al.*, 2000).

1.5.7. Implication de l'ET-1 dans le contrôle du tonus vasculaire.

Plusieurs indications semblent suggérer l'implication de l'ET-1 endogène dans la régulation du tonus vasculaire. L'administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs ET_A, le BQ-123, dans l'avant-bras de volontaires sains provoque une augmentation dans le débit sanguin au niveau de l'avant-bras (HAYNES *et* WEBB, 1994). L'administration d'un antagoniste commun pour les récepteurs ET_A/ET_B, le TAK-044, provoque une diminution de la pression sanguine systémique chez l'homme (HAYNES *et al.*, 1996). Un effet hypotenseur similaire est noté chez le cochon d'inde suite à l'administration des antagonistes des récepteurs ET_A (VENIANT *et al.*, 1994) et chez les rats suite au blockage des ECEs de l'ET-1 par le phosphoramidon (MCMAHON *et al.*, 1991). Ceci montre clairement que l'endothéline

endogène, via son récepteur ET_A vasoconstricteur, participe au maintien du tonus vasculaire et que le blocage de cet effet induit une vasodilatation.

La production de différents facteurs vasoactifs par l'endothélium, comme le NO, la prostacycline et l'endothéline-1, est régulée de façon simultanée, ce qui suggère qu'un déséquilibre dans la production de l'un ou l'autre de ces facteurs engendre des mécanismes compensatoires dans le but de maintenir l'homéostasie cardiovasculaire (GRIENGLING *et* ALEXANDER, 1996).

Ainsi, comme mentionné précédemment, l'ET-1 stimule la production de NO et de prostacycline vasodilatateurs et ces deux facteurs inhibent la production d'ET-1 par l'endothélium via leurs seconds messagers respectifs, le GMPc et l'AMPc. Ces mécanismes régulateurs démontrent bien l'importance de ces trois agents dans le contrôle du tonus vasculaire par l'endothélium.

1.5.8. Implication de l'ET-1 dans la prolifération cellulaire.

L'endothéline semble moduler plusieurs fonctions cellulaires via l'activation de ses récepteurs au niveau de la membrane cellulaire, dont i) le cycle cellulaire et ii) l'apoptose.

1.5.8.1. La prolifération cellulaire.

1.5.8.1.1. Mécanismes moléculaires de régulation de la prolifération cellulaire.

La prolifération cellulaire est un processus hautement régularisé. Jusqu'à ce jour, deux niveaux essentiels de régularisation ont été identifiés : une régulation par la voie de p42/p44 MAPKs et une régulation au cœur même du cycle cellulaire.

1.5.8.1.1.1. La voie des MAPKs.

Chez les cellules des mammifères, le premier module MAPK découvert fut celui de p42/p44 MAPKs. En effet, c'est en 1987 que l'on identifie deux protéines de 42 et 44 kDa dont l'activité sérine-thréonine kinase est rapidement induite dans les adipocytes 3T3-Li stimulés à l'insuline (RAY *et STURGILL*, 1987). Par la suite, d'autres modules MAPK sont venus se joindre au groupe, celui de la p38 MAPK (HAN *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1994) et des p46/p54 JNK_(s) (DÉRIJARD *et al.*, 1997; KYRIAKIS *et al.*, 1994).

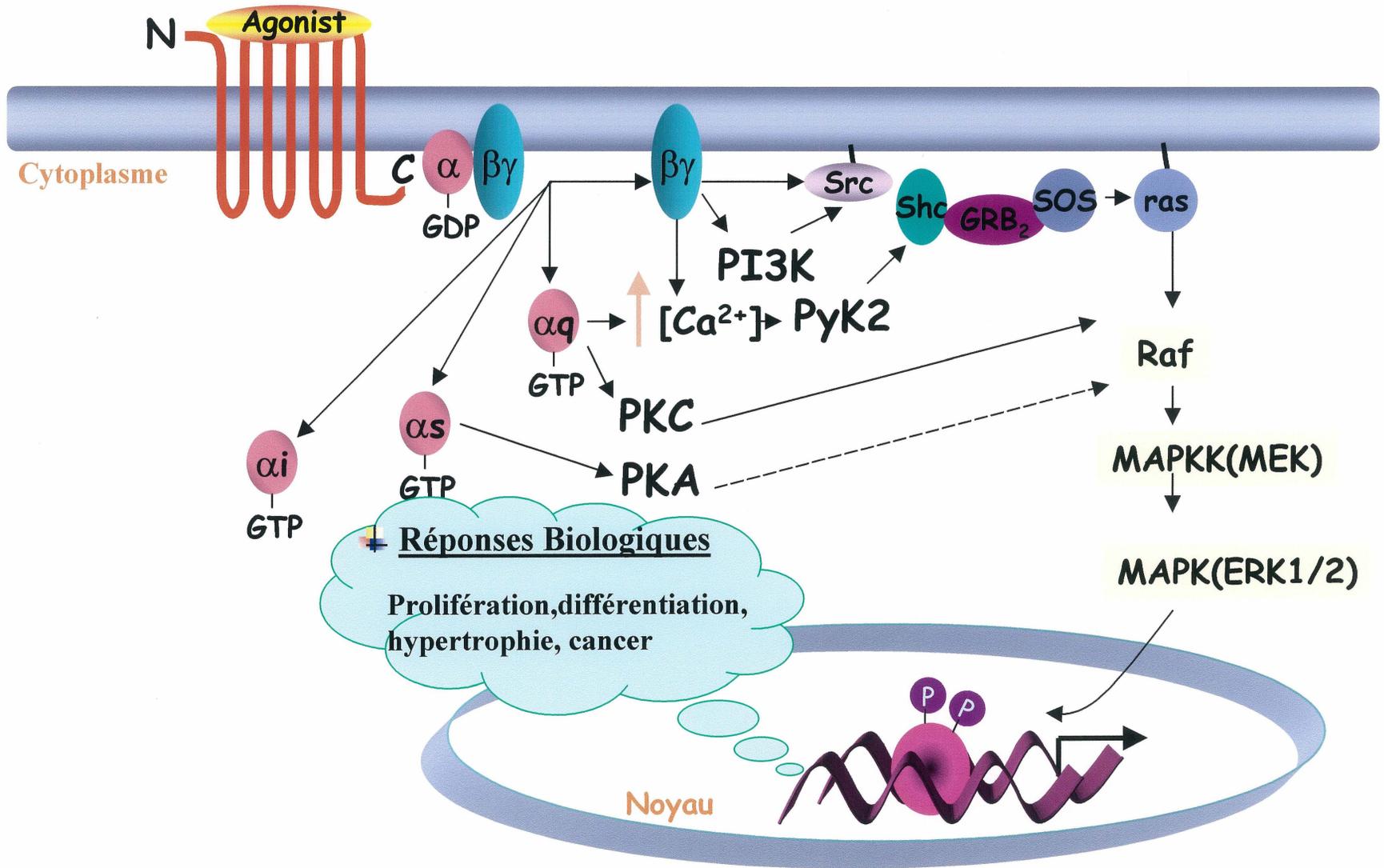
1.5.8.1.1.2. Signalisation par la voie des p42/p44 MAPKs.

Les p42/p44 MAPKs traduisent les signaux mitogéniques provenant de la liaison des facteurs de croissance et des hormones à leurs récepteurs. En effet, les récepteurs possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque et les récepteurs couplés aux protéines G vont amener, suite à leur propre stimulation, l'activation de ce module MAPK. La figure 8 schématise les joueurs responsables de l'activation des p42/p44 MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G (MARINISSEN *et GUTKIND*, 2001).

Figure 8 Activation des p42/p44 MAPKs par les récepteurs couplés aux protéines G.

La voie classique de stimulation des protéines ubiquistes p42/p44 MAPK(s) consiste en l'activation de la petite protéine G membranaire RAS, qui dans son état liant le GTP, recrute la MAPKKK, Raf, à la membrane qui à son tour va permettre la stimulation des MAPKK, MEK1 et MEK2, qui seront responsables de la phosphorylation sur la thréonine-183 et la tyrosine-185 des ERK1 et ERK2, cette double phosphorylation étant essentielle à leur activité. Les p42/p44 MAPK(s) activées seront responsables de la transmission du signal du cytoplasme au noyau puisqu'elles transloquent elles-mêmes au noyau pour aller directement activer les facteurs de transcription.

Traduit et modifié de Marinissen et Gutkind (2001).



1.5.8.1.1.3. Rôles des p42/p44 MAPK(s).

Dans les études antérieures, il a été clairement démontré que seuls les agents mitogéniques étaient aptes à provoquer une stimulation biphasique et soutenue des p42/p44 MAPKs; un premier pic d'activation entre 5-10 minutes suivi d'une activation soutenue pouvant durer jusqu'à six heures (KAHAN *et al.*, 1992). Cette activation soutenue des p42/p44 MAPKs corrèle avec leur translocation nucléaire (LENORMAND *et al.*, 1998). L'activation soutenue (PAGÈS *et al.*, 1993) et la translocation (BRUNET *et al.*, 1999) des p42/p44 MAPKs sont des prérequis essentiels pour la prolifération cellulaire observée dans plusieurs types cellulaires (ROBINSON et COBB, 1997). En plus de leur rôle majeur dans la prolifération cellulaire, les p42/p44 MAPKs semblent jouer un rôle important dans la transduction des signaux de différenciation; dans les cellules PC12, une lignée cellulaire issue de phéochromocytome de rat, l'activation des p42/p44 MAPK est nécessaire et suffisante pour l'élongation neuritique (COWLEY *et al.*, 1994) tandis que l'inactivation de cette cascade MAPK semble inhiber la différenciation des cellules épithéliales intestinales (CRISTOBAL ALIAGA *et al.*, 1999).

Enfin, on attribue de plus en plus un rôle de protection contre l'apoptose (mort cellulaire programmée) aux p42/p44 MAPKs (XIA *et al.*, 1995). L'activation de celles-ci par le FGF-2 protège les cellules L929 contre l'apoptose induite par le TNF- α (GARDNER *et al.*, 1996) et leur simple

inhibition suffit à entraîner les cellules Hela dans un processus apoptotique (BERRA *et al.*, 1998).

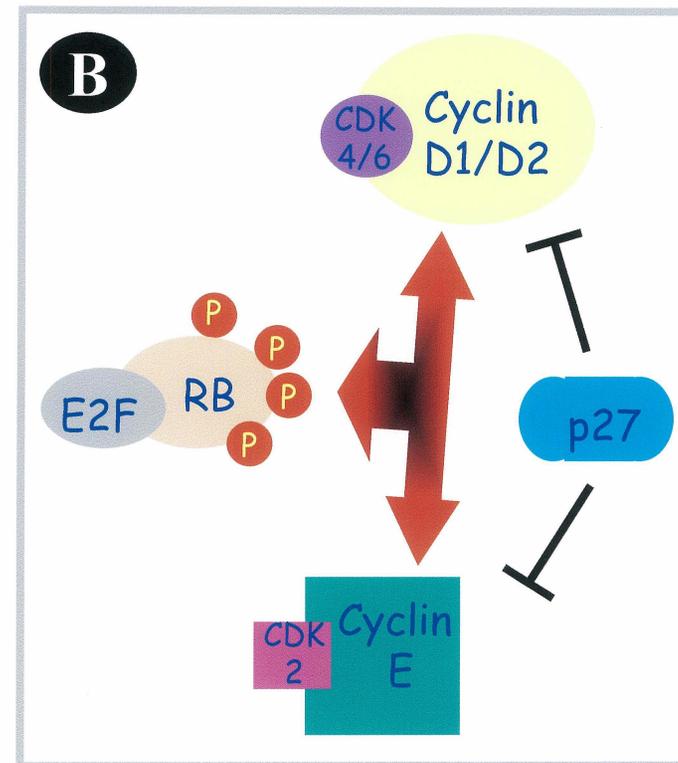
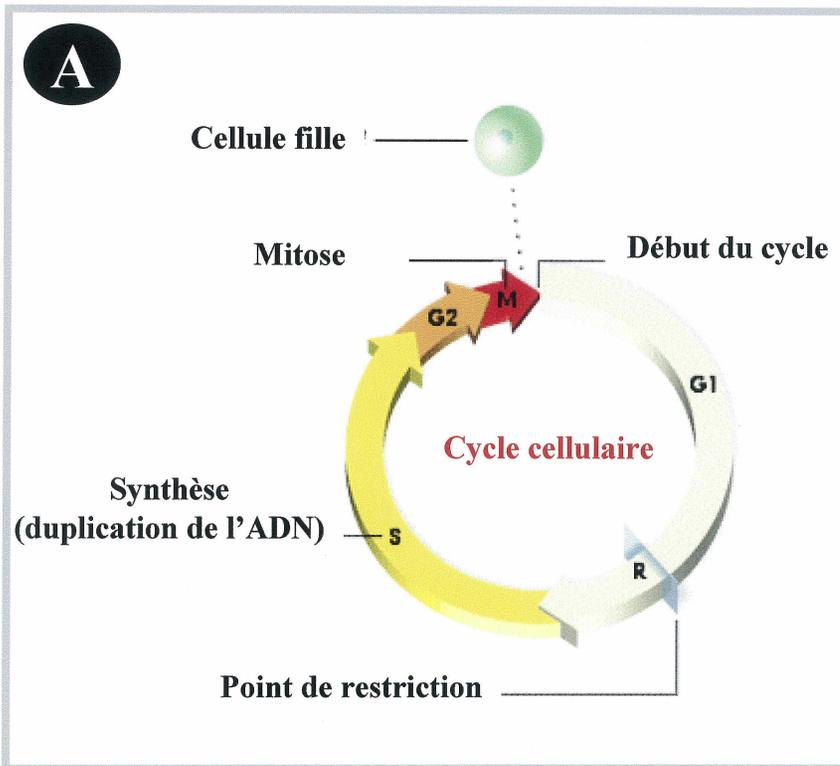
1.5.8.1.2. Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel toute espèce vivante se propage et par lequel les cellules âgées, endommagées ou mortes par apoptose sont remplacées. Il est constitué de différentes phases : G1, S, G2 et M (Figure 9A).

La phase G1 est caractérisée par l'expression des gènes et la synthèse protéique. La phase G1 est située entre la fin d'une mitose et le début de la phase S (SHERR, 1994). Cette phase est régulée primordialement par des stimuli extracellulaires (mitogènes et adhésion). Elle permet à la cellule de doubler sa masse et de dupliquer son contenu protéique. Lorsque la cellule a effectué ces changements, elle est donc prête à entamer la phase de synthèse d'ADN, phase S, où la cellule passe d'un contenu de 2N à 4N. La dernière phase avant la mitose, phase G2, représente celle où la cellule s'assure de la réplication adéquate de l'ADN essentielle pour la subdivision égale entre les deux cellules filles issues de la mitose (SHERR, 1994). La phase M du cycle cellulaire comprend deux étapes : une division nucléaire préparée et effectuée lors de prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase, et une division cytoplasmique lors de la cytotélorèse qui marque la fin de la phase M. Ainsi, au terme de cette phase, deux cellules filles au contenu 2N sont formées. Il peut également exister une phase G0 qui peut être empruntée par

Figure 9 Régulation du cycle cellulaire.

*Illustré par George Eade et tiré du site internet :
<http://www.geocities.com/CollegePark/Lab/1580/cycle.html>*



les cellules en phase G1 et met un frein à leur progression dans le cycle cellulaire, les cellules devenant ainsi quiescentes (SHERR, 1994).

1.5.8.1.2.1. Assemblage des complexes cycline/cdk de la phase G1.

La phase G1 du cycle cellulaire est un épisode hautement régularisé (Figure 9B). Cette fine régulation est accomplie en grande partie par les cyclines de la phase G1 (D1, D2, D3 et E) et leur sous-unité catalytique, les kinases dépendantes des cyclines (cdk4/cdk6 et cdk2) (SHERR, 1993).

Suite à une stimulation mitogénique, on assiste, dès la transition G0/G1 et jusqu'à la frontière G1/S, à une synthèse de la cycline D, qui en se liant à sa sous-unité catalytique, la cdk4 ou cdk6, en plus de la phosphorylation par la kinase activatrice des cdks (CAK), permet l'activation du complexe qui débute à la mi-G1 et se poursuit jusqu'à la G1/S (SHERR, 1994; MATSUSHIME *et al.*, 1994; LADHA *et al.*, 1998). Ce complexe actif permet alors la progression de la phase G1 en phosphorylant la protéine du rétinoblastome, pRB, qui, dans cet état hyperphosphorylé, perd sa capacité de séquestrer les facteurs de transcription de la famille E2F qui régulent plusieurs gènes dont les produits sont nécessaires pour la régulation des phases G1 et S du cycle cellulaire (cycline E) ou pour la réplication de l'ADN (histone H2A) (NEVINS, 1992). Contrairement au complexe cycline E-cdk-2, pRB semble être l'unique substrat du complexe enzymatique cycline D-cdk4/6 (SHERR et ROBERTS, 1995). Les cyclines D sont considérées comme des senseurs

d'agents mitogéniques; ce sont elles qui démarrent la machinerie du cycle cellulaire (SHERR, 1993).

Vers la fin de la phase G1 et au début de la phase S, la cycline E appuie la cycline D dans la progression du cycle (SHERR, 1993). La cycline E associée à sa sous unité catalytique cdk2 participe elle aussi à la phosphorylation de pRb (Ohtsubo *et al.*, 1995).

Pour prouver le rôle des cyclines dans la progression de la phase G1, une étude a confirmé que la surexpression des cyclines D et E diminuait la durée de la phase G1, diminuait le volume cellulaire et réduisait le besoin en facteurs de croissance pour la transition de la phase G1 à la phase S (OHTSUBO et ROBERTS, 1993).

1.5.8.1.2.2. Les inhibiteurs du cycle cellulaire.

Il existe quatre mécanismes gouvernant l'activité des cdks. Comme décrit dans la section précédente, le premier mécanisme repose sur la liaison de la cdk avec la cycline. Subséquemment, l'activation définitive survient suite à la phosphorylation par la CAK (FISHER et MORGAN, 1994). Cependant, des kinases régulatrices tels Wee1 peuvent se mettre de la partie pour inhiber l'activité des complexes qui peut toutefois être activée suite à l'action des phosphatases de la famille cdc25 (MORGAN, 1997). Un dernier mécanisme de régulation repose sur l'expression d'inhibiteurs des complexes cycline-cdk (CKI : cycline- kinase inhibitor). Ces derniers sont regroupés en deux familles selon leur mode d'action et leurs cibles (SHERR et ROBERTS, 1999). On

distingue la famille INK4 et la famille Cip/Kip (cdk inhibitory protein ou encore kinase inhibitory protein) (SHERR et ROBERTS, 1999). La famille INK4 inclut les inhibiteurs p16^{ink4} et p15^{ink}; leur rôle est essentiel dans l'inhibition de l'action de cdk4/6 (SHERR et ROBERTS, 1999). Les membres de la famille Cip/Kip sont p21, p27 et p57. Les protéines p21 et p27 sont exprimées d'une façon ubiquitaire, tandis que l'expression de p57 se limite à quelques tissus (notamment le placenta, le cœur, et le cerveau), suggérant un rôle spécialisé de cet inhibiteur dans le contrôle du cycle cellulaire (SHERR et ROBERTS, 1995). Contrairement à p21, l'expression de p27 est élevée dans les cellules quiescentes et décline durant la transition G0/S (FIRPO *et al.*, 1994; NOURSE *et al.*, 1994). p27 jouerait également un rôle dans le maintien de la quiescence (RIVARD *et al.*, 1996; LADHA *et al.*, 1998). La famille Cip/Kip joue un rôle essentiel dans la suppression de l'activité kinase du complexe cycline E-cdk2 (SHERR et ROBERTS, 1999). En accordance, l'induction de p27^{Kip} et p21^{Cip/Waf1}, dans les cellules artérielles musculaires lisses humaines, est associée avec un arrêt complet du cycle cellulaire (KOYAMA *et al.*, 1996).

1.5.8.2. Rôle de l'ET-1 dans la prolifération cellulaire.

Plusieurs études montrent une interaction entre les RCPGs et les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) à des niveaux différents (LUTTRELL *et al.*, 1999 et SAMAIN *et al.*, 2000). La cascade de signalisation de la voie des MAPKs est activée par les facteurs de croissance

comme bFGF et PDGF (INDOLFI *et al.*, 1995 et GOLOMB *et al.*, 1996) et de cette façon semble être impliquée dans la régulation du comportement des cellules du muscle lisse (INDOLFI *et al.*, 1995 et GOLOMB *et al.*, 1996); de plus, la forme active phosphorylée des ERK1/2 a été aussi détectée dans les lésions néointimales des artères de rat (INDOLFI *et al.*, 1995 et GOLOMB *et al.*, 1996). Ces évidences indiquent que la voie des MAPK joue un rôle important dans la régulation du remodelage de la paroi vasculaire au cours de ces processus (MOSES *et al.*, 2001).

Outre son rôle bien documenté dans la contraction du muscle lisse vasculaire, le calcium est aussi impliqué dans la régulation des activités enzymatiques (CARFOLI *et al.*, 1999), et l'expression des gènes (HARDINGHAM *et al.*, 1997) et dans le cycle cellulaire (MEANS, 1994). Les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires peuvent affecter l'expression des gènes via différentes voies (HARDINGHAM *et al.*, 1997); de plus, l'activation des MAPKs et de la kinase dépendante du complexe Ca^{2+} -calmoduline est due principalement à la relâche du Ca^{2+} des réserves intracellulaires (CHAO *et al.*, 1992 et ABRAHAM *et al.*, 1996). L'inhibition de la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique avec la thapsigargine prévient la prolifération ainsi que la migration des cellules du muscle lisse (SHORT *et al.*, 1993), suggérant ainsi la nécessité de ces réserves calciques intracellulaires dans ces processus.

Dans le système cardiovasculaire, les molécules régulatrices du cycle cellulaire sont les cibles d'un réseau de signalisation intracellulaire reliant la voie des MAPKs et l'endothéline (PETKOVA *et al.*, 2000).

Dans les cellules du MLVh, l'effet primordial de l'ET-1 est médié via l'activation du récepteur ET_A, engendrant la vasoconstriction et la prolifération du muscle lisse (DOUGLAS *et* OHLSTEIN, 1996). L'ET-1 active la voie des MAPK et le facteur de transcription AP-1 (activator protein-1) promouvant ainsi la prolifération du muscle lisse (DOUGLAS *et* OHLSTEIN, 1997). De plus, la présence d'un site de liaison pour AP-1/jun dans la région 5' du gène de l'ET-1 amène à l'induction rapide de l'ARNm de l'ET-1 (MIYAUCHI *et* MASAKI, 1999).

Les études sur le rôle potentiel de l'ET-1 dans la modulation des structures cardiovasculaires se concentrent surtout sur le rôle de l'ET-1 dans l'induction de la prolifération du muscle lisse (PETKOVA *et al.*, 2000). L'ET-1 stimule l'hypertrophie des cellules du muscle lisse, la synthèse protéique ainsi que l'incorporation de la thymidine tritiée (³H). Ces effets de l'ET-1 sont médiées d'une part grâce à l'activation des récepteurs ET_A des CMLVs (DOUGLAS *et* OHLSTEIN, 1997; GUARDA *et al.*, 1993).

La relation entre l'ET-1 et l'induction des molécules du cycle cellulaire a été explorée récemment, et il semble que ERK et la protéine kinase C sont impliqués dans l'athérosclérose (SUZUKI *et al.*, 1999). La lésion vasculaire induit la prolifération, la migration et la production des

constituants de la matrice extracellulaire par les CMLVs, ces phénomènes résultant dans l'hyperplasie néointimale (BAUTERS *et al.*, 1997).

Autre que la voie des MAPKs, l'ET-1 module aussi les protéines régulatrices du cycle cellulaire. HAFIZI *et al.* (1999) ont montré dans les cellules du muscle lisse de l'artère coronaire que l'ET-1, à une concentration de 10^{-7} M, stimule l'expression de la protéine cycline D₁ après 24 h, et que cet effet est médié via l'activation des récepteurs ET_A, puisque l'antagoniste des récepteurs ET_A, le BQ-123, inhibe la synthèse protéique induite par l'ET-1. D'autre part, dans les cellules du MLV aortique humain, l'ET-1 active la voie de la MAPK mais n'a pas d'effet sur les protéines régulatrices du cycle cellulaire comme cdk2, p27^{kip1} et pRb (YANG *et al.*, 1999). Par contre, l'ET-1 potentialise la prolifération de ces cellules induite par le PDGF surtout en activant les récepteurs ET_A (YANG *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que l'ET-1 exerce, selon le type cellulaire, un effet co-mitogène ou mitogène en stimulant la prolifération cellulaire non seulement via l'activation de la voie de MAPK mais aussi en induisant la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire.

1.5.8.3. L'apoptose.

1.5.8.3.1. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée qui a été désignée comme un processus physiologique qui survient lorsqu'une cellule, à l'intérieur d'un organisme, meurt par un mécanisme orchestré par des

protéines codées par son propre génome (VAUX et STASSER, 1996). Elle permet l'élimination de cellules endommagées ou potentiellement dangereuses pour l'organisme. Par conséquent, l'apoptose est un processus essentiel au maintien tissulaire (VAUX *et* STASSER, 1996). Elle est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une vacuolisation membranaire, une condensation de la chromatine, une dégradation de l'ADN dans les régions internucléosomiques, un désassemblage d'organites cellulaires et une fragmentation nucléaire (Figure 10). Toutes ces étapes sont suivies par la formation de corpuscules apoptotiques (SAINI *et* WALKER, 1998).

L'apoptose est inhérente à chaque cellule et se manifeste suite à certains stimuli tels les agents génotoxiques (oxydants, irradiations), les toxines, les infections virales, ainsi que les chocs thermiques et osmotiques (SAINI *et* WALKER, 1998).

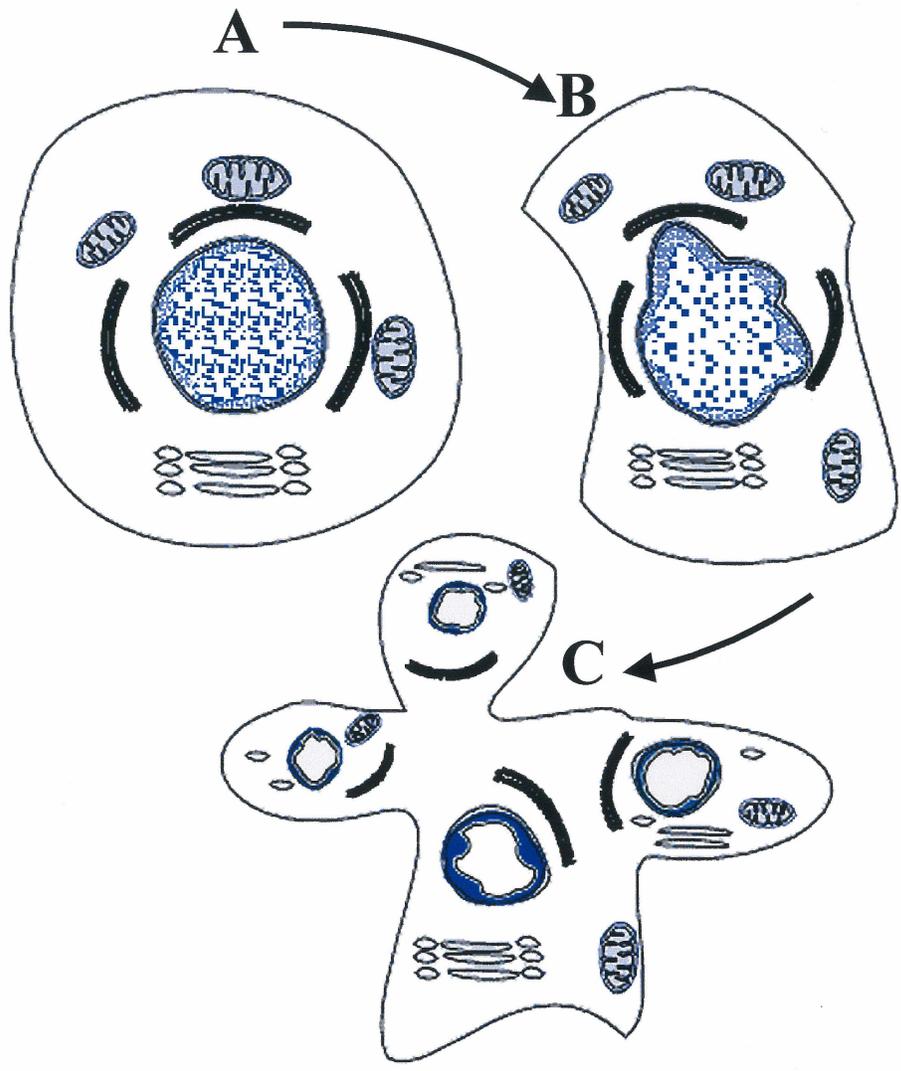
L'absence de signaux de survie déclenche également l'apoptose. Par conséquent, la survie cellulaire n'est pas un processus passif. Au contraire, elle demande une constante activation conférée par certaines hormones (WU *et al.*, 1995), cytokines (WALLEN *et al.*, 1991), facteurs de croissance (XIA *et al.*, 1995) et l'adhésion cellulaire (FRISH *et* FRANCIL, 1994).

Paradoxalement, l'apoptose peut également être induite par certaines hormones et cytokines selon le type cellulaire étudié (SAINI *et* WALKER, 1998). La survie cellulaire est donc le résultat de l'intégration de tous les signaux anti-et pro-apoptotiques qui affluent simultanément vers la cellule.

Figure 10 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.

Schéma représentant les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Dans une cellule normale (A) et suite à l'induction de l'apoptose, la cellule subit différents changements morphologiques caractérisés par un rétrécissement cellulaire, une vacuolisation membranaire et une condensation de la chromatine (B). Suite à ces changements morphologiques, la cellule se fragmente en corpuscules apoptotiques (C).

Tiré et modifié de Boehringer Mannheim, Apoptosis and cell proliferation, 1998.



Cette intégration se fait principalement par la famille de protéines apparentées appelée la famille des homologues Bcl-2 (REED, 1998).

Par conséquent, les homologues Bcl-2 sont responsables de la phase décisionnelle de l'apoptose. Une fois qu'une cellule est vouée à l'apoptose, il y a activation d'une famille de protéases à haute spécificité nommées caspases (REED, 1998). Leur activité protéolytique est responsable du démantèlement cellulaire observé au cours de l'apoptose. C'est donc dire que les caspases sont responsables de la phase effectrice de l'apoptose (REED, 1998).

La compréhension de l'apoptose est devenu essentielle dans l'explication de plusieurs processus biologiques fondamentaux comme ceux impliquant une variété de fonctions et maladies cardiovasculaires (PACHER *et al.*, 2001). La mort cellulaire par apoptose est un processus normal dans la morphogenèse postnatale du système de conduction cardiaque chez l'homme (JAMES, 1994). De plus, plusieurs évidences semblent attribuer un rôle important à l'apoptose dans une multitude de maladies cardiovasculaires incluant la défaillance cardiaque (JAMES, 1998), l'infarctus du myocarde (HAUNSTETTER *et* IZUMO, 1998) et l'athérosclérose (KOCKX *et* HERMAN, 2000). Bien que le mécanisme d'action ne soit pas clairement défini, des études récentes supportent un rôle de l'ET-1 non seulement dans la régulation de la prolifération mais également dans l'apoptose (WU-WONG *et al.*, 1997).

1.5.8.3.2. Effet de l'ET-1 sur l'apoptose.

Il a été suggéré que l'ET-1 joue un rôle important dans les désordres reliés à la croissance cellulaire, et que les antagonistes des récepteurs à l'ET-1 peuvent prévenir le remodelage ventriculaire et la formation néointimale post-angioplastique (DOUGLAS *et al.*, 1994 et SAKAI *et al.*, 1996). L'ET-1 inhibe la croissance des cellules hépatiques Ito via l'activation des récepteurs de type ET_B (MALLAT *et al.*, 1995). Cependant, WU-WONG *et al.* (1997) ont suggéré que l'ET-1 joue un rôle dans la régulation de l'apoptose dans les cellules du muscle lisse humain. L'ET-1 inhibe l'apoptose induite par le paclitaxel (agent antinéoplasique) d'une façon dose dépendante avec un EC₅₀ de l'ordre de 1nM. Cet effet est antagonisé par A-127722, un antagoniste sélectif des récepteurs ET_A (WU- WONG *et al.*, 1997). Par contre, SCHICHIRI *et al.* (1997) ont montré que l'ET-1 est un facteur antiapoptotique pour les fibroblastes et les cellules endothéliales, cet effet étant médié par les récepteurs ET_A via l'activation de la voie des MAPKs. L'effet protecteur de l'ET-1 est bloqué par un antagoniste spécifique des récepteurs ET_A, le BQ-123 et non par un antagoniste spécifique des récepteurs ET_B, le BQ-788.

D'autres travaux réalisés par SCHICHIRI *et al.* (2000) ont montré que l'ET-1 peut moduler l'apoptose dans les cellules du MLV des rats. L'ET-1 semble prévenir l'apoptose induite par l'oxyde nitrique dans les cellules du MLV ainsi que la déprivation du sérum, et cet effet anti-apoptotique est médié via l'activation des récepteurs ET_A et par la suite la voie des MAPKs. Tous ces résultats groupés ensemble semblent attribuer un rôle important à la voie des MAPKs dans la survie cellulaire en réponse à l'ET-1.

Des études récentes réalisées par WU-WONG *et al.* (2000) dans les cellules du muscle lisse de la prostate ont démontré que ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase) sont des médiateurs en aval impliqués dans l'effet antiapoptotique de l'ET-1. Suite à la déprivation du sérum ou traitement au paclitaxel, l'activité des ERK1/2 diminue, et il y a induction de l'apoptose. Par contre, la stimulation avec l'ET-1 atténue la fragmentation de l'ADN et maintient une activité élevée de ERK1/2 (WU-WONG *et al.*, 2000). D'autre part, BKAILY *et al.* (2000) ont suggéré que l'ET-1 cytosolique peut prévenir la surcharge calcique nucléaire dans les cellules du MLVh, protégeant ainsi les cellules contre l'apoptose. L'effet protecteur de l'ET-1 sur l'apoptose a été de même montré dans les aortes (SHARIFI *et* SCHIFFRIN, 1997) des rats hypertensifs, le traitement avec un antagoniste des récepteurs ET_A augmente le taux d'apoptose et diminue l'aire de la section transversale de l'aorte. Cependant, SCHICHIRI *et al.* (1999) ont démontré que l'effet protecteur anti-apoptotique de l'ET-1 peut être médié par les récepteurs ET_B dans les cellules endothéliales aortiques du rat. L'ET-1 supprime l'apoptose dans ces cellules en réponse à une déprivation en sérum, cet effet étant médié par ET_B car l'agoniste des récepteurs ET_B, le BQ-3020, diminue l'index apoptotique d'une façon dose-dépendante; par contre, l'antagoniste des récepteurs ET_B, le BQ-788, augmente le taux d'apoptose (SCHICHIRI *et al.*, 1999). Cependant, dans les cellules du MLV de rat, l'ET-1 induit l'apoptose via ET_B. L'effet apoptotique de l'ET-1 est complètement supprimé par

l'antagoniste des récepteurs ET_B, le BQ-788, et non l'antagoniste des récepteurs ET_A, le BQ-123 (CATTARUZZA *et al.*, 2000).

En se basant sur tous les travaux cités ci-dessus, il semble que le ratio d'expression des récepteurs ET_A versus les récepteurs ET_B, dans différents types cellulaires, est important dans le contrôle de l'apoptose. Que l'ET-1 induise ou supprime l'apoptose semble dépendre du type cellulaire et de l'expression cellule-spécifique des récepteurs ET_A et ET_B.

1.5.9. Pathologies reliées à l'endothéline.

Des évidences accumulées, indiquent que des taux plasmatiques élevés en ET-1 sont associés à différents désordres cardiovasculaires incluant l'hypertension et l'athérosclérose, et ce en changeant la dynamique du [Ca]_i (RUBANYI et POLOKOFF, 1994).

Les antagonistes des récepteurs de l'ET-1 utilisés montrent des effets bénéfiques significatifs dans des conditions pathologiques, incluant l'hypertension (RUBANYI et POLOKOFF, 1994; GRAY et WEBB, 1996). L'action vasonconstrictrice des endothélines participerait dans les élévations de pression sanguine et l'hypertrophie vasculaire dans divers modèles d'hypertension animales tels les rats spontanément hypertendus et des modèles d'hypertension sodium-dépendants (acétate de désoxycorticostérone (DOCA)-sel) (ALLCOCK *et al.*, 1998). De plus, l'administration du bosantan, un antagoniste des récepteurs ET_A/ET_B, s'est avérée efficace pour réduire

significativement la pression sanguine chez des patients souffrant d'hypertension essentielle (KRUM *et al.*, 1998).

L'endothéline joue aussi un rôle dans l'athérosclérose. Dans cette pathologie, les cellules endothéliales et les macrophages secrètent l'ET-1 qui active par la suite ses récepteurs ET_A présents dans les macrophages, les cellules du muscle lisse et les fibroblastes (FUJITANI *et al.*, 1995). L'ET-1 exerce ensuite ses effets mitogéniques en stimulant la synthèse des substances inflammatoires dans les macrophages, et de la fibronectine dans les cellules musculaires lisses (FUJITANI *et al.*, 1995; MACNULTY *et al.*, 1990; RUETTEN et THIEMERMANN, 1997; HAHN *et al.*, 1993). Le traitement avec OX-LDL stimule la synthèse de l'ET-1 dans les cellules endothéliales et les macrophages humains (BOULANGER *et al.*, 1992; MARTIN-NIZARD *et al.*, 1991). Cette augmentation corrèle avec les observations, chez des lapins suivant une diète en cholestérol, où le niveau tissulaire de l'ET-1 augmente de six fois dans les plaques athérosclérotiques au niveau de l'aorte (MITANI *et al.*, 2000). La présence des récepteurs à l'ET-1 dans les plaques athérosclérotiques a été confirmée par plusieurs études (PRAT *et al.*, 1003; DASHWOOD *et al.*, 1993). De plus, un rôle bénéfique du blocage du récepteur ET_A par un antagoniste non-peptidique, le BMS-182874, a été observé chez les hamsters suivant une diète en cholestérol (KOWALA *et al.*, 1995). Le blocage du récepteur ET_A semble retarder le développement de l'athérosclérose en diminuant la surface graisseuse de l'aorte et le nombre des macrophages dans la paroi vasculaire de 80% (KOWALA *et al.*, 1995).

De plus, l'apoptose des cellules du MLV est importante dans la pathophysiologie de l'athérosclérose (TAKAHASHI *et* BERK, 1998). Le niveau de l'apoptose augmente dans les cellules du MLV provenant des plaques athérosclérotiques par rapport aux vaisseaux normaux (BENNETT *et al.*, 1995) suggérant ainsi un rôle de l'apoptose des cellules du MLV dans la régulation de la masse cellulaire. De plus, il a été suggéré que l'apoptose est un prérequis dans la rupture de la plaque athérosclérotique (TAKAHASHI *et* BERK, 1998). Des études *in vivo* ont montré que l'activation de la p42/p44 MAPKs augmente 20 min après une angioplastie de l'artère carotide (PYLES *et al.*, 1997). De plus, en réponse à une dilatation vasculaire, l'activité de la p42/p44 MAPKs augmente de l'ordre de 7.7 fois dans l'artère coronaire (PYLES *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que la régulation de la p42/p44 MAPKs est importante dans la réponse vasculaire à l'angioplastie.

Une implication de l'ET-1 dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque a aussi été suggérée. L'antagonisme des récepteurs ET_A prévient la dilatation ventriculaire gauche et diminue le taux de mortalité dans certains modèles animaux dont le rat (SAKAI *et al.*, 1996). Il est intéressant de voir l'effet bénéfique d'antagonistes des récepteurs des endothélines dans l'insuffisance cardiaque humaine, tel que montré par KIOWSKI *et al.* (1995).

L'hypertension pulmonaire est une pathologie importante où l'endothéline semble avoir un rôle majeur. Qu'elle soit primaire ou secondaire à des maladies pulmonaires ou cardiaques, une augmentation de l'endothéline plasmatique a été observée chez ces patients; de plus, les niveaux de

l'endothéline plasmatique corrént avec la sévérité de la maladie (YOSHIBAYASHI *et al.*, 1991; CODY, 1992). Une augmentation de l'expression de l'endothéline et de l'ECE-1 a été observée dans les poumons de patients souffrant d'hypertension pulmonaire ainsi que de fibrose pulmonaire (GIAID *et al.*, 1993; Saleh *et al.*, 1997).

L'endothéline contribuerait aussi à l'insuffisance rénale, le vasospasme cérébral suivant une hémorragie subarachnoïdienne, ainsi que dans la resténose post-angioplastique (HUNEIDI *et al.*, 1991; BRUZZI *et al.*, 1997; CHANDRA *et al.*, 1998).

Les implications physiopathologiques de l'endothéline deviennent de plus en plus apparentes dans les maladies cardiovasculaires, ce qui génère des cibles thérapeutiques intéressantes pour l'usage d'antagonistes des récepteurs de l'endothéline ou des inhibiteurs de l'ECE (KRUM *et al.*, 1998).

En plus de son rôle pathophysiologique dans les maladies cardiovasculaires, l'ET-1 circulant normal joue un rôle physiologique dans le développement et le fonctionnement normal du cœur en modulant le $[Ca]_i$ (BKAILY *et al.*, 1997).

En résumé, la découverte de l'endothéline a créé un nouveau champ d'études scientifiques. Une importante quantité d'informations a été récoltée durant la dernière décennie. Maintenant, il est généralement reconnu que l'ET-1 induit tant des effets bénéfiques que nocifs, dépendamment de son niveau circulant dans le corps vivant, mais beaucoup reste à explorer afin de

clarifier les rôles physiologiques de l'ET-1 ainsi que ceux des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 dans le traitement de divers désordres cardiovasculaires. Pour cette raison, il est important de déterminer le rôle de l'endothéline dans la régulation du transport calcique dans les cellules du MLV afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions qui s'y attachent et de mieux cibler le type de récepteurs qui peut être impliqué dans la génération de ses effets.

1.6. Le calcium.

Le calcium joue un rôle critique dans la régulation des fonctions cellulaires. Il est essentiel dans le couplage de l'excitation-sécrétion des cellules sécrétrices comme les CEs, et de l'excitation-contraction des cellules contractiles comme les CMLVs (BOLTON, 1979 ; BKAILY, 1994c ; BKAILY *et al.*, 1996, 1997a, 2000). Ce cation est également requis lors de la croissance cellulaire (BERRIDGE, 1995 ; MARKS, 1992). La mobilisation cytosolique de calcium provient d'abord d'une vidange des réserves du réticulum sarcoplasmique suite à l'activation d'un canal calcique par l'inositol triphosphate (pour revue SMITH, 1996). Le calcium forme alors un complexe avec la calmoduline pour activer la kinase de la chaîne légère de la myosine qui à son tour phosphoryle la myosine et provoque la contraction des fibres d'actine et de myosine (STRAYER, 1988; VANDER *et al.*, 1975). La régulation fine de ces mécanismes bien établis suite à une stimulation avec des facteurs vasoactifs a été le sujet de plusieurs études. La poursuite de cet objectif a été facilitée par la découverte de sondes calciques hautement

sélectives (GYRNKIEWICK *et al.*, 1985). L'utilisation de ces sondes comme la sonde Fluo-3 a permis de mesurer les taux du calcium intracellulaire.

1.6.1. Les Canaux calciques.

Les canaux calciques sont une caractéristique ubiquitaire des cellules excitables. Il existe deux grandes familles de canaux calciques, les canaux calciques opérés par voltage (VOC) dont leur ouverture et leur probabilité d'ouverture dépendent du niveau de dépolarisation membranaire, et les canaux calciques opérés par récepteur (ROC). Ce dernier type de canaux semble être activé par un ligand. Dans les cellules du muscle lisse vasculaire, 3 types de canaux VOC ont été décrits, type T (activé à partir d'un bas seuil), type L (activé à partir d'un haut seuil) et type R (repos). Les canaux de type T ont un seuil d'activation plus négatif que les canaux de type L, s'inactivent relativement rapidement (par rapport aux canaux L) et possèdent une faible conductance en présence du Ba^{2+} (FOX *et al.*, 1987; BKAILY, 1994). Les canaux de type L jouent un rôle plus important que les canaux de type T dans le couplage excitation-contraction. Les canaux de type L ont une conductance plus élevée, sont sensibles à l'inhibition par les dihydropyridines et sont activés par de grandes dépolarisations (FOX *et al.*, 1987; BKAILY, 1994). Identifiés il y a quelques années dans les cellules endothéliales vasculaires, les cellules de muscle lisse vasculaire d'aortes de lapins et d'humains, dans l'artère rénale ainsi que dans les cellules ventriculaires (BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1992; 1993; 1997), les canaux calciques de type R sont le

troisième type de VOC. Ces canaux ont été initialement proposés par BAKER *et al.* (1971). Ils permettent l'entrée passive du calcium dans la cellule durant un potentiel soutenu de la membrane et ont été nommés par DIPOLO comme étant des canaux calcique de potentiel de repos (DIPOLO, 1979). La probabilité d'ouverture de ce canal est relativement petite quand le potentiel de membrane est situé près de -80 mV et s'active lors d'une dépolarisation soutenue de la membrane et semble être responsable de l'entrée soutenue du calcium durant la phase tonique de contraction dans le muscle lisse vasculaire (BENCHEKROUN *et al.*, 1995). Les canaux calciques de type R sont insensibles à la nifédipine (un bloqueur connu des canaux calciques de type L) mais sensibles à l'isradipine (BKAILY *et al.*, 1995).

L'existence des canaux opérés par récepteur (ROC) a été initialement proposée par BOLTON (1979) suite à l'observation que certains agonistes peuvent induire des contractions soutenues dans des muscles lisses. Les ROCs sont insensibles aux bloqueurs de canaux calciques (KARAKI *et* WEISS, 1998) et dans certains muscles lisses vasculaires, leur contribution à l'influx calcique semble minime ou inexistante (NILSSON *et al.*, 1994).

1.6.2. Mécanismes impliqués dans la régulation du taux du Ca^{2+} cytosolique libre.

Il existe des mécanismes homéostatiques permettant le maintien du $[\text{Ca}]_c$ libre en dessous du seuil critique nécessaire à l'activation des éléments contractiles:

i) Le transport actif du Ca^{2+} à travers la membrane plasmique jusqu'à l'espace extracellulaire (pompe Ca^{2+} -ATPase) (BKAILY, 1994; DIPOLO, 1979), ii) L'évacuation de l'ion grâce à l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique (LANGER, 1992), iii) Le transport passif à travers la mitochondrie, iv) Le transport actif du Ca^{2+} à travers la membrane du RS vers l'intérieur du compartiment (WEBER, 1966; HASSELBACH, 1964), et v) Le transport du Ca^{2+} vers le noyau (BKAILY *et al.*, 1994; 1997a; GERASIMENKO *et al.*, 1995; NICOTERA *et al.*, 1994; KOPPLER *et al.*, 1993; LANINI *et al.*, 1992; MALVIYA, 1990).

Récemment, en utilisant la microscopie confocale et les sondes fluorescentes sensibles au Ca^{2+} , de nombreuses évidences accumulées démontrent que la distribution du Ca^{2+} libre intracellulaire n'est pas homogène au niveau cellulaire. Aussi, une stimulation de certains types de récepteurs membranaires pourrait induire une augmentation calcique hétérogène dans divers compartiments cellulaires, tels le cytosol et le noyau (BKAILY *et al.*, 1997; BURNIER *et al.*, 1994). De plus, il a été rapporté que l'amplitude et la direction du flux calcique à travers l'enveloppe nucléaire, tel que démontré dans plusieurs types cellulaires au repos et après stimulation, dépendent du type cellulaire, de l'état de différenciation et du type de stimulation (HALLER *et al.*, 1994; HIMPENS *et al.*, 1994). Une étude récente par HARDINGHAM *et al.* (1997) montre que l'expression des gènes est contrôlée différemment par les signaux calciques provenant du noyau ou du cytoplasme, permettant à un second messager de générer diverses réponses

transcriptionnelles. Cependant, peu d'information est disponible concernant le rôle du noyau dans la régulation du Ca^{2+} (BKAILY, 1994; GILCHRIST *et al.*, 1994), bien que le Ca^{2+} constitue un signal important dans les événements clés du noyau incluant le cycle cellulaire (MEANS, 1994), la régulation de l'expression génique (PEUNOVA et ENIKOLOPOV, 1993; WEGNER *et al.*, 1992), l'activation des kinases et phosphatases nucléaires (CZUBRYT *et al.*, 1996), la synthèse et la réparation de l'ADN, ainsi que dans le 'break-down' de l'enveloppe nucléaire (STEINHARDT et ALDERTON, 1988). De plus, une accumulation massive du Ca^{2+} nucléaire et périnucléaire contribue au processus de l'apoptose (NICOTERA *et al.*, 1994).

Les mécanismes par lesquels l'enveloppe nucléaire est contrôlée ainsi que le mode d'interaction du noyau avec la membrane de surface et les constituants cytosoliques sont méconnus.

Il a été suggéré, que l'existence d'une différence entre le $[\text{Ca}]_c$ et le $[\text{Ca}]_n$ au repos, implique la présence de mécanismes empêchant la diffusion libre du Ca^{2+} à travers l'enveloppe nucléaire et les pores nucléaires, maintenant ainsi, une différence entre le $[\text{Ca}]_c$ et le $[\text{Ca}]_n$. Certains investigateurs ont trouvé que le gradient calcique à travers l'enveloppe nucléaire au repos, est aboli par un traitement avec la thapsigargine, un inhibiteur de la pompe calcique du réticulum endoplasmique. Ceci, indique que le gradient calcique au repos est dépendant de la séquestration active du Ca^{2+} possiblement par le compartiment périnucléaire (HIMPENS *et al.*, 1994). Cette distribution asymétrique du Ca^{2+} nucléaire et cytosolique au repos,

pourrait résulter de différents taux de séquestration et de relâche du Ca^{2+} par le noyau versus le cytosol ainsi qu'une diffusion très limitée du Ca^{2+} à travers les pores nucléaires (DINGWALL, 1991; HALLER *et al.*, 1994; HERNANDEZ-CRUZ *et al.*, 1990; WAYBILL *et al.*, 1991). De plus, pour ce qui est de la distribution du Ca^{2+} libre au repos, plusieurs auteurs ont indiqué que cette asymétrie de concentration du Ca^{2+} persiste et devient plus importante après une stimulation cellulaire, suggérant ainsi la présence de barrières perméables au Ca^{2+} et de systèmes de transport au niveau des membranes nucléaires (GERASIMENKO *et al.*, 1995; HIMPENS *et al.*, 1994; NICOTERA *et al.*, 1994; SANTELLA *et al.*, 1996). Des études subséquentes ont montré que l'augmentation différentielle du $[\text{Ca}]_n$ par rapport au $[\text{Ca}]_c$ durant une stimulation par un agoniste pourrait être attribuée à un influx calcique passif vers le noyau à partir de son relâchement des réserves calciques de l'enveloppe nucléaire (MATTER *et al.*, 1993; HIMPENS *et al.*, 1994; HALLER *et al.*, 1996) et/ou de sa relâche d'un site d'emmagasinage intranucléaire possiblement médié par un processus dépendant des phosphates inositols (MALVIYA *et al.*, 1990; HIMPENS *et al.*, 1992). Dans cette optique, les récepteurs de l' IP_3 (Inositol 1,4,5-Triphosphate), qui sont impliqués dans la relâche du Ca^{2+} des réserves internes, ont été localisés sur l'enveloppe nucléaire (MATTER *et al.*, 1993; STEHNO-BITTEL *et al.*, 1995), sur le réticulum endoplasmique (VILLA *et al.*, 1993) et à l'intérieur du noyau (DIVECHA *et al.*, 1993; HENNAGER *et al.*, 1995; MALVIYA *et al.*,

1990). De plus, il a été démontré que le noyau contient la voie enzymatique pour la production de l'IP₃ (DIVECHA *et al.*, 1993; YORK *et al.*, 1994).

Plus récemment, dans notre laboratoire, en utilisant la microscopie confocale conjuguée au Fluo-3 pour les mesures du Ca²⁺, nous avons rapporté l'implication du noyau et son rôle tampon face au Ca²⁺ cytosolique (BKAILY, 1994; BKAILY *et al.*, 1995; 1996; 1997a; 1997b). Dans ces études, il a été démontré que le noyau joue son rôle tampon en captant une partie de la vague calcique présente dans le cytosol et participe ainsi au maintien des niveaux normaux du [Ca]_c, et à la réduction de la surcharge calcique cytosolique (BKAILY *et al.*, 1997).

En résumé, Il apparaît de plus en plus évident que le Ca²⁺ constitue un signal-clé dans plusieurs événements cellulaires et surtout au niveau du contrôle de certains processus nucléaires (BKAILY, 1994; BKAILY *et al.*, 1996; 1997a; 1997b). En effet, des travaux effectués dans notre laboratoire, utilisant la microscopie confocale ainsi que la méthode de mesure du Ca²⁺ à l'aide de la sonde calcique Fluo-3/AM, ont démontré que le Ca²⁺ cytosolique régule le Ca²⁺ nucléaire et que le noyau joue un rôle dans le couplage excitation-contraction des myocytes (BKAILY, 1996).

Ainsi, en se basant sur des données expérimentales, il semble que le noyau soit impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique à l'intérieur de la cellule. De plus, cette homéostasie pourrait être altérée par l'action de plusieurs hormones, incluant l'endothéline. En effet, des récepteurs à l'ET-1

ont été localisés au niveau de la membrane plasmique et nucléaire des cellules cardiaques (BKAILY *et al.*, 1997b). De plus, le noyau semble être impliqué dans la modulation du Ca^{2+} cytosolique. Des voies de transport du Ca^{2+} , des récepteurs ainsi que des canaux sont présents non seulement au niveau du sarcolemme, mais aussi au niveau de la membrane nucléaire (Figure 11), ce qui suggère davantage la présence des récepteurs à l'ET-1 au niveau nucléaire et attribue un rôle à ces récepteurs dans la modulation directe du calcium nucléaire.

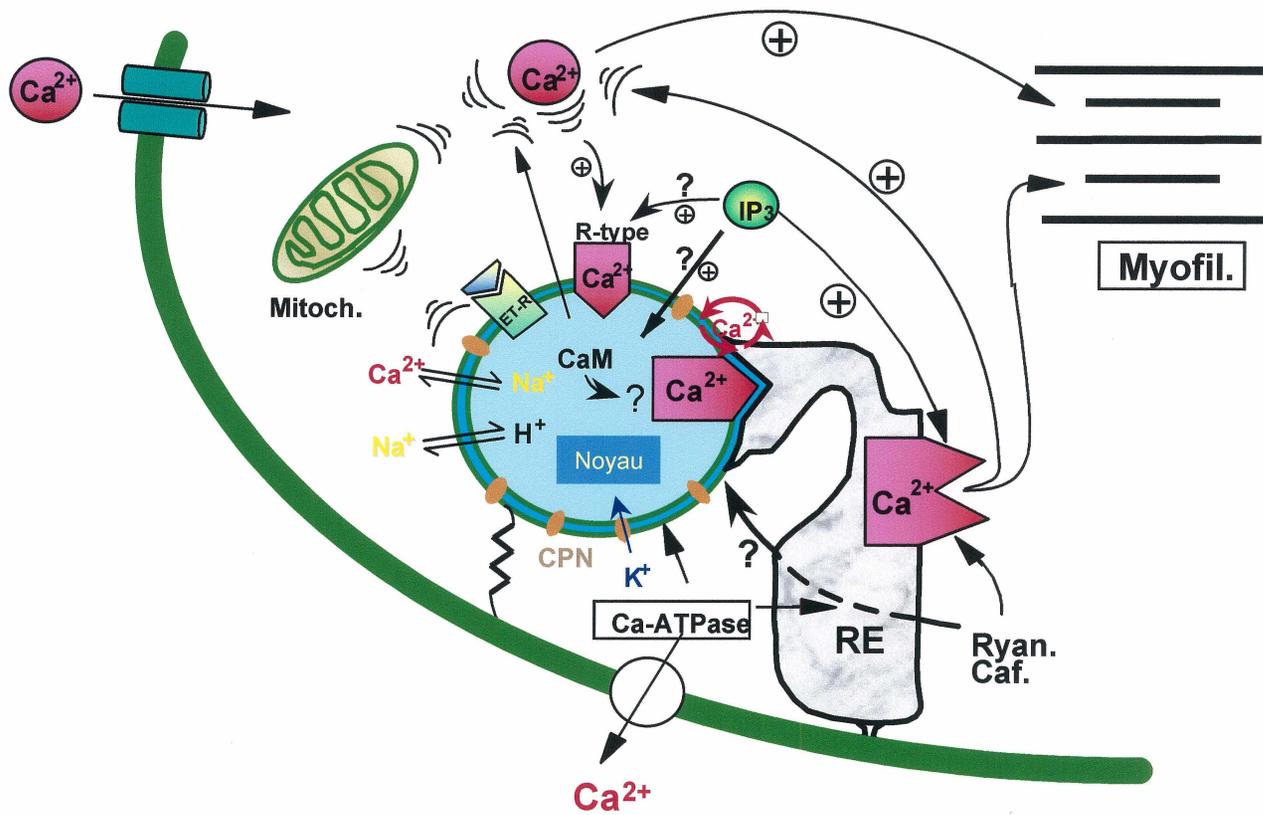
1.7. Hypothèse et objectifs de travail.

La revue de littérature présentée dans cette introduction montre l'implication de l'ET-1 dans plusieurs effets physiologiques et pathophysiologiques au niveau du système cardiovasculaire, via l'activation de ses deux types de récepteurs ET_A et ET_B . Le récepteur ET_A , présent surtout au niveau du MLV, contribue au maintien du tonus vasculaire. Par contre, le récepteur ET_B , présent surtout au niveau des CEs, est responsable de la libération de NO de ces cellules, et il est impliqué aussi dans la clairance de l'endothéline plasmatique. Cette thèse a pour but de tester notre hypothèse que la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B module la réponse du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh et que l'activation de ces récepteurs induit l'internalisation et le 'trafficking' des récepteurs vers des voies intracellulaires différentes, et finalement la stimulation de ces récepteurs

Figure 11 Nouvelle schématisation du transport du Ca^{2+} impliquant le noyau dans l'excitation-contraction d'un myocyte.

Représentation schématique des diverses composantes modulant les vagues calciques intracellulaires. Ca^{2+} : calcium, CPN : complexe de pores nucléaires, CaM : calmoduline, Caf. et Ryan. : réserves calciques sensibles à la caféine et à la ryanodine, ET-R : récepteur de l'ET-1, IP_3 : inositol triphosphate, Mitoch : mitochondrie, Myofil : myofilaments, R-type : canal calcique de type-R, RE : réticulum endoplasmique.

Modifié de BKAILY et al., 1997a.



module les effets de l'ET-1 sur la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules du MLVh.

Nous proposons comme premier objectif d'étudier la distribution et la localisation des récepteurs à l'ET-1 dans les CMLVhs. Une fois celles-ci déterminées, nous irons étudier le rôle de l'ET-1 dans la modulation du calcium intracellulaire suite à l'activation de ses récepteurs. De plus, l'effet soutenu de l'ET-1 sur le tonus vasculaire via l'activation du récepteur ET_A ainsi que la clairance de l'ET-1 via l'activation du récepteur ET_B , laissent suggérer que ces récepteurs, suite à leur activation, sont internalisés et sont ciblés par la suite à des voies intracellulaires différentes.

Les buts du premier objectif de recherche sont les suivants :

- 1) Déterminer l'effet de l'activation des récepteurs à l'endothéline-1 sur les niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ dans les cellules du muscle lisse vasculaire aortique humain,
- 2) Déterminer le(s) type(s) de récepteurs qui peut(vent) être impliqué(s) dans la modulation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ par l'ET-1,
- 3) Déterminer quel type de protéines G peut être impliqué dans la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les CMLVhs,
- 4) Vérifier si l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ implique un mécanisme dépendant de la PKC,
- 5) Déterminer le type, la localisation et la distribution des récepteurs à l'ET-1 dans les CMLVhs,

- 6) Vérifier si la stimulation des récepteurs à l'ET-1 au niveau de la membrane de surface induit l'internalisation de ces récepteurs et leur translocation dans le noyau,
- 7) Vérifier si la stimulation des récepteurs à l'ET-1 au niveau de la membrane de surface stimule l'expression de ces récepteurs en induisant la synthèse protéique.

Approches expérimentales :

Les études sur le calcium sont réalisées en utilisant la sonde calcique Fluo-3 et la microscopie confocale. De plus, les études portant sur la localisation des récepteurs, leur internalisation ainsi que la synthèse protéique sont réalisées en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte conjuguée à la microscopie confocale et sont confirmées par la suite par des études en immunobuvardage en western en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre l'ET-1 et ses récepteurs ET_A et ET_B.

Afin d'élaborer le second objectif, nous nous sommes basés sur le fait que l'ET-1 dans certaines conditions pathophysiologiques, et selon le type cellulaire étudié, exerce en premier lieu un effet mitogène en stimulant la prolifération cellulaire suite à l'activation de la voie des MAPKs et des molécules régulatrices du cycle cellulaire, et en second lieu, que l'ET-1 peut moduler la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Les buts du second objectif de recherche sont les suivants :

- 8) Vérifier l'Effet de l'ET-1 sur la prolifération cellulaire,

- 9) Vérifier l'implication de l'ET-1 dans le processus de la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Approches expérimentales :

Ces études sont réalisées en utilisant la technique d'immunobuvardage en western et des anticorps spécifiques dirigés contre les différentes molécules régulatrices du cycle cellulaire et des p42/p44 MAPKs. De plus, afin de vérifier l'effet de l'ET-1 sur l'apoptose nous avons utilisé la technique de fragmentation de l'ADN.

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Isolation et culture de cellules du muscle lisse d'aorte humaine adulte.

Les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLVs) sont isolées des aortes de donneurs humains adultes, sains et de sexes différents (fournis par Quebec Transplant) en utilisant la trypsine ou la collagénase et des méthodes mécaniques (BKAILY *et al.*, 1997a). La procédure est en accord avec les réquisitions du comité de l'utilisation des matériaux humains. L'aorte d'un donneur est transportée de l'hôpital dans un milieu stérile conservé sur glace et composé de Milieu Essentiel Minimal de Hank's (HMEM) (Gibco; Burlington, Ont, Canada), supplémenté de sérum bovin fœtal (FBS) (Hyclone; New Jersey, E.U.A.), ainsi que du Penicilline-G-Potassium (Ayerst; Montréal, Qc, Canada). L'aorte est attentivement ouverte et nettoyée du sang avec 500 ml de milieu M199 (Gibco; Burlington, Ont., Canada) stérile contenant de la Pénicilline et de la Streptomycine (Gibco; Burlington, Ont, Canada). Pour isoler les cellules endothéliales (Ces), l'aorte ouverte est placée dans un pétri de culture avec sa face luminale dirigée vers le haut et l'endothélium est gratté doucement avec la lame d'un scalpel (BKAILY *et al.*, 1997a). Pour la culture des CMLVs, le reste de la couche endothéliale est disséqué de l'aorte ouverte donnant accès à des CMLVs pures (BKAILY *et al.*, 1997a). L'aorte dénudée est placée pour 15 min dans du milieu M199 contenant des antibiotiques et du 0.1% collagénase (BKAILY *et al.*, 1997a). Ensuite, les CMLVhs sont doucement grattées avec une lame de scalpel stérile; le milieu contenant les cellules est collecté et centrifugé pendant 10 min à 1000 révolution par minute

(rpm). La solution de collagénase est éliminée et le culot de cellule est suspendu dans un milieu M199 contenant de la Penicilline et de la Streptomycine et supplémenté de 10% de FBS; les cellules sont ensuite dispersées dans des pétris (BKAILY *et al.*, 1997a). Pour les études sur des cellules fraîchement isolées, les cellules sont distribuées sur des lamelles de verre sphériques de 25mm de diamètre dans des boîtes de pétris (35 x 10mm), (BKAILY *et al.*, 1992). Les pétris sont ensuite placés dans un incubateur contrôlé à 95% d'air, 5% de CO₂ et à une température de 37°C pour au moins 24 heures.

Pour produire une culture cellulaire primaire, les CMLVhs sont cultivées dans des flacons de culture (Gibco, Burlington, Ont., Canada) et incubées comme ci-haut mentionné. À confluence, les cellules sont détachées par l'aide d'une enzyme, la trypsine, et cultivées dans du milieu de croissance de muscle lisse vasculaire (SmGM, Clonetics, SanDiego, Ca, E.U.A.) supplémenté de 5% sérum (BKAILY *et al.*, 1997a). Le nombre maximal de passages des cellules utilisées pour l'expérimentation n'ont pas dépassé dix passages.

Pour vérifier la qualité et la pureté des CMLVhs, les cellules sont marquées avec un anticorps spécifique dirigé contre l' α -actine des muscles lisses (BKAILY *et al.*, 1997a). Les CMLVhs, en culture, sont similaires dans leur pharmacologie et leurs propriétés électriques aux cellules fraîchement isolées (BKAILY, 1994b; BKAILY *et al.*, 1993; BKAILY *et al.*, 1992; BKAILY *et al.*, 1991). Les cellules possèdent un canal calcique de type R

fonctionnel, insensible à la nifédipine mais sensible à l'isradipine (BKAILY, 1994c; BKAILY, 1994a; BKAILY *et al.*, 1993).

2.2. Microscopie confocale.

La microscopie confocale offre plusieurs avantages significatifs sur la microscopie à fluorescence conventionnelle; elle permet la génération d'images optiques sériées par élimination de la lumière hors foyer (BKAILY *et al.*, 1997; 1994; NIGGLI *et al.*, 1994; LIPP et NIGGLI, 1993; NIGGLI et LEDERER, 1991) et offre une résolution d'environ 30% supérieure au microscope conventionnel. Elle permet entre autre un sectionnement non-invasif d'échantillons biologiques ainsi que leur reconstruction en trois dimensions sous n'importe quel angle ou plan de coupe (NIGGLI *et al.*, 1994). Le système confocale utilisé au cours de cet étude est un Multi Probe 2001 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) muni d'un laser à argon équipé d'un microscope à épifluorescence à phase inverse (Diaphot Nikon) et d'un objectif achromat (Nikon Oil Plan) de 60 X.

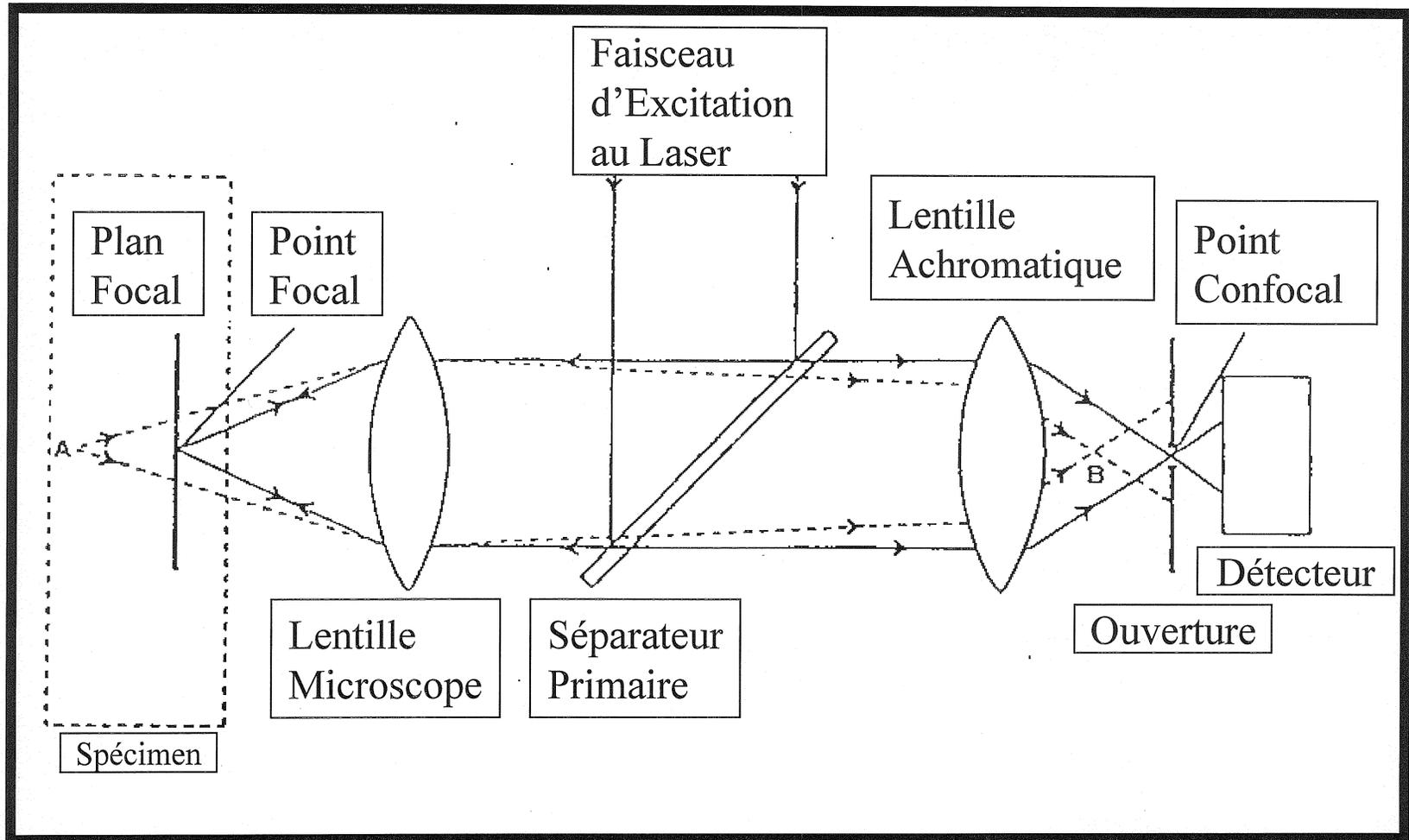
2.2.1. Principe de base.

Dans le système confocal, la lentille du microscope dirige le faisceau de lumière laser vers un point donné de l'échantillon, appelé le point focal (Figure 12). La lumière émise (ou réfléchi) par ce point reprend le même

Figure 12 Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.

Dans le système de la microscopie confocale, la lumière d'excitation provenant du laser passe par un séparateur primaire puis elle est convergée par les lentilles du microscope au point focal de l'échantillon. Une faible quantité de lumière de laser converge sur d'autres points du plan focal. L'échantillon, une fois excité, émet une fluorescence qui repasse par le séparateur primaire afin de séparer la fluorescence émise de celle qui est réfléctée. La fluorescence émise est convergée par la lentille achromatique au point confocal puis elle est enregistrée par le détecteur du système. Tout rayon frappant l'ouverture à des points autres que le point confocal ne peut pas être détecté d'où l'importance de ce système dans l'élimination de la lumière hors focus.

Modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi probe 2001.



chemin à travers le microscope. Les compartiments optiques du microscope focalisent la lumière de ce point vers un deuxième point, appelé le point confocal. Un système de volets ou ouvertures, positionnés au point confocal, ne laisse passer que la lumière provenant du point focal de se rendre au détecteur. Toute lumière incidente provenant de points au-dessus ou en dessous du plan focal, et par conséquent hors foyer, est rejetée par l'ouverture confocale (Manuel d'utilisation du microscope Multi probe 2001).

2.2.2. Balayage de l'échantillon.

Chaque point le long d'une section horizontale ou verticale est balayé et l'information ainsi recueillie est enregistrée de façon systématique. Un système de miroirs doubles permet de balayer l'échantillon le long de l'axe horizontal à raison de 100 lignes à la seconde. Le deuxième miroir déplace le faisceau d'un pas dans l'axe y une fois que chaque ligne de l'axe X est complétée.

Le micro-vice de mise au point est relié à un moteur sous le contrôle du système, permettant d'accumuler des tranches optiques de l'échantillon le long de l'axe z (soit l'épaisseur) de celui-ci. Les images captées par le(s) détecteur(s) de photons sont digitalisées, enregistrées dans la mémoire de l'ordinateur et peuvent être affichées sous forme d'images en deux dimensions, 2-D, ou sous forme de reconstructions en trois dimensions, 3-D, sous divers angles ou plans de coupe.

Le système d'optique du confocal élimine la lumière émise dans le plan de focus et rejette l'information hors-foyer provenant des structures au-dessus ou sous-jacents. Seulement le point au foyer est enregistré. Le système confocal au laser est donc un outil de pointe pour des études quantitatives. La microscopie confocale permet d'effectuer des études micro-anatomiques très précises, d'étudier la co-localisation éventuelle de molécules différentes, d'effectuer également des études cinétiques in situ en suivant la progression dans une cellule vivante d'un marqueur coloré (White *et al.*, 1987).

2.3. Chargement des cellules avec la sonde calcique Fluo-3.

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre qui conviennent à leur montage dans une chambre de 1 ml. Les cellules sont lavées trois fois avec 2 ml d'une solution de Tyrode (Sigma, St Louis, Mo, E.U.A) ayant comme composition 5 mM HEPES, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.9 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, pH 7.4 ajusté avec du Tris base, le tout supplémenté de 0.1% de BSA (albumine de sérum bovin) (Sigma, St Louis). L'osmolarité de la solution de Tyrode avec ou sans BSA est ajustée à 310 mOsm avec du sucrose à l'aide d'un osmomètre (Advanced Instruments Inc., MA).

La sonde calcique, Fluo-3/AM (Molecular Probes, Eugene, OR), est diluée dans une solution de Tyrode contenant du BSA à partir d'une solution stock congelée de 1 mM; la concentration finale de la sonde utilisée est de 13µM (BKAILY *et al.*, 1997a). Les cellules sont incubées, suivant la méthode

de lamelle renversée, en présence de 100 µl de sonde diluée placée sur une plaque de verre enveloppée de parafilm, pendant 60 minutes. L'incubation se fait, à l'abri de la lumière, dans un environnement humide afin de minimiser l'évaporation de la sonde calcique (BKAILY *et al.* , 1997a).

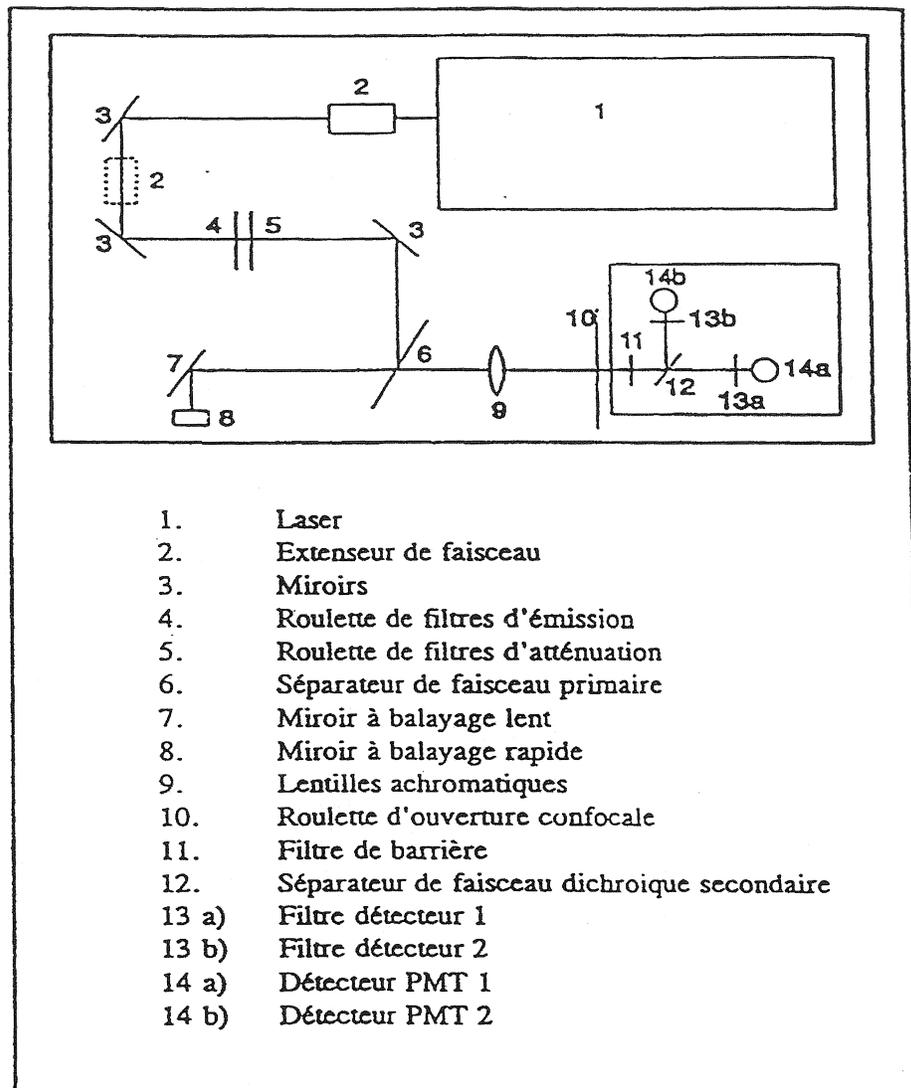
Après la période d'incubation, les lamelles sont récupérées et les cellules sont lavées deux fois dans la solution Tyrode-BSA puis deux fois dans la solution Tyrode seule. Les cellules chargées sont ensuite laissées dans la solution Tyrode pour 15 min afin de s'assurer de l'hydrolyse totale des groupements acétoxyméthyls esters et de se débarrasser ainsi, de la forme estérifiée de la sonde calcique (forme AM de la sonde Fluo-3/AM) qui est incapable de lier le Ca²⁺ libre (BKAILY *et al.* , 1997a).

Les cellules chargées sont examinées à l'aide d'un système de microscopie confocale Multi Probe 2001. Le laser d'argon (9.0 mV), à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm, est dirigé sur l'échantillon via un filtre dichroïque primaire de 510 nm et atténué avec un filtre de densité neutre de 1-3% afin de réduire la défluorescence. L'ouverture confocale est de 100 µm.

Pour la plupart des expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34µm. L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales (Figure 13). Les cellules sont balayées le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise

Figure 13 Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale.

Modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi probe 2001.



de mesures du niveau basal de l'intensité de fluorescence relative à la réponse cellulaire, cytosolique et nucléaire, suite à l'ajout de différents agents (BKAILY *et al.*, 1997a).

2.4. Études du noyau.

2.4.1. Marquage du noyau.

À la fin de chaque expérience le noyau est chargé avec le Syto-11, un marqueur des acides nucléiques (Molecular Probes, Oregon, E.U.A.), à une concentration de 100 à 200 nM. Les cellules sont ensuite balayées par sections sériées immédiatement après le développement du marquage (2 à 3 min). La position, le nombre de sections ainsi que l'incrément entre ces dernières sont maintenus identiques à ceux utilisés au cours de l'expérience. Une reconstruction en 3-D du noyau est réalisée afin de délimiter le calcium intranucléaire du calcium cytosolique (BKAILY *et al.*, 1997a).

2.4.2. Étude de la fluorescence calcique du noyau.

Les changements d'intensité de fluorescence calcique dans l'espace intranucléaire sont mesurés dans des CMLVhs chargés au Fluo-3 suite à l'ajout de concentrations croissantes de calcium dans le milieu externe. Après la charge et l'hydrolyse, les cellules sont baignées dans une solution semblable au milieu intracellulaire contenant NaCl 20 mM, KCl 140 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM, glucose 5 mM, pH 7.2 ajusté avec du Trizma base. La membrane des cellules est perméabilisée en ajoutant 10⁻⁵ M

(concentration finale) de l'ionophore ionomycine (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.) pendant une minute en présence de 100nM de CaCl_2 (BKAILY *et al.*, 1997a).

L'addition de 100nM de CaCl_2 à la solution intracellulaire permet de maintenir l'homéostasie calcique entre le noyau et le milieu environnant lors de la perforation de la membrane. De plus, la présence de 100nM de calcium dans la solution intracellulaire est nécessaire afin de visualiser l'effet de l'ionomycine (BKAILY *et al.*, 1996).

Les cellules sont balayées avant et après l'ajout de l'ionomycine pour enregistrer la réponse à l'ionophore (augmentation de Ca^{2+} intracellulaire). Seules les cellules sensibles à l'ionomycine sont sélectionnées pour les études ultérieures. Aussitôt que l'augmentation cytosolique du calcium est observée suite à l'ajout de l'ionomycine, les cellules sont immédiatement rincées avec la solution intracellulaire (sans calcium) sans ionomycine suivie d'une période de stabilisation de 5min (BKAILY *et al.*, 1996).

Les cellules sont ensuite balayées par sections sériées (série contrôle) avant l'ajout de 100, 200, 400, 600, 800, 1200 et 1600nM (concentration finale) d'une solution de CaCl_2 (BKAILY *et al.*, 1996). L'acquisition des séries optiques est effectuée 2 min après l'ajout de chaque concentration de calcium. Chaque série comprend 10 à 12 sections (512 x 512) avec un incrément vertical de 1.0 μm . Le nombre de sections ainsi que l'épaisseur sont rigoureusement maintenus durant la durée de l'expérience afin de localiser les variations de calcium intranucléaire. Une fois les ajouts de calcium complétés,

3mM d'EGTA (Ethylene-bis(oxy-ethylenenitro)tetraacetic acid) (Sigma chemicals, St Louis, Mo, E.U.A.) sont ajoutés au milieu pour s'assurer que le noyau est toujours sensible à un stimulus externe.

2.4.3. La mesure du calcium nucléaire.

Les images balayées sont transférées à une station d'analyse Indy de Silicon Graphics équipée d'un logiciel d'analyse et de reconstruction Imagespace de Molecular Dynamics. La reconstruction des images en 3D est présentée en projections d'intensité maximale, générant ainsi une série d'images montrant l'intensité maximale des unités voxels (BKAILY *et al.*, 1997a).

Les images des cellules chargées au Fluo-3, sont représentées en pseudo-couleur suivant une échelle d'intensité allant de 0 à 255 où le bleu noir indique l'intensité minimale et le blanc l'intensité maximale. Les mesures de calcium dans le noyau sont effectuées sur des images individuelles et sur des reconstructions en 3D (sections sériées). La région du noyau, marquée au Syto-11, est isolée du reste de la cellule en fixant un seuil inférieur d'intensité afin de délimiter les pixels de cet espace (BKAILY *et al.*, 1997a).

Une série d'images binaires du volume nucléaire est générée en 3D pour chaque cellule en utilisant les mêmes paramètres pour les positions x, y, et z que ceux utilisés pendant les mesures calciques. En appliquant ces images binaires aux cellules chargées avec la sonde calcique, une nouvelle

projection en 3D est créée montrant les niveaux d'intensité de fluorescence exclusivement dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1996; 1997a).

En 'isolant' le noyau de la région cytosolique environnante, il est donc possible de mesurer les valeurs d'intensité moyenne du volume cytosolique et nucléaire en éliminant toute contribution possible du calcium périnucléaire.

2.5. Immunofluorescence indirecte.

2.5.1. Marquage de l'endothéline-1.

L'ET-1 est marqué dans les CMLVhs ainsi que les noyaux isolés de foie de rats et d'aorte adulte humaine en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre l'endothéline-1 humaine (Biodesign Inc., E.U.A.) à une dilution de 1 : 100. L'anticorps secondaire est un anti-IgG de souris conjugué à la cyanine Cy-3 (Molecular probes, Oregon, E.U.A.) et utilisé à une dilution de 1:100.

2.5.2. Marquage des récepteurs ET_A et ET_B.

La localisation ainsi que la distribution des deux sous-types de récepteurs à l'ET-1, ET_A et ET_B, sont réalisées avec la technique d'immunofluorescence indirecte dans les CMLVhs. Des anticorps polyclonaux dirigés contre l'extrémité C-terminale du récepteur ET_A (Alomone labs, Israel), à une dilution de 1 : 50, et contre la troisième boucle intracellulaire du récepteur ET_B (Alomone labs, Israel), à une dilution de

1 :100, sont utilisés. L'anticorps secondaire pour les deux sous- types de récepteurs est un anti-IgG de lapin conjugué à la fluorescéine Alexafluor 488 (Molecular probes) et utilisé à une dilution de 1µg/ml.

Pour les études de double marquage des récepteurs ET_A et ET_B, nous avons utilisé pour le récepteur ET_B le même anticorps primaire ci-haut mentionné avec un anticorps secondaire de type anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa fluor 546 (Molecular probes) et utilisé à une dilution de 5µg/ml. Par contre, pour les récepteurs ET_A, nous avons utilisé l'anticorps polyclonal dirigé contre l'extrémité C-terminale du récepteur ET_A (ISL, Angleterre), à une dilution de 1 : 50 avec un anticorps secondaire de type anti-IgG de chèvre conjugué à l'Alexa fluor 488 (Molecular probes) et utilisé à une dilution de 1µg/ml.

Pour déterminer la spécificité de l'immunoréactivité obtenue, un contrôle négatif est réalisé en utilisant un peptide contrôle contre lequel l'anticorps primaire (anti-ET_A ou anti-ET_B) est dirigé.

2.5.3. Prétraitement avec l'ET-1.

Deux séries d'expériences sont utilisées pour tester l'effet de l'ET-1 (American peptides, E.U.A.) sur l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B avec ou sans le ligand.

Dans la première série d'expériences, les CMLVhs mises en culture, sur des lamelles, sont exposées à 10⁻⁷ M d'ET-1 pour 5, 15, 30 et 60 min à 37°C, une période amplement suffisante pour détecter le processus

d'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B , ainsi qu'à $4^\circ C$ où tout processus biologique est freiné. L'ET-1 est ensuite lavé, les CMLVs sont ensuite fixés avec 4% paraformaldéhyde et la localisation des récepteurs est déterminée par immunofluorescence indirecte.

Dans une deuxième série d'expériences, les CMLVs mises en culture sur lamelles, sont exposées à l'agoniste spécifique des récepteurs ET_B , l'IRL-1620 (Dr. P. D'Orléans-juste, IPS, Université de Sherbrooke) à 10^{-7} M ainsi qu'aux antagonistes spécifiques des récepteurs ET_A et ET_B , BQ-123 10^{-6} M et BQ-788 10^{-7} M (American peptides, E.U.A.) respectivement pour 15 min à $37^\circ C$. La colocalisation de chaque type du récepteur avec son ligand est réalisé par double marquage en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte combinée à la microscopie confocale.

2.5.4. Technique de l'immunofluorescence indirecte.

Les CMLVs mises en culture sur des lamelles de 25mm sont fixées pendant 10 à 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 4% et sont ensuite lavées deux fois avec du PBS 1X, pH 7.4. Les échantillons étudiés sont ensuite incubés pendant 10 min dans une solution de 2mg/ml de sodium borohydrure afin de neutraliser les groupements aldéhydes, et sont lavés deux fois pendant 5 min avec du PBS 1X. Par la suite, les échantillons sont incubés pendant 30 min dans une solution de Triton 0.1% contenant 7% Normal Goat Serum (NGS) et 5% lait écrémé pour bloquer les sites de liaison non-spécifiques. Le processus de fixation, perforation et saturation

sont effectués à température ambiante. Pourtant, le processus de marquage avec l'anticorps primaire est effectué à 4°C pendant toute la nuit dans une solution de Triton 0.1% contenant 1.4 % NGS et 1 % lait écrémé. Les préparations sont ensuite lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS 1X. Par la suite, les échantillons sont incubés pendant 1 heure, à la température ambiante et à l'obscurité, avec un anticorps secondaire fluorescent dans une solution de Triton 0.1% contenant 1.4 % NGS et 1 % lait écrémé. Finalement les échantillons sont observés par microscopie confocale.

2.5.5. Détection du marquage par microscopie confocale.

Pour la visualisation et la quantification de l'intensité de fluorescence par microscopie confocale, les préparations étudiées sont mises en culture sur des lamelles de 25 mm de diamètre qui conviennent à la chambre de 1ml de solution tampon (PBS). Pour la plupart des expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34µm. L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales. Les échantillons sont balayés le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau de l'intensité de fluorescence (BKAILY *et al.*, 1997a).

Les échantillons marqués sont examinés à l'aide du système de microscopie confocale décrit pour les mesures de l'intensité de fluorescence

du complexe Fluo-3-Ca²⁺, avec un changement de certains paramètres. Le laser d'argon de 20 mV, à toutes les longueurs d'onde d'excitation, est dirigé sur l'échantillon via un filtre dichroïque primaire de 535 nm et atténué avec un filtre de densité neutre de 30% afin de réduire la défluorescence. L'ouverture confocale est toujours de 100 µm. Deux filtres secondaires sont utilisés : un filtre 600 EFLP permettant le passage de la fluorescence émise par la Cy-3 ou l'Alexafluor 546 et non celle émise par la fluorescéine (Alexafluor 488), et un autre filtre de 540 DF 30 permettant le passage de la fluorescence émise par la fluorescéine tout en éliminant la fluorescence résiduelle émise par la Cy-3 ou l'Alexafluor 546. Deux multiplicateurs de photons sont utilisés pour détecter l'intensité de fluorescence des deux anticorps secondaires fluorescents, PMT 1 pour la fluorescence émise par la Cy-3 ou l'Alexafluor 546, et PMT 2 pour celle émise par la fluorescéine (Alexafluor 488). Les échantillons sont balayés par sections et les deux images produites, représentent chacune la fluorescence d'un des deux anticorps secondaires fluorescents.

Pour la plupart des expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34 µm. L'intensité du laser et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales.

En aucun cas nous avons observé un marquage spécifique lorsque l'anticorps primaire avait été omis ou remplacé par le sérum non immun approprié.

2.6. Extraction des protéines totales.

2.6.1. Extraction des protéines cellulaires.

Pour les analyses d'expression des protéines des récepteurs ET_A et ET_B de l'ET-1 dans les CMLVhs , les cellules sont mises en culture dans des boîtes de pétri de 100 mm , une fois à confluence, les cellules traitées sont lysées dans du tampon Laemli 1X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 2%, glycérol 10%, Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) 1 mM, bleu de bromophénol 0.005 %, 2-β-mercaptoéthanol 5%).

Cependant, pour les analyses d'expression des protéines du cycle cellulaire, les CMLVhs mises en culture dans des boîtes de pétri de 100mm sont privées de sérum et des facteurs de croissance une fois à 85% confluence afin de rendre toutes les cellules au même stade du cycle cellulaire. 24 heures après, les cellules traitées sont lysées dans du tampon Laemli 1X. Les lysats cellulaires des deux préparations sont par la suite bouillis pendant 5 min, soniqués puis bouillis à nouveau pour 5 min, les concentrations protéiques de chacun des lysats sont déterminées en utilisant le bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce Chemical Co., E.U.A.) Une courbe standard est établie avec l'albumine de sérum bovin (BSA) effectuée en parallèle à chaque dosage. Tous les échantillons sont dosés en duplicata.

2.6.2. Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires.

Pour les études menées sur la localisation intracellulaire des récepteurs ET_A et ET_B suite à leur stimulation par des agonistes et antagonistes spécifiques, les CMLVhs sont soumis à un protocole de fractionnement décrit par GHEORGHIU *et al.* (2001) afin de séparer les fractions nucléaires du reste de la cellule.

Les cellules sont lavées une fois avec 3ml du PBS 1X, grattées avec un policeman, recueillies dans un tube eppendorf et centrifugées pendant 2 min à 3000 rpm à la température de la pièce. Le culot est resuspendu dans 100µl de tampon de lyse (contenant dans 1ml d'eau bidistillée stérile, 200µl de tampon de lyse 5X (acide (N-[2-hydroxyéthyl] piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]) (Hepes) 50 mM, pH 7.9; disodium éthylènediamide tétraacétique (EDTA) 5 mM; KCl 300 mM), 50µl NP40 10%, 6µl PMSF 0.25M (dans l'éthanol) et 1µl dithiothréitol (DTT) 1M) et laissé lyser pendant 5 min sur glace suivi d'une centrifugation pendant 20 secondes à 13.000 rpm. Pour les extraits cytoplasmiques, le surnageant est recueilli et dilué dans un volume égal de tampon Laemli 2X. Pour les extraits nucléaires, le culot est resuspendu dans 50µl de tampon Laemli 1X. Ces protéines sont ensuite utilisées pour buvardage en western.

2.6.3. Extraction des protéines membranaires.

Pour les analyses de l'expression des protéines ET_A surtout au niveau de la membrane plasmique, les CMLVhs sont récoltées par centrifugation

pendant 7 min à 500 g et lavées 2 fois par une solution B contenant 10mM Hepes, 2mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1 comprimé cocktail inhibiteur EDTA-free, pH 7.0 (LAINÉ *et al.*, 2000). Les fractions membranaires sont préparées dans la solution B contenant de sucrose 250mM avec un potter en effectuant 40 passes en utilisant un piston de téflon serré, de 0.025 cm de jeu. Les cellules non brisées ainsi que les noyaux sont éliminés par centrifugation à 500g pour 10 minutes. Les fractions membranaires sont collectées par centrifugation à 174.000 g pour 30 min en utilisant le rotor TLS-55. Le surnageant (cytosol) est jeté, le culot des fractions membranaires est resuspendu à une concentration de 10 à 20 mg/ml dans la solution A et réservées à -80°C . Pour l'usage immédiat, les protéines membranaires sont lysées dans du tampon Laemli 1X en utilisant la même procédure pour l'extraction des protéines cellulaires décrite ci-dessus.

2.6.4. Buvardage western.

Des quantités équivalentes des protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7.5 ou 10 %).

Produits	Gel d'entassement (4% acrylamide)	Gel de séparation
Acrylamide	1.33 ml	7.5 ml
Tampon de migration 4X	-	7.5 ml
Tampon stacking 4X	2.5 ml	-
SDS 10%	0.1 ml	0.3 ml
Eau bidistillée	6.0 ml	14.6 ml
Ammonium Persulfate		
10% *	50 µl	150 µl
TEMED*	5 µl	10 ml

* Ces deux produits de polymérisation sont ajoutés au mélange juste au moment de couler le gel entre les plaques.

Le gel de séparation est recouvert d'une solution 'overlay' lors de la polymérisation qui peut être de l'eau bidistillée ou du butanol. Cette couche, en isolant le gel de l'air, permet une polymérisation homogène.

Les échantillons (50 à 70 µg) sont bouillis pendant 5 min avant d'être chargés dans les puits. La migration des protéines dure environ 4 heures. Le poids moléculaire des protéines est déterminé par comparaison à la migration d'un marqueur du poids moléculaire (15 à 200 KD; Amersham Life Science, CA). Le transfert des protéines est effectué sur une membrane de nitrocellulose (Amersham-Pharmacia Biotech, Qc, Canada) pendant 2 heures

à 200 watts dans un tampon de transfert (Tris-Base 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1 %). À la fin du transfert, la membrane est récupérée et les protéines sont colorées au rouge de ponceau (Sigma chemicals, MO, E.U.A.) et décolorées par 2 lavages successifs avec de l'eau (DESCHÈNES *et al.*, 2001).

2.6.5. Détection des antigènes.

Pour bloquer les sites antigéniques, la membrane est incubée dans du PBS contenant 5% de lait en poudre écrémé et 0.05 % de Tween-20 pendant au moins 2 heures à 25°C. La membrane est ensuite incubée pour toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires polyclonaux de lapin purifiés par affinité (Alomone labs, Israël; Santa Cruz biotechnology, CA; etc,...) dilués dans la solution de blocage selon les conditions suivantes :

Anticorps	Concentration	Host	Source
anti-ET _A	1 :100	lapin	Alomome labs
anti-ET _B	1 :200	lapin	Alomone labs
anti-ET-1	1 :100	souris	Biodesign
anti-p42/p44-P	1 :500	lapin	Santa Cruz Biotechnology
anti-pRb	1 :1000	souris	Pharmingen
anti-cycline E	1 :1000	souris	Santa Cruz Biotechnology
anti-cycline D	1 :1000	lapin	Santa Cruz Biotechnology
anti-p27	1 :1000	lapin	Santa Cruz Biotechnology

Après trois rinçages de 10 min au PBS-Tween 0.05%, la membrane est incubée pendant une heure à la température de la pièce en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris conjugué à la peroxydase (Amersham Life Science, Ca) dilué dans la solution de blocage dans un rapport de 1 : 5000 (anti-IgG de lapin) ou dans 1 : 1000 (anti-IgG de souris). La membrane est lavée deux fois pendant 10 min dans du PBS-Tween 0.05% et une fois avec du PBS sans Tween. Les complexes immuns sont détectés par chemiluminescence (Amersham ECL, E.U.A.). L'énergie dégagée sous forme lumineuse est visualisée par exposition sur film à autoradiographie de type BIOMAX MR (KODAK, NY, E.U.A.) (DESCHÊNES *et al.*, 2001).

2.7. Détection de l'apoptose.

2.7.1. Fragmentation de l'ADN.

Le protocole de fragmentation de l'ADN est un protocole modifié de FRISCH (1999) et GAUTHIER *et al.* (2001).

Les CMLVhs ont été cultivées dans des boîtes de pétri de 100mm. À 95% confluence, les cellules ont été mises à jeun en présence ou en absence des substances étudiées. Au temps donné, les cellules ont été lysées dans 600µl de tampon de lyse contenant Tris 10mM, EDTA 10mM, Triton X-100 0.5%, H₂O 10ml, pendant 20 min sur glace. Les lysats cellulaires ont été centrifugés à 13.000 rpm pendant 20 min à 4°C. Les surnageants, contenant

l'ADN, ont été soumis à trois extractions successives avec 550µl de phénol-chloroforme : alcool isoamyl (25 : 24 : 1) pH 8, puis centrifugés 3 min à 15.000 rpm. La phase aqueuse (contenant l'ADN) a été ensuite récoltée, pour 380µl de phase aqueuse, l'ADN a été précipité avec 40µl Na acétate 3M (pH 6), 1ml d'éthanol 100% froid (-20°C) et 1.5 µl de glycogène 20µg/ml. Après précipitation de l'ADN toute la nuit à -20°C. L'ADN est culotté par centrifugation pendant 20 min à 13.000 rpm à 4°C, lavé avec de l'EtOH 70% froid (-20°C) puis reculotté par centrifugation durant 4 min à 13.000 rpm à 4°C avant d'être resuspendu dans du TE/NaCl 50mM toute la nuit à la température de la pièce.

Pour éliminer tout ARN contaminant, les échantillons ont été traités avec 80µg / ml d'ARNases (dépourvue d'ADNases) pendant 20 min à 37°C. Une quantité égale d'ADN est chargée sur gel d'agarose de 2% et la fragmentation de l'ADN est visualisée par coloration au bromure d'éthidium, en comparant à un standard de 100 paires de bases, pb, de l'ADN internucléosomique (GIBCO, Burlington, Ont, E.U.A.).

2.8. Statistiques.

Les niveaux d'intensité du calcium libre cytosolique et nucléaire sont représentés comme des valeurs moyennes d'intensité relative de fluorescence. Tous les résultats sont exprimés en terme de valeurs moyennes et d'écart de la moyenne \pm E.S.M (Erreur Standard Moyenne) pour un nombre varié d'expériences (n). La signification statistique est déterminée en utilisant le

test ANOVA des mesures répétées pour les valeurs partielles suivi du test Tukey-Kramer ou du test de Student-Newman-Keuls avec la comparaison multiple pour établir la valeur statistique des résultats. Le test statistique approprié est suggéré par le logiciel " GraphPad prism". Les valeurs de probabilité (P) inférieures à 0.05 sont considérées comme étant significatives.

2.9. Produits utilisés.

Les produits utilisés sont décrits dans le tableau 2 .

Tableau 2 Sommaire des produits utilisés dans nos expériences.

.

Produits	Références	Sources
BIS (Bisindolylmaleimide)	TOULLEC <i>et al.</i> , 1991	Calbiochem
BQ-123 cyclo[D-trp-D-Asp-Pro-D-Val- Leu]	IHARA <i>et al.</i> , 1992	American peptides
BQ-788 N, cis-2,6-dimethyl piperidino carbonyl-L-γ-methyl leucyl-D- 1-methoxy carbonyl-Trp-D- norLeu	ISHIKAWA <i>et al.</i> , 1994	American Peptides
BMS 182874 5-(Dimethylamino)-N-(3,4- dimethyl-5-isoxazolyl)-1- naphthalenesulfonamide	STEIN <i>et al.</i> , 1994	Dr. P. D'orléans- Juste, U. de Sherbrooke
EGTA Ethylene-bis(oxy- ethylenenitro)tetraacetic acid	MUELLER, 1966	Sigma Chemicals
Endothéline-1 Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met- Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe- Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp	YANAGISAWA <i>et al.</i> , 1998	Biodesign
IRL 1620 Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-tyr- phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile- trp-COOH	TAKAI <i>et al.</i> , 1992	Dr. P. D'orléans- Juste, U. de Sherbrooke
PDBu (phorbol 12, 13-dibutyrate)	NISHIZUKA <i>et al.</i> , 1984	Sigma chemicals

III- RÉSULTATS

Ce chapitre a pour but de tester notre hypothèse que la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B module la réponse du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh et de vérifier par la suite l'implication de ces récepteurs dans les effets de l'ET-1 sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.

3.1. L'ET-1 extracellulaire augmente d'une façon dose-dépendante le niveau basal du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des cellules du muscle lisse aortique humain.

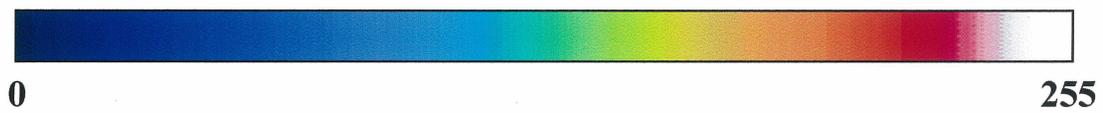
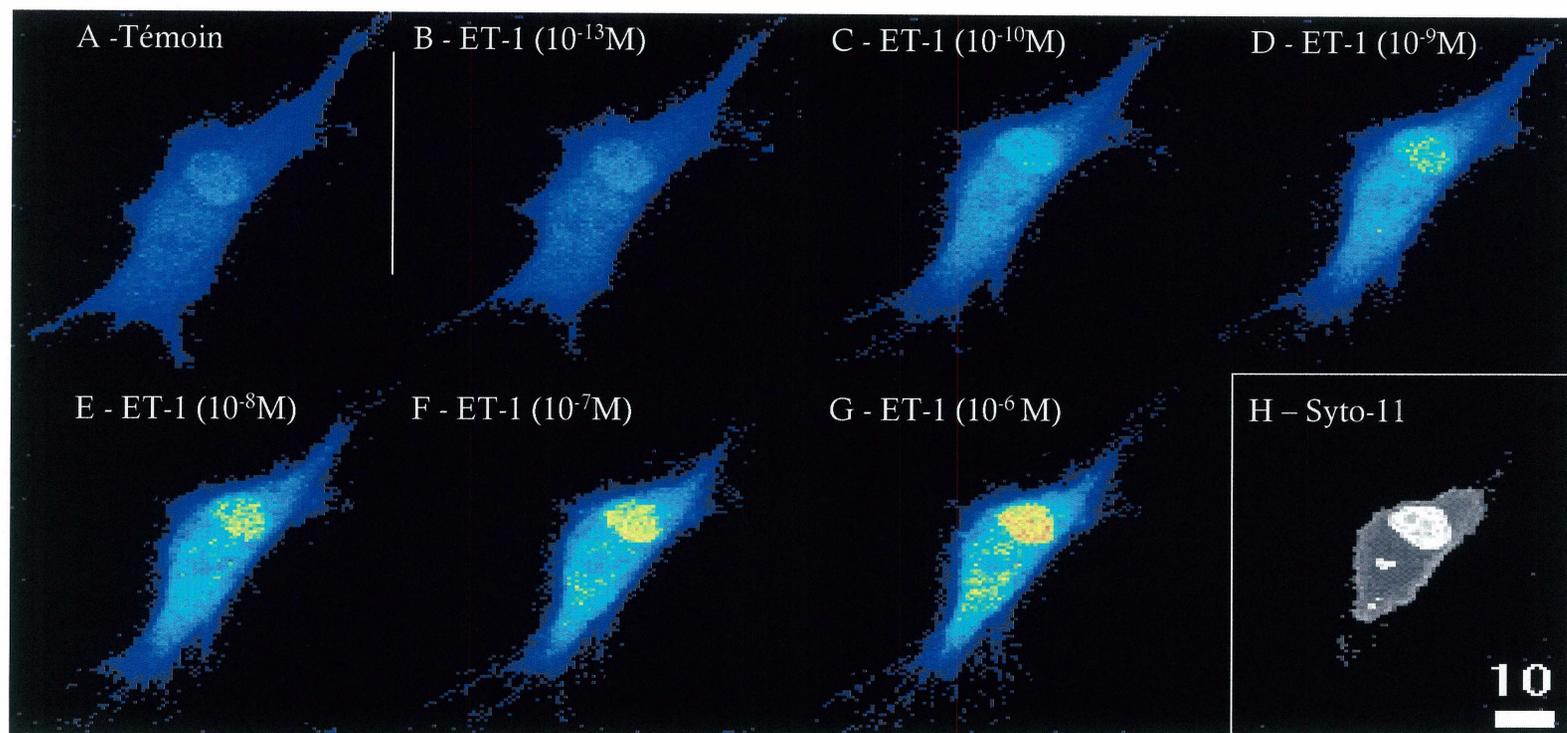
Des études antérieures, menées dans notre laboratoire, ont montré qu'une dose élevée d'ET-1 (10^{-7} M) induisait une augmentation soutenue du niveau calcique basal cytosolique ($[Ca]_c$) et nucléaire ($[Ca]_n$) dans plusieurs types cellulaires incluant les cellules du MLVh (BKAILY *et al.*, 1997a).

Dans cette série d'expériences, nous avons voulu étudier l'effet de différentes doses d'ET-1 extracellulaire (10^{-14} à 10^{-6} M) sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du MLVh afin de déterminer les concentrations produisant 50% de la réponse maximale (EC_{50}).

Les cellules du MLVh, cultivées sur des lamelles en verre, ont été utilisées dans cette série d'expériences. Après 60 min d'incubation avec la sonde calcique Fluo 3-AM et après 15 min d'hydrolyse, les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires des cellules, avant (témoin) et après l'administration

Figure 14 Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations de l'ET-1 extracellulaire sur les niveaux de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du muscle lisse aortique humain étudiées en microscopie confocale.

Cette figure montre la distribution en 3-D du calcium cytosolique et nucléaire dans une cellule du MLVh. **A)** la distribution et l'intensité de la fluorescence basale cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en absence de l'ET-1. **B)** la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du Fluo-3- Ca^{2+} en présence de 10^{-13} M d'ET-1. **C)** la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du Fluo-3- Ca^{2+} en présence de 10^{-10} M d'ET-1, une concentration proche de celle de l' EC_{50} dans le cytosol et le noyau. **D)** la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du Fluo-3- Ca^{2+} en présence de 10^{-9} M d'ET-1, une concentration qui induit une augmentation calcique hautement significative surtout au niveau du noyau (comparée au témoin $p < 0.001$). **E -F)** la distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du Fluo-3- Ca^{2+} en présence de 10^{-8} et 10^{-7} M d'ET-1 respectivement. Ces deux concentrations induisent une augmentation calcique hautement significative au niveau cytosolique et nucléaire (comparée au témoin). **G)** l'effet maximal est atteint à 10^{-6} M d'ET-1. **H)** Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} de 0 à 255. Les couleurs du panneau H n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .



des différentes concentrations d'ET-1, ont été enregistrés. La figure 14 illustre un exemple type et la figure 15 montre la compilation des résultats.

La figure 14 montre l'effet dose-dépendant de l'ET-1 sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une cellule du MLVh. Nous pouvons distinguer dans cette figure la distribution calcique cytosolique et nucléaire au repos (témoin) et suite à la stimulation par l'ET-1 à des concentrations près de la valeur de l' EC_{50} (10^{-10} M) et de l'effet maximal (10^{-6} M). À noter que l'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} est indiquée selon une échelle en pseudo-couleur, où la couleur bleu-foncé représente la fluorescence minimale du Ca^{2+} , alors que la couleur blanche représente l'intensité maximale. Dans les cellules contrôles, le Ca^{2+} libre intracellulaire est plus élevé au niveau du noyau par rapport au cytosol. L'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M induit non seulement une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ mais aussi une contracture cellulaire qui devient de plus en plus prononcée avec l'ajout de doses croissantes d'ET-1. À la fin de l'expérience le noyau des cellules était marqué par la sonde des acides nucléiques, le syto-11, afin de confirmer l'attribution de la réponse calcique au niveau nucléaire. De plus, ce marquage permet par la suite d'analyser l'intensité de la fluorescence calcique libre à l'intérieur du noyau.

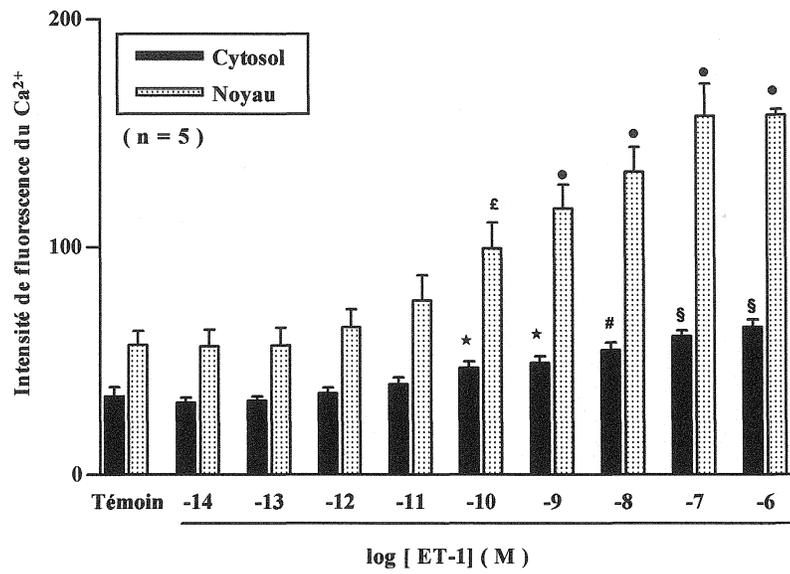
À noter que, les mesures d'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} sont obtenues grâce à l'analyse de la distribution calcique tridimensionnelle effectuée à partir d'images optiques en série générées par la microscopie confocale.

La figure 15A montre la compilation des résultats obtenus en microscopie confocale de l'effet de l'ajout de doses croissantes d'ET-1 extracellulaire sur les niveaux calciques libres cytosoliques et nucléaires. La figure 15B montre les courbes dose-réponse de l'effet de l'ET-1 sur le calcium cytosolique et nucléaire. Comme nous pouvons remarquer sur cette figure, l'intensité de la fluorescence du Ca^{2+} libre nucléaire basal en absence d'ET-1 (56.95 ± 6.1 ; $n = 5$) est supérieure à celle du calcium libre cytosolique (34.54 ± 4.08 ; $n=5$). Cette différence est maintenue en présence de toutes les concentrations d'ET-1 utilisées. L'ET-1 à des concentrations de 10^{-14} M et 10^{-13} M n'affecte pas les niveaux du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$. Les intensités de fluorescence calcique cytosoliques et nucléaires observées à une concentration de 10^{-14} M d'ET-1 sont respectivement 31.81 ± 2.08 et 56.42 ± 7.25 ($n=5$). L'augmentation de la concentration d'ET-1 à 10^{-12} M provoque une élévation du $[\text{Ca}]_c$ (35.77 ± 2.4) et du $[\text{Ca}]_n$ (64.74 ± 7.9); $n=5$. L'administration d'ET-1 à 10^{-11} M induit une augmentation des niveaux du $[\text{Ca}]_c$ (39.67 ± 3.1) et du $[\text{Ca}]_n$ (76.39 ± 11.2); $n=5$. À une concentration de 10^{-10} M, l'ET-1 provoque une augmentation significative du $[\text{Ca}]_c$ (46.9 ± 3.0 ; $p<0.05$) et $[\text{Ca}]_n$ (99.36 ± 11.4 ; $p<0.01$); $n=5$. L'administration d'ET-1 à 10^{-9} M induit une augmentation significative ($p<0.05$) au niveau du $[\text{Ca}]_c$ et hautement significative ($p<0.001$) au niveau du $[\text{Ca}]_n$ avec des intensités de fluorescence $[\text{Ca}]_c$ de 49.06 ± 3.0 et $[\text{Ca}]_n$ de 117.13 ± 10.4 ($n=5$). Une concentration plus élevée de l'ET-1 de l'ordre de 10^{-8} M augmente davantage le $[\text{Ca}]_c$ (54.8 ± 3.2) et le $[\text{Ca}]_n$ (133.02 ± 10.9); $n = 5$.

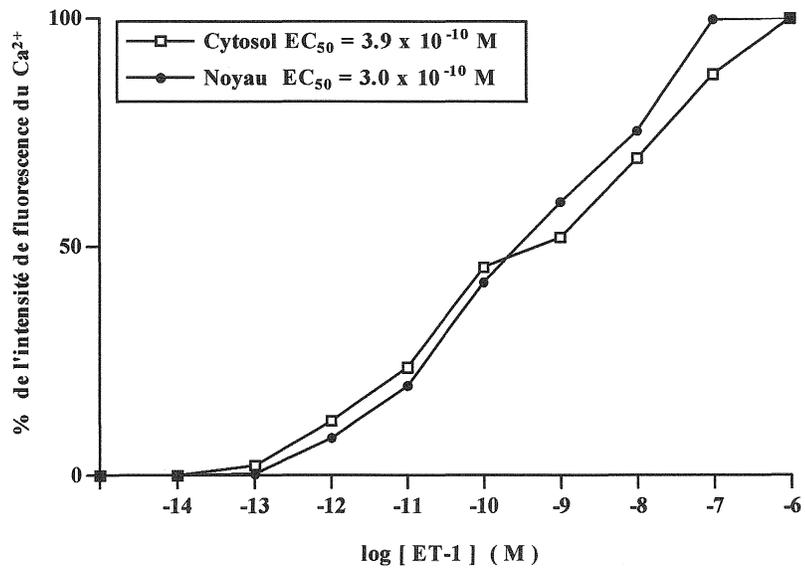
Figure 15 Effet de différentes concentrations de l'ET-1 extracellulaire sur les niveaux de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du muscle lisse aortique humain.

Dans les panneaux A et B, l'ET-1 à une concentration de 10^{-14} M n'a pas d'effet sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$, par contre une concentration plus élevée de l'ET-1 (10^{-13} M) augmente légèrement le $[Ca]_c$ sans affecter le $[Ca]_n$. L'ajout par la suite de doses croissantes de l'ET-1 (10^{-12} - 10^{-7} M) induit une augmentation dose dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. A) Une augmentation significative des niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ est obtenue à des concentrations égales ou plus élevées que 10^{-10} M de l'ET-1. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à 10^{-6} M de l'ET-1. B) Les valeurs des $E C_{50}$ sont 3.9×10^{-10} M pour le cytosol et 3.0×10^{-10} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 5 expériences. «n» est le nombre d'expériences. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, § $p < 0.001$, vs. témoin cytosol; £ $p < 0.01$, ● $p < 0.001$ vs. témoin noyau.

A) Effet de concentrations croissantes de l'ET-1 sur le niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du MLVh



B) Courbe dose-réponse à l'ET-1 du niveau calcique des cellules du MLVh



La Figure 15B montre les courbes doses-réponses de l'effet de l'ET-1 sur le Ca^{2+} cytosolique et nucléaire des cellules du muscle lisse aortique humain. Comme c'est décrit pour la figure 15A, l'ET-1, à des concentrations de 10^{-12} M à 10^{-6} M, induit une augmentation progressive du taux du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$. L' EC_{50} est de 3.9×10^{-10} M (n=5) pour le cytosol et de 3.0×10^{-10} M (n=5) pour le noyau.

En conclusion, ces résultats montrent que l'ET-1 induit une augmentation du $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$ d'une façon concentration-dépendante dans les cellules du MLVh avec un EC_{50} cytosolique semblable à celui au niveau nucléaire. Ceci suggère que l'augmentation calcique nucléaire induite par l'ET-1 est due à l'augmentation du calcium cytosolique. De plus, l'effet physiologique de l'ET-1 sur la contraction, explique davantage la fonctionnalité des récepteurs à l'ET-1 au niveau de la membrane de surface des cellules du MLVh utilisées dans cette étude.

3.2. Effet de l'administration extracellulaire des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B sur l'augmentation soutenue du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du muscle lisse aortique humain.

Dans cette section, nous avons voulu vérifier si l'augmentation soutenue du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est médiée via l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B . En se basant sur les résultats obtenus à partir de la courbe dose réponse (figure 15B), nous avons

choisi une concentration d'ET-1 de 10^{-9} M. Cette concentration proche de l' EC_{50} est capable de produire une augmentation soutenue, mais non saturante, du calcium cytosolique et nucléaire.

3.2.1. Effet préventif et curatif de l'administration extracellulaire des antagonistes peptidique des récepteurs ET_A , le BQ-123 et non-peptidique le BMS-182874, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

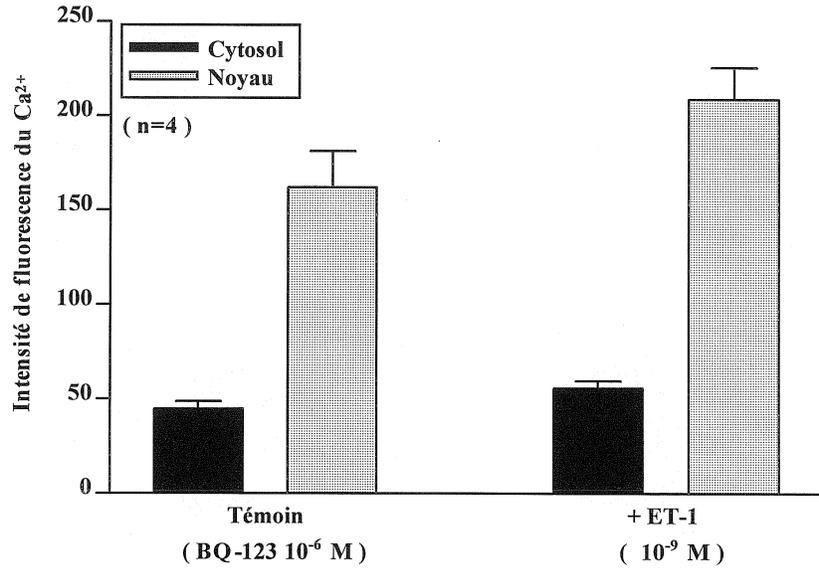
Dans ces séries d'expériences, nous avons tenté de vérifier si l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_c$ et le $[Ca]_n$ est médié via l'activation des récepteurs ET_A . Dans une première série d'expériences, nous avons testé l'effet du prétraitement à l'antagoniste peptidique du récepteur ET_A , le BQ-123, sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et le $[Ca]_n$ induite par l'ET-1. Les cellules du MLVh sont incubées en présence d'une concentration de 10^{-6} M de BQ-123 pendant 10 minutes (figure 16A). Par la suite, le niveau du calcium basal est mesuré en présence de l'antagoniste peptidique, le BQ-123. En présence du BQ-123, le $[Ca]_c$ est 45.0 ± 4.0 ; n=4, par contre, le $[Ca]_n$ est 162.0 ± 19.1 ; n=4. L'addition de l'ET-1 à une concentration finale de 10^{-9} M, n'a pas affecté le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (respectivement 56.0 ± 4.0 et 209.0 ± 17.0 ; n=4).

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons voulu examiner l'effet du prétraitement à l'antagoniste non-peptidique, le BMS-182874, sur la réponse

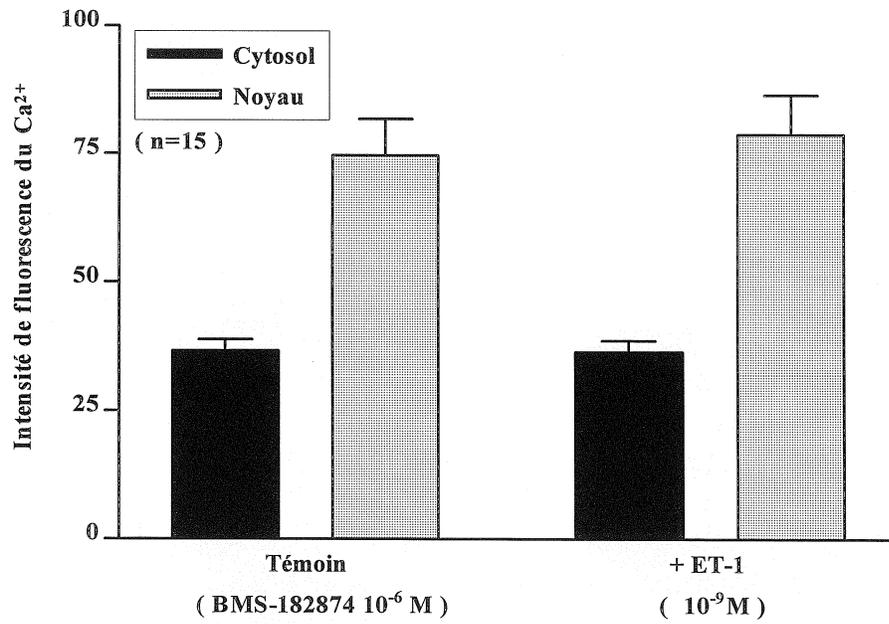
Figure 16 Effet, en préventif, des antagonistes peptidique (BQ-123) et non peptidique (BMS-182874) des récepteurs ET_A sur la réponse calcique induite par l'ET-1.

L'incubation, en préventif, des cellules du MLVhs avec l'antagoniste peptidique des récepteurs ET_A, le BQ-123 (10^{-6} M) (A) ou l'antagoniste non-peptidique, le BMS-182874 10^{-6} M (B) pendant 7 à 10 min semble prévenir la réponse calcique induite par l'ET-1. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 4 (A) à 15 (B) expériences.

A)



B)



calcique induite par l'ET-1 dans les cellules intactes du MLVh (figure 16B). Comme pour le BQ-123, les cellules sont incubées en présence d'une concentration de 10^{-6} M de BMS-182874 pendant 10 minutes. Par la suite, le niveau du calcium basal est mesuré en présence du BMS-182874 pour le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (respectivement 36.6 ± 2.2 et 74.6 ± 7.1 ; $n=15$). En présence de l'antagoniste non-peptidique, le BMS-182874, l'addition de l'ET-1 à une concentration finale de 10^{-9} M, n'a pas affecté les niveaux du $[Ca]_c$ (36.3 ± 2.2 ; $n=15$) et du $[Ca]_n$ (78.8 ± 7.7 ; $n=15$).

Dans une autre série d'expériences, nous avons vérifié si les antagonistes peptidiques (BQ-123) et non-peptidiques (BMS-182874) du récepteur ET_A sont capables de bloquer en mode curatif l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du muscle lisse aortique humain.

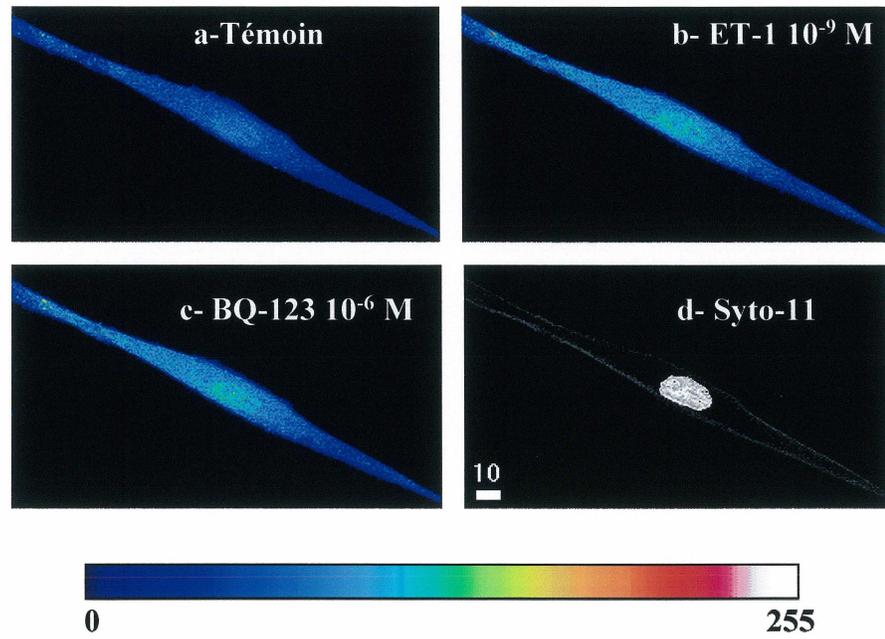
La figure 17A illustre une expérience représentative de l'effet de l'antagoniste peptidique du récepteur ET_A (BQ-123) sur les réponses calciques cytosoliques et nucléaires de l'ET-1 dans les cellules du MLVh étudiées en microscopie confocale. L'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M produit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ par rapport au témoin. L'ajout subséquent du BQ-123 (10^{-6} M) (10 min) ne bloque pas l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire.

La figure 17B montre la compilation des résultats obtenus en microscopie confocale. Dans cette série d'expériences et après avoir déterminé le taux basal du calcium cytosolique (34.0 ± 1.8 ; $n = 4$) et nucléaire

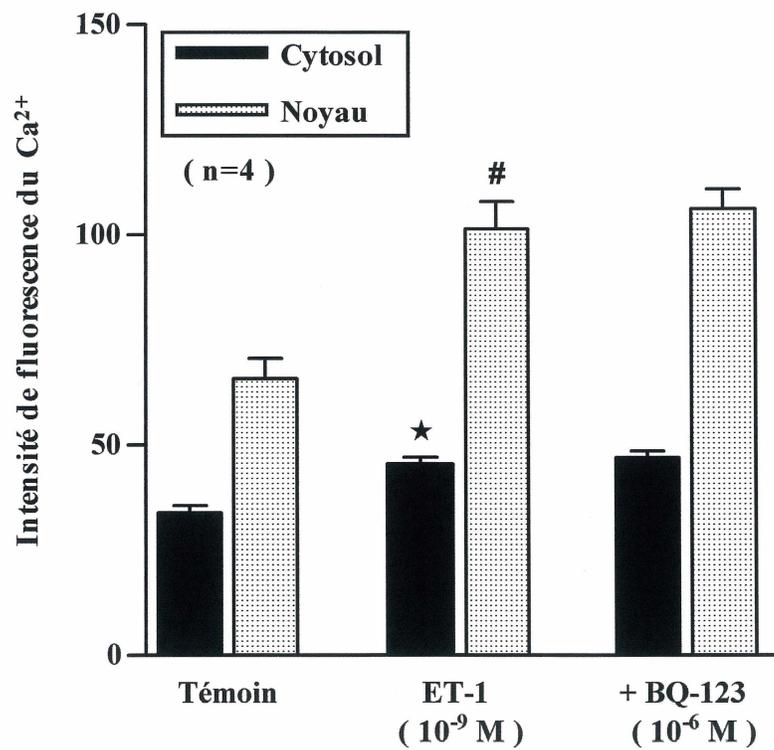
Figure 17 Effet, en curatif, de l'antagoniste des récepteurs ET_A (BQ-123) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.

A) Expérience représentative de l'effet de l'antagoniste des récepteurs ET_A (BQ-123) sur les réponses calciques cytosoliques et nucléaires induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh étudiées en microscopie confocale. L'ET-1 à une concentration de 10⁻⁹ M (b) produit une augmentation soutenue du [Ca]_c et [Ca]_n par rapport au témoin (a). c) L'ajout subséquent du BQ-123 (10⁻⁶ M) ne bloque pas l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire. d) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3-Ca²⁺ de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en µm. **B)** Des histogrammes montrant que l'ET-1 à une concentration de 10⁻⁹ M induit une augmentation soutenue du [Ca]_c et [Ca]_n, l'ajout subséquent de l'antagoniste des récepteurs ET_A, le BQ-123 (10⁻⁶ M) ne bloque pas l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire. Les valeurs sont présentées comme moyennes ± erreur standard de la moyenne de 4 expériences. *p<0.01 vs. témoin cytosol; # p <0.01 vs. témoin noyau.

A)



B)



(66.0 ± 5.0 ; $n = 4$). Nous avons stimulé les cellules avec l'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M. Comme c'est prévu, l'ET-1 induit une augmentation soutenue et significative du $[Ca]_c$ (45.6 ± 1.7 ; $p < 0.01$; $n=4$) et du $[Ca]_n$ (101.4 ± 6.5 ; $p < 0.01$; $n=4$). Après la stimulation avec l'ET-1, les cellules étaient exposées à une concentration de 10^{-6} M de l'antagoniste peptidique du récepteur ET_A de l'ET-1, le BQ-123. Cette concentration est connue pour bloquer complètement l'activité des récepteurs ET_A . Nos résultats indiquent que l'antagoniste peptidique du récepteur ET_A , en mode curatif, est sans effet sur les niveaux du $[Ca]_c$ (47.0 ± 1.6 ; $n=4$) et $[Ca]_n$ (106.2 ± 4.7 ; $n=4$) induits par l'ET-1.

D'autre part, nos résultats, en mode préventif, ont montré que les antagonistes peptidiques et non-peptidiques du récepteur ET_A étaient capables de prévenir l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire. Ces résultats suggèrent ainsi l'implication des récepteurs ET_A dans la réponse calcique à l'ET-1 dans les cellules du MLVh. Par contre, l'antagoniste peptidique, le BQ-123, prévient l'effet de l'ET-1 mais il n'est pas capable en mode curatif de bloquer l'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1. Dans une autre série d'expériences, nous avons voulu examiner si en mode curatif, l'utilisation d'un antagoniste non-peptidique pouvait engendrer un effet différent de celui de l'antagoniste peptidique sur la réponse calcique induite par l'ET-1. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons répété le même protocole expérimental que celui utilisé

en présence du BQ-123, mais cette fois ci, nous avons utilisé l'antagoniste non-peptidique, le BMS-182874 (10^{-6} M).

La figure 18A illustre une expérience représentative de l'effet de l'antagoniste non-peptidique du récepteur ET_A (BMS-182874) sur les réponses calciques cytosoliques et nucléaires induites par l'ET-1 dans les cellules du MLVh étudiées en microscopie confocale. L'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M produit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ par rapport au témoin, l'ajout subséquent du BMS-182874 (10^{-6} M) bloque l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire.

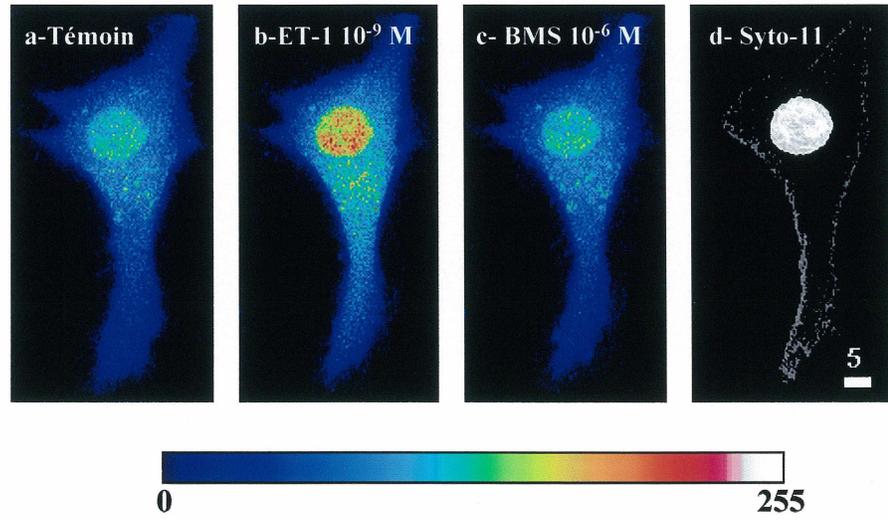
La figure 18B montre la compilation des résultats de l'effet, en curatif, du BMS-182874 sur la réponse calcique induite par l'ET-1. Comme d'habitude, nous avons procédé au début, à la mesure des niveaux basaux stables du $[Ca]_c$ (34.0 ± 1.5 ; $n=15$) et du $[Ca]_n$ (66.4 ± 5.0 ; $n=15$). L'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M produit une augmentation soutenue et significative du $[Ca]_c$ (52.6 ± 3.4 ; $p<0.001$; $n=15$) et du $[Ca]_n$ (158.5 ± 13.0 ; $p<0.001$; $n=15$). L'ajout subséquent de l'antagoniste non-peptidique du récepteur ET_A , le BMS-182874, à une concentration de 10^{-6} M renverse l'effet de l'ET-1 en diminuant les niveaux du $[Ca]_c$ (34.5 ± 1.5 ; $p<0.001$; $n=15$) et du $[Ca]_n$ (75.5 ± 4.3 ; $p<0.001$; $n=15$) d'une façon significative.

Ces résultats suggèrent encore une fois l'implication du récepteur ET_A dans la réponse calcique cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh. Par contre, il semble que l'antagoniste non-peptidique (BMS-182874) administré en mode curatif est plus efficace que l'antagoniste

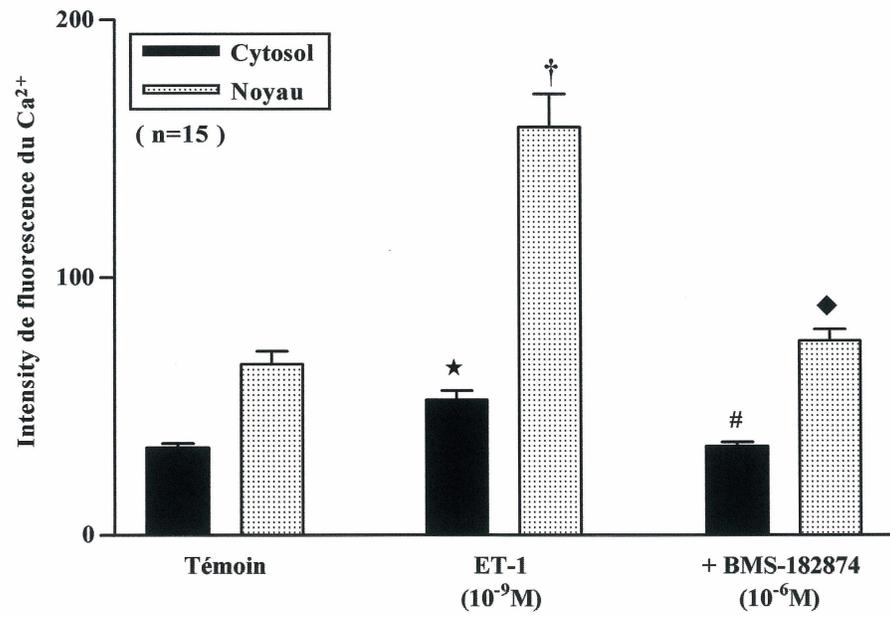
Figure 18 Effet, en curatif, de l'antagoniste non peptidique des récepteurs ET_A (BMS-182874) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.

A) Une expérience représentative de l'effet de l'antagoniste des récepteurs ET_A (BMS-182874) sur les réponses calciques cytosoliques et nucléaires de l'ET-1 dans les cellules du MLVh étudiées en microscopie confocale. L'ET-1 à une concentration de 10⁻⁹ M (b) produit une augmentation soutenue du [Ca]_c et [Ca]_n par rapport au témoin (a). c) L'ajout subséquent du BMS-182874 (10⁻⁶ M) bloque l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire. d) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3-Ca²⁺ de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm. **B)** Des histogrammes montrant que l'ET-1 à une concentration de 10⁻⁹ M induit une augmentation soutenue du [Ca]_c et [Ca]_n, l'ajout subséquent de l'antagoniste des récepteurs ET_A, le BMS-182874 (10⁻⁶ M) bloque l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire. Les valeurs sont présentées comme moyennes ± erreur standard de la moyenne de 15 expériences. *p <0.001 vs. témoin cytosol; # p <0.001 vs. ET-1 cytosol; † p <0.001 vs. témoin noyau; ◆ p <0.001 vs. ET-1 noyau.

A)



B)



peptidique (BQ-123) pour bloquer les effets de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ dans les cellules du MLVh.

3.2.2. Effet, en modes préventif et curatif, de l'antagoniste peptidique du récepteur ET_B, le BQ-788, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

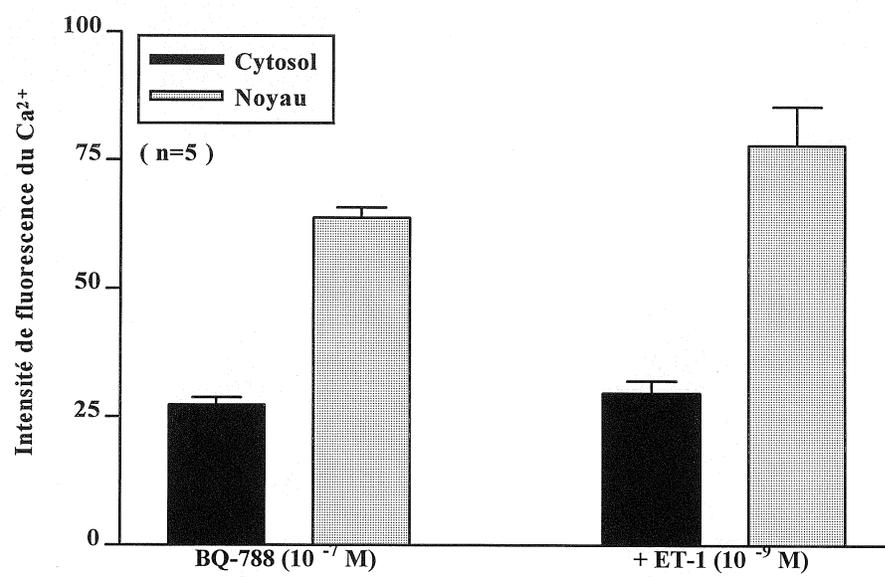
Dans cette série d'expérience, nous avons tenté de vérifier si, comme le récepteur ET_A, le récepteur ET_B est aussi impliqué dans la réponse calcique cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

Dans une première série d'expériences, nous avons voulu déterminer si l'antagoniste peptidique du récepteur ET_B prévient l'activation de ce type de récepteur de l'ET-1. Comme le montre la figure 19, après traitement des cellules du MLVh au BQ-788 (10^{-7} M) pendant 10 min, les niveaux du $[Ca]_c$ (27.3 ± 1.5 ; n=5) et du $[Ca]_n$ (63.7 ± 2.0 ; n=5) sont mesurés. Ensuite, toujours en présence du BQ-788, l'ajout de l'ET-1, (10^{-9} M), n'a pas produit un effet significatif sur les niveaux du $[Ca]_c$ (29.6 ± 2.4 ; n=5) et du $[Ca]_n$ (78.0 ± 7.6 ; n=5) induits par l'ET-1.

Dans une deuxième série d'expérience, nous avons voulu vérifier si l'antagoniste peptidique du récepteur ET_B bloque l'effet de l'ET-1 en mode curatif. La figure 20 A montre un exemple de la distribution du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ suite à la stimulation de ces cellules avec l'ET-1 (10^{-9} M), ainsi que l'absence

Figure 19 Effet, en préventif, de l'antagoniste des récepteurs ET_B (BQ-788) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.

L'incubation, en préventif, des cellules du MLVh avec l'antagoniste des récepteurs ET_B, le BQ-788 (10^{-7} M) pendant 10 min semble prévenir la réponse calcique induite par l'ET-1 (10^{-9} M). Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 5 expériences.



d'effet en mode curatif de l'antagoniste peptidique, le BQ-788 (10^{-7} M). Après l'ajout de 10^{-9} M d'ET-1, nous observons une augmentation soutenue du Ca^{2+} tant au niveau cytosolique qu'au niveau nucléaire. En présence de l'ET-1, le BQ-788 à une concentration de 10^{-7} M n'affecte pas le $[\text{Ca}]_i$ dans ces cellules.

La figure 20B montre la compilation des résultats obtenus dans cette série d'expériences. Le niveau basal du $[\text{Ca}]_c$ (35.8 ± 2.2 ; $n=8$) et du $[\text{Ca}]_n$ (61.7 ± 5.6 ; $n=8$) est mesuré dans les cellules témoins. La stimulation des récepteurs à l'ET-1 membranaires à une concentration de 10^{-9} M d'ET-1 induit, dans les cellules du MLVh, une augmentation soutenue et significative du $[\text{Ca}]_c$ (48.5 ± 2.6 ; $p<0.01$; $n=8$) et du $[\text{Ca}]_n$ (91.0 ± 6.5 ; $p<0.01$; $n=8$). Dans le but de vérifier si cette réponse calcique soutenue est médiée via l'activation du récepteur de type ET_B , nous avons administré en présence de l'ET-1, l'antagoniste peptidique du récepteur ET_B , le BQ-788. Les résultats montrent que, le BQ-788 en mode curatif ne bloque pas l'augmentation du $[\text{Ca}]_c$ (52.2 ± 2.6 ; $n=8$) et du $[\text{Ca}]_n$ (111.0 ± 10.5 ; $n=8$) induite par l'ET-1.

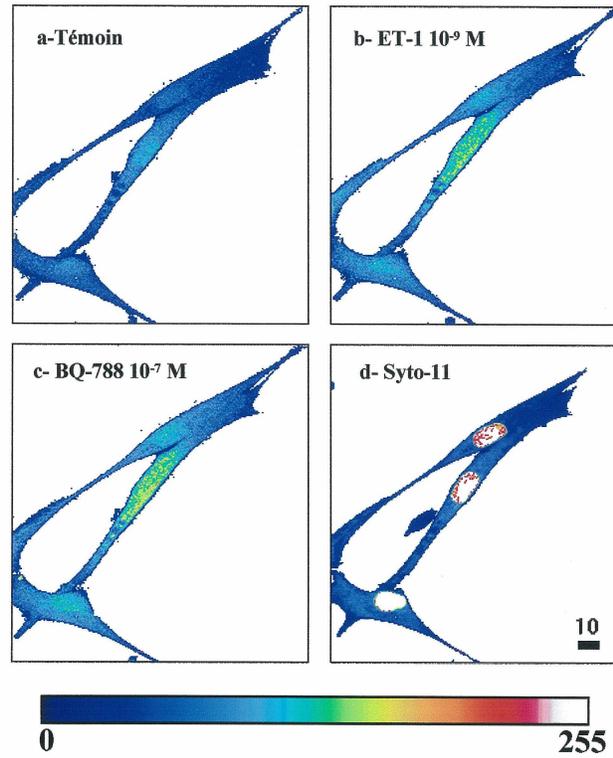
3.3. Effet de l'agoniste de récepteur ET_B , l'IRL 1620, sur le niveau basal du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$ des cellules du MLVh.

Nos résultats de la section 3.2.2 ont montré que l'antagoniste des récepteurs ET_B , le BQ-788 semble prévenir l'effet de l'ET-1 sur le calcium cytosolique et nucléaire des cellules du MLVh. Ces résultats suggèrent

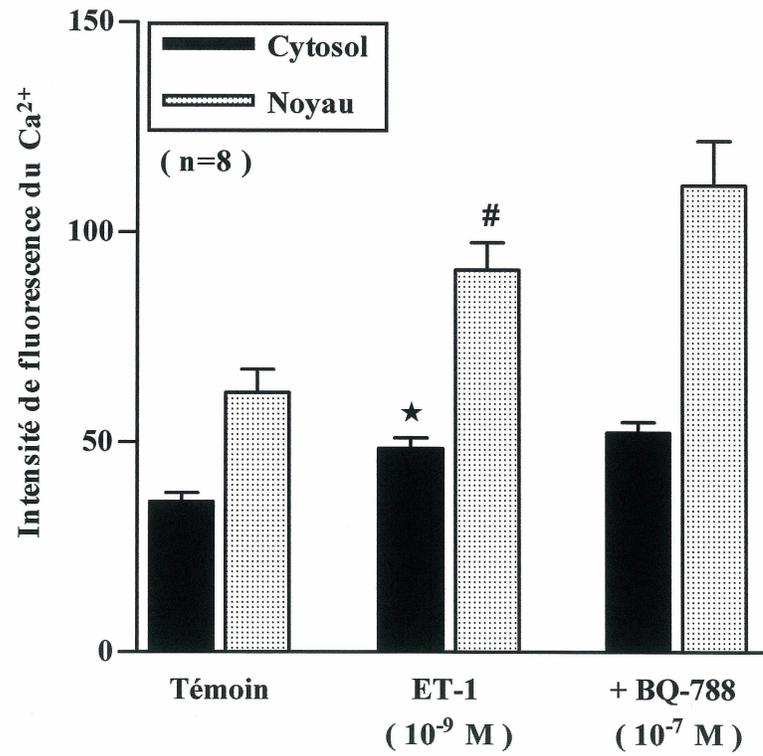
Figure 20 Effet, en curatif, de l'antagoniste des récepteurs ET_B (BQ-788) sur la réponse calcique induite par l'ET-1.

A) Une expérience représentative de l'effet de l'antagoniste des récepteurs ET_B (BQ-788) sur les réponses calciques cytosoliques et nucléaires de l'ET-1 dans les CMLVhs étudiées en microscopie confocale. L'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M (b) produit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ par rapport au témoin (a). c) L'ajout subséquent de l'antagoniste des récepteurs ET_B, le BQ-788 10^{-7} M n'affecte pas l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire. d) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} de 0 à 255. Pour le Syto-11, panneau d, les couleurs n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en noir est en μm . **B)** Des histogrammes montrant que l'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. L'ajout subséquent de l'antagoniste des récepteurs ET_B, le BQ-788 (10^{-7} M) ne bloque pas l'effet de l'ET-1 sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 8 expériences. * $p < 0.01$ vs. témoin cytosol; # $p < 0.01$ vs. témoin noyau.

A)



B)



que le récepteur de type ET_B participe en partie à la réponse calcique induite par l'ET-1 dans le MLVh.

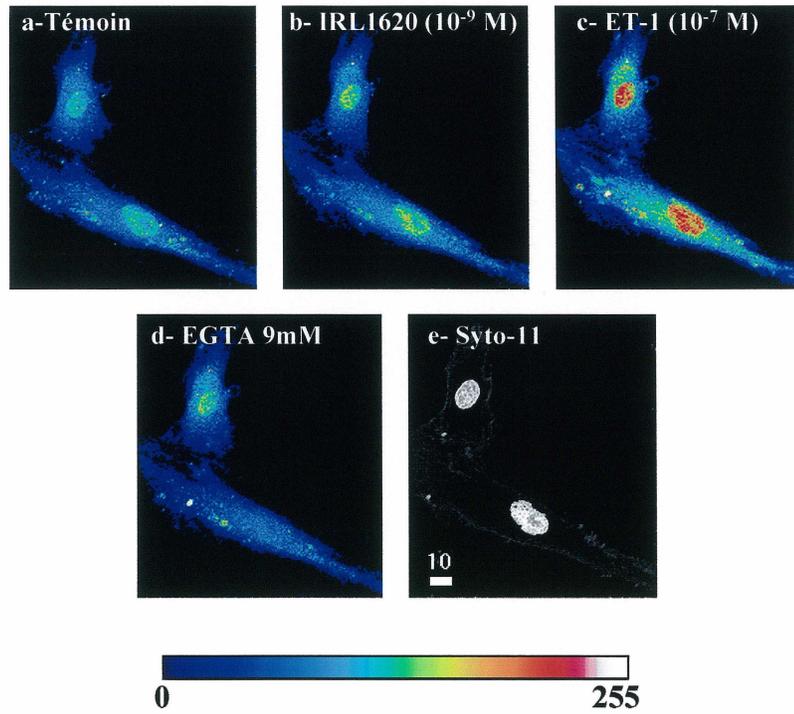
Afin de vérifier davantage l'implication de ces récepteurs dans les effets observés de l'ET-1 dans nos cellules, nous avons étudié les effets d'un agoniste sélectif du récepteur ET_B , l'IRL 1620 sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du MLVh. La figure 21A illustre l'effet de l'IRL 1620 sur l'augmentation du calcium intracellulaire dans une cellule de muscle lisse aortique humain. L'IRL 1620, à une concentration de 10^{-9} M, induit une augmentation calcique cytosolique et nucléaire marquée. L'ajout subséquent de l'ET-1 (10^{-7} M), augmente davantage l'intensité de fluorescence du calcium cytosolique et nucléaire. Par contre, le chélateur de calcium, l'EGTA (9mM) réduit le calcium intracellulaire jusqu'aux niveaux contrôles.

La figure 21B représente la compilation des résultats obtenus avec l'agoniste sélectif du récepteur ET_B , l'IRL 1620 qui, à une concentration de 10^{-9} M, induit une augmentation soutenue et significative du $[Ca]_c$ (38.5 ± 4.2 ; $n=3$) et du $[Ca]_n$ (94.0 ± 5.2 ; $p < 0.05$; $n=3$) par rapport au niveau du $[Ca]_c$ (32.4 ± 0.9 ; $n=3$) et du $[Ca]_n$ (72.4 ± 3.8 ; $n=3$) dans les cellules contrôles. L'ajout subséquent de l'ET-1 à une concentration plus élevée de l'ordre de 10^{-7} M provoque davantage une augmentation soutenue et significative du $[Ca]_c$ (53.0 ± 10.6 ; $n=3$) et du $[Ca]_n$ (136.0 ± 12.3 ; $p < 0.05$; $n=3$). Cette augmentation calcique soutenue induite par l'IRL 1620 et l'ET-1 a été complètement bloquée ($p < 0.05$) par le chélateur calcique, l'EGTA ($[Ca]_c = 29.4 \pm 2.9$ et $[Ca]_n = 52.5 \pm 11.5$; $n=3$).

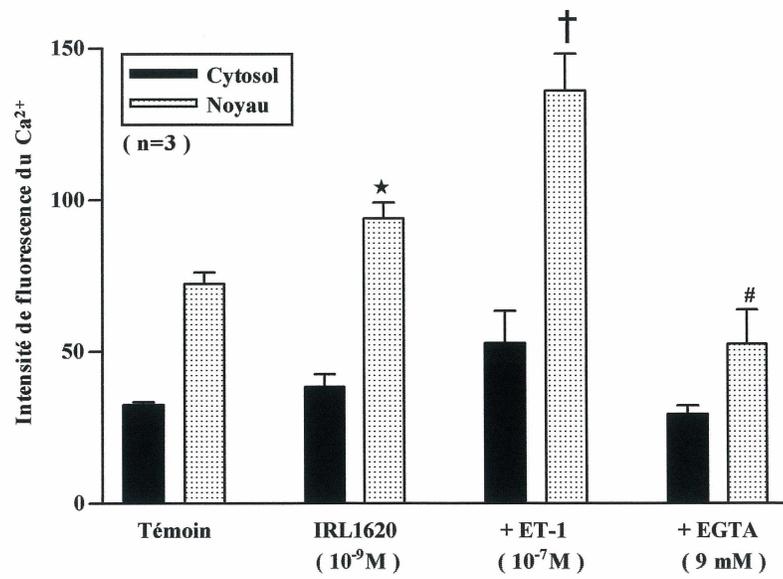
Figure 21 Effet de l'agoniste sélectif des récepteurs ET_B (IRL 1620) et l'ET-1 sur le [Ca]_c et [Ca]_n des cellules du MLVh.

A) Une expérience représentative de l'effet de l'agoniste des récepteurs ET_B (IRL 1620) sur les réponses calciques cytosoliques et nucléaires de l'ET-1 dans les CMLVhs étudiées en microscopie confocale. L'IRL 1620 à une concentration de 10⁻⁹ M (b) produit une augmentation soutenue du [Ca]_c et [Ca]_n par rapport au témoin (a). c) L'ajout subséquent de l'ET-1 (10⁻⁷ M) augmente davantage le [Ca]_c et [Ca]_n. Cet effet est complètement renversé suite à la chélation du calcium extracellulaire par l'EGTA (d). e) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3-Ca²⁺ de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm. **B)** Des histogrammes montrant que l'IRL 1620 à une concentration de 10⁻⁹ M induit une augmentation soutenue du [Ca]_c et [Ca]_n, et l'ajout subséquent de l'ET-1 provoque davantage une augmentation soutenue du [Ca]_c et [Ca]_n qui a été complètement bloqué par le chélateur calcique l'EGTA. Les valeurs sont présentées comme moyennes ± erreur standard de la moyenne de 3 expériences. *p<0.05 vs. témoin noyau; †p <0.05 vs. IRL 1620 noyau; # p <0.05 vs. ET-1 noyau.

A)



B)



En conclusion, ces résultats suggèrent l'implication des récepteurs ET_B dans la réponse calcique cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

3.4. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est due à l'activation des récepteurs ET_A et /ou ET_B couplés à une protéine G sensible aux PTX et CTX.

Puisque les récepteurs à l'ET-1 appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, et suite à l'identification des récepteurs ET_A et ET_B par des études pharmacologiques au niveau des cellules du MLVh, nous avons par la suite déterminé quelle est la protéine G couplée aux récepteurs de l'ET-1 dans les cellules du MLVh. Des études publiées par notre groupe ont montré que l'augmentation soutenue de [Ca]_i induite par l'ET-1 dans différents types cellulaires est due au couplage des récepteurs à l'ET-1 à une protéine G sensible aux PTX et CTX (BKAILY *et al.*, 1997b).

En se basant sur la sensibilité des protéines G à la toxine de pertussis (PTX) et/ou à la toxine de choléra (CTX), nous avons vérifié si l'augmentation soutenue du [Ca]_i induite par l'ET-1 est médiée via l'activation des protéines G sensibles au PTX et/ou CTX.

3.4.1. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est due à l'activation des récepteurs ET_A et /ou ET_B couplés à une protéine G sensible à la PTX.

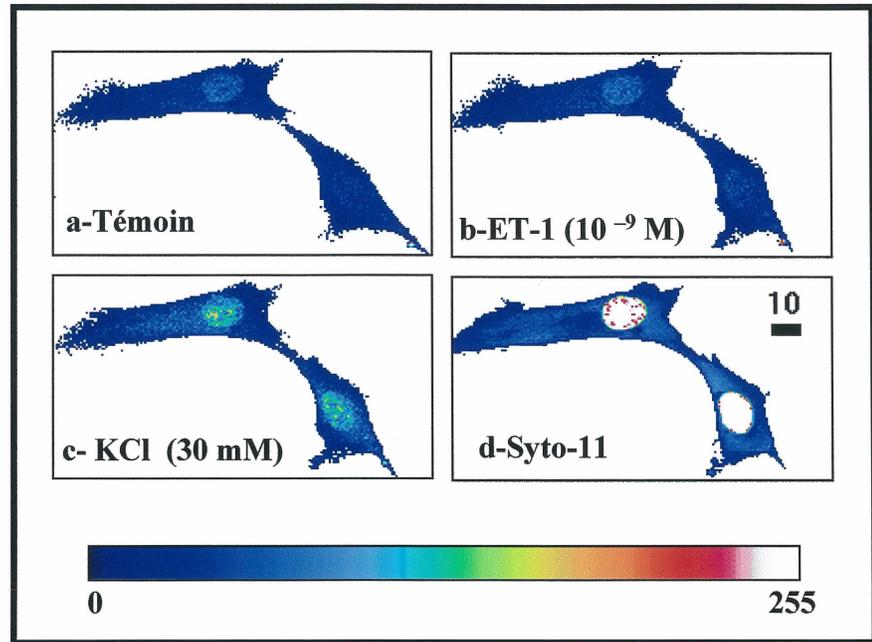
Dans cette série d'expériences, nous avons traité les cellules du MLVh à la toxine de pertussis (PTX) à une concentration de 100ng/ml pendant 18h à 37°C. La figure 22A illustre un exemple de l'effet du prétraitement des cellules du MLVh au PTX sur l'augmentation du [Ca]_c et [Ca]_n induite par l'ET-1. À une concentration de 10⁻⁹M, l'ET-1 n'affecte pas l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire dans les 2 cellules du MLVh traitées au PTX. Par contre, en présence de PTX et de l'ET-1, la dépolarisation de la membrane de surface par le KCl (30 mM) induit une augmentation du [Ca]_c et [Ca]_n.

La figure 22B montre la compilation de toutes les expériences réalisées pour le même protocole. Cette figure montre que les cellules du MLVh prétraitées à la toxine de pertussis (PTX) ont un niveau basal du [Ca]_c de 28.4 ± 1.8 et du [Ca]_n de 53.7 ± 6.6 (n=7). En présence de PTX, l'application de l'ET-1 (10⁻⁹ M) n'a pas d'effet sur le [Ca]_c (29.4 ± 1.7; n= 7) et le [Ca]_n (57.0 ± 6.4; n=7). Ces résultats suggèrent que le prétraitement de ces cellules au PTX inhibe la réponse calcique initialement observée suite à la stimulation par l'ET-1 pour la même concentration de 10⁻⁹ M. Par contre, dans les cellules prétraitées à la PTX et en présence de l'ET-1, la dépolarisation de la membrane cellulaire par une concentration élevée de

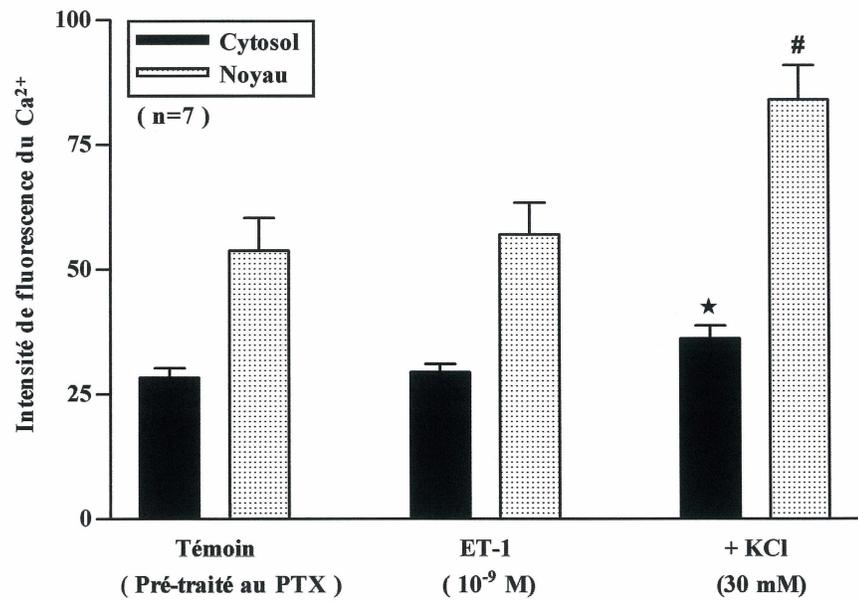
Figure 22 Effet de l'ET-1 sur la réponse calcique dans les cellules du MLVh prétraitées à la toxine de pertussis (PTX).

A) Une expérience représentant deux cellules du MLVh situation contrôle après prétraitement au PTX (a). L'ajout de l'ET-1 (b) à une concentration de 10^{-9} M n'a pas d'effet sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. c) La dépolarisation de la membrane de surface par le KCl induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. d) Marquage du noyau par la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle en pseudocouleur représente les niveaux d'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Pour le panneau d, les couleurs n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en noir est en μm . **B)** Des histogrammes montrant que dans les cellules prétraitées au PTX, l'application de l'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M n'a pas d'effet sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Par contre, la dépolarisation de la membrane de surface par le KCl induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 7 expériences. * $p < 0.05$ vs. témoin cytosol; # $p < 0.01$ vs. témoin noyau.

A)



B)



KCl (30 mM) induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ (36.2 ± 2.6 ; $p < 0.05$; $n = 7$) et du $[Ca]_n$ (84.0 ± 6.9 ; $p < 0.01$; $n=7$).

3.4.2. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est due à l'activation des récepteurs ET_A et /ou ET_B couplés à une protéine G sensible à la CTX.

Dans cette série d'expériences, nous avons testé les effets de prétraitement des cellules du MLVh à la toxine de choléra (CTX) à une concentration de $1 \mu\text{g/ml}$ pendant 6h à 37°C sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par l'ET-1.

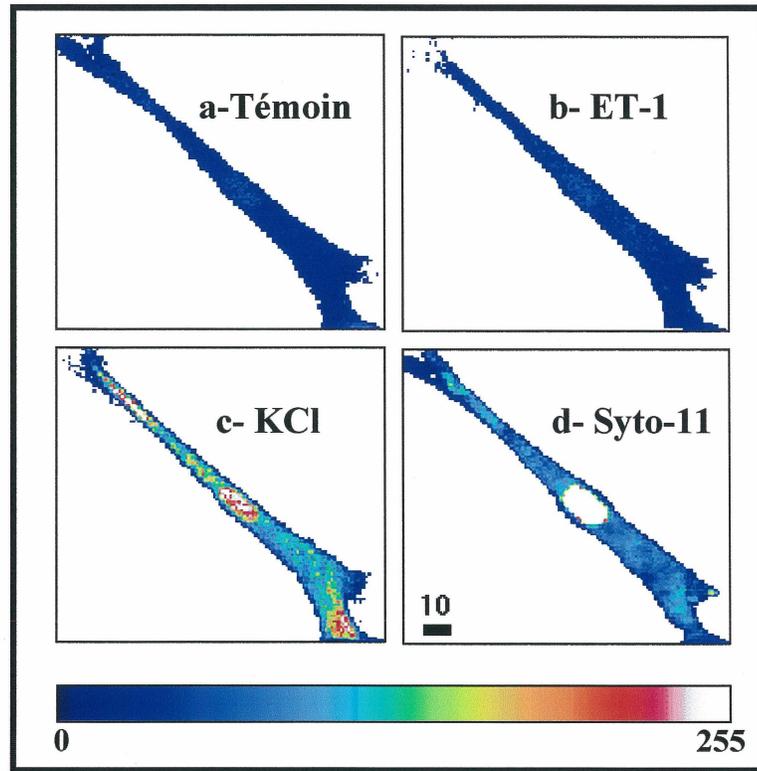
La figure 23A illustre un exemple de l'effet du prétraitement des cellules du MLVh au CTX sur l'effet de l'ET-1 sur le niveau basal du calcium cytosolique et nucléaire. L'ajout de l'ET-1, à 10^{-9} M n'affecte pas l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire des cellules du MLVh. En présence de PTX et de l'ET-1, la dépolarisation de la membrane de surface par le KCl (30 mM) induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$.

La figure 23B montre la compilation des résultats obtenus avec le prétraitement des cellules du MLVh au CTX. Comme nous pouvons remarquer dans cette figure, les cellules prétraitées au CTX possèdent un niveau basal du $[Ca]_c$ de 24.3 ± 1.8 et du $[Ca]_n$ de 47.1 ± 8.0 ($n=6$). L'application de l'ET-1 aux cellules du MLVh prétraitées à la CTX n'a pas augmenté le $[Ca]_c$ (28.0 ± 2.6 ; $n= 6$) et le $[Ca]_n$ (47.0 ± 6.9 ; $n=6$). Ces résultats suggèrent que le prétraitement des cellules du MLVh au

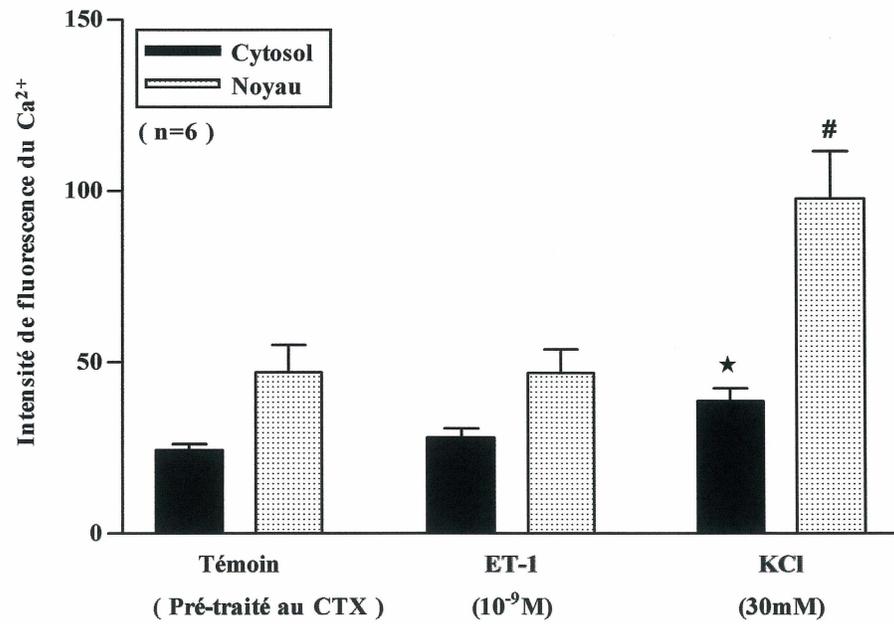
Figure 23 Effet de l'ET-1 sur la réponse calcique dans les cellules du MLVh prétraitées à la toxine de choléra (CTX).

A) Une représentation d'une cellule du MLVh en situation contrôle après prétraitement au CTX (a). L'ajout de l'ET-1 (b) à une concentration de 10^{-9} M n'a pas d'effet sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules prétraitées au CTX. c) La dépolarisation de la membrane de surface par le KCl induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. d) Marquage du noyau par la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle en pseudocouleur représente les niveaux d'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Pour le panneau d, les couleurs n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en noir est en μm . **B)** Des histogrammes montrant que dans les cellules prétraitées au CTX, l'application de l'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M n'a pas d'effet sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Par contre, la dépolarisation de la membrane de surface par le KCl induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 6 expériences. * $p < 0.01$ vs. témoin cytosol; # $p < 0.01$ vs. témoin noyau.

A)



B)



CTX inhibe la réponse calcique initialement observée suite à la stimulation par l'ET-1 (et en présence de l'ET-1). Par contre, le prétraitement au CTX n'a pas affecté la réponse calcique suite à la dépolarisation de la membrane par le KCl (30 mM). Ainsi, dans les cellules prétraitées au CTX et en présence de l'ET-1, la dépolarisation de la membrane de surface par une concentration élevée de KCl induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ (38.6 ± 3.7 ; $p < 0.01$; $n = 6$) et du $[Ca]_n$ (97.8 ± 13.8 ; $p < 0.01$; $n=6$) en comparant avec le taux de calcium basal dans les cellules prétraitées au CTX et en présence d'ET-1.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs ET_A et ET_B des cellules du MLVh par l'ET-1 semble impliquer leur couplage à une protéine G doublement sensible aux PTX et CTX.

3.5. L'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh n'est pas due à l'activation de la voie de la protéine Kinase C.

Il est bien accepté que la stimulation des récepteurs à l'ET-1 induit l'activation de plusieurs voies de signalisation incluant celle de la protéine kinase C (WANG *et al.*, 1992). Dans cette série d'expériences, notre but était de vérifier si l'effet de l'ET-1 sur l'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire des cellules du MLVh est due à l'activation de la protéine kinase C (PKC).

3.5.1. Effet de la préstimulation de la Protéine Kinase C par le phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) sur la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

Dans une première série d'expériences et afin de vérifier si l'effet de l'ET-1 sur l'augmentation soutenue du calcium intracellulaire induit par l'ET-1 est médié via la stimulation de la PKC, nous avons exposé nos cellules du MLVh à un activateur de la PKC, le phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) avant de les stimuler avec l'ET-1.

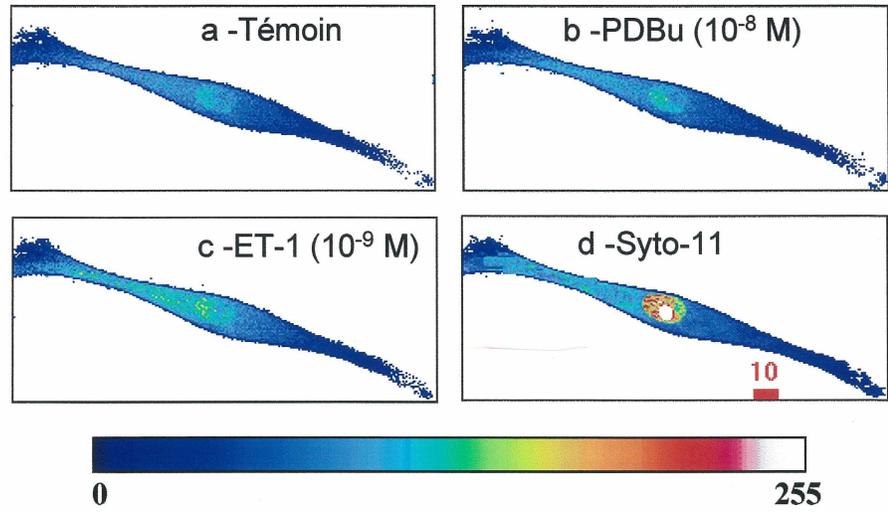
Comme on peut constater dans la figure 24B, la stimulation de la PKC par l'exposition des cellules du MLVh au PDBu (10^{-8} M) n'affecte pas le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ dans les cellules du MLVh. De plus, la stimulation de la voie de la PKC par le PDBu ne prévient pas l'effet de l'ET-1 (10^{-9} M) sur l'augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire.

La figure 24B montre la compilation des résultats obtenus pour cette série d'expériences. Comme nous pouvons remarquer, en absence du PDBu et d'ET-1, le niveau du $[Ca]_c$ est de 39.7 ± 2.4 et du $[Ca]_n$ est de 76.4 ± 4.8 (n=6). La superfusion des cellules au PDBu (concentration finale de 10^{-8} M connue pour stimuler spécifiquement la PKC) n'a pas affecté le taux basal du $[Ca]_c$ (42.0 ± 2.2 ; n= 6) et du $[Ca]_n$ (75.2 ± 3.1 ; n=6). L'ajout subséquent de l'ET-1(10^{-9} M) dans le milieu extracellulaire induit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ (48.0 ± 2.9 ; n= 6) et du $[Ca]_n$ (92.6 ± 4.5 ; $p < 0.01$ vs. PDBu noyau; n=6).

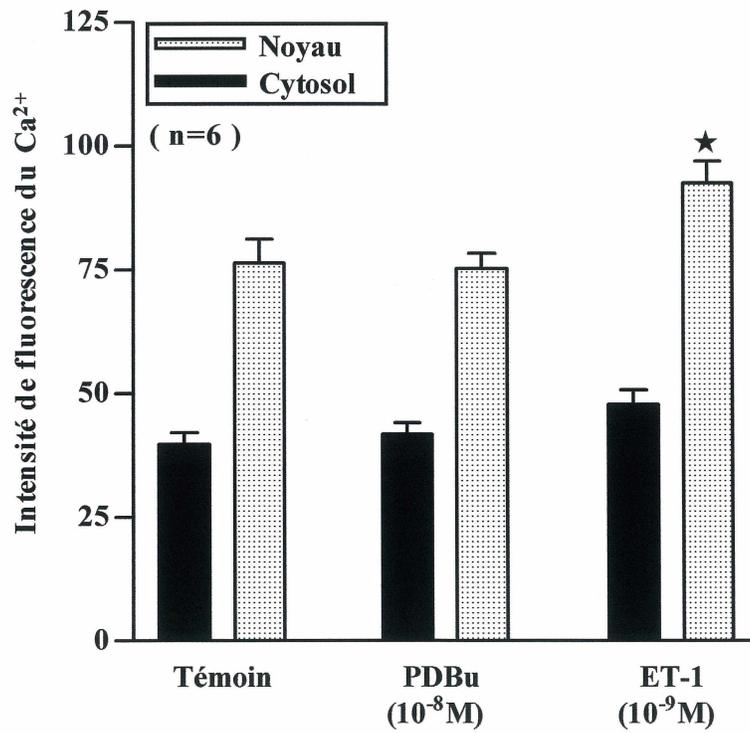
Figure 24 Effet de l'ajout, en préventif, de l'activateur de la PKC (phorbol 12,13-dibutyrate /PDBu) sur la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

A) Une représentation d'une cellule du MLVh en situation contrôle (a). b) L'ajout du PDBu n'affecte pas le niveau basal du $[Ca]_i$. c) En présence du PDBu, l'ET-1 (10^{-9} M) induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. d) Marquage du noyau par la sonde des acides nucléiques le Syto-11. L'échelle en pseudocouleur représente les niveaux d'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Pour le panneau d, les couleurs n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en rouge est en μm . **B)** Des histogrammes montrant que l'ajout de l'activateur de la PKC n'a pas d'effet sur le niveau basal du $[Ca]_i$ et n'affecte pas la réponse calcique cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 6 expériences. * $p < 0.01$ vs. PDBu noyau.

A)



B)



En conclusion, ces résultats suggèrent que l'effet de l'activation des récepteurs de l'ET-1 sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des cellules du MLVh se fait via un mécanisme indépendant de l'activation de la PKC.

3.5.2. Effet de la préinhibition de la Protéine Kinase C par le bisindolylmaleimide (BIS) sur la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

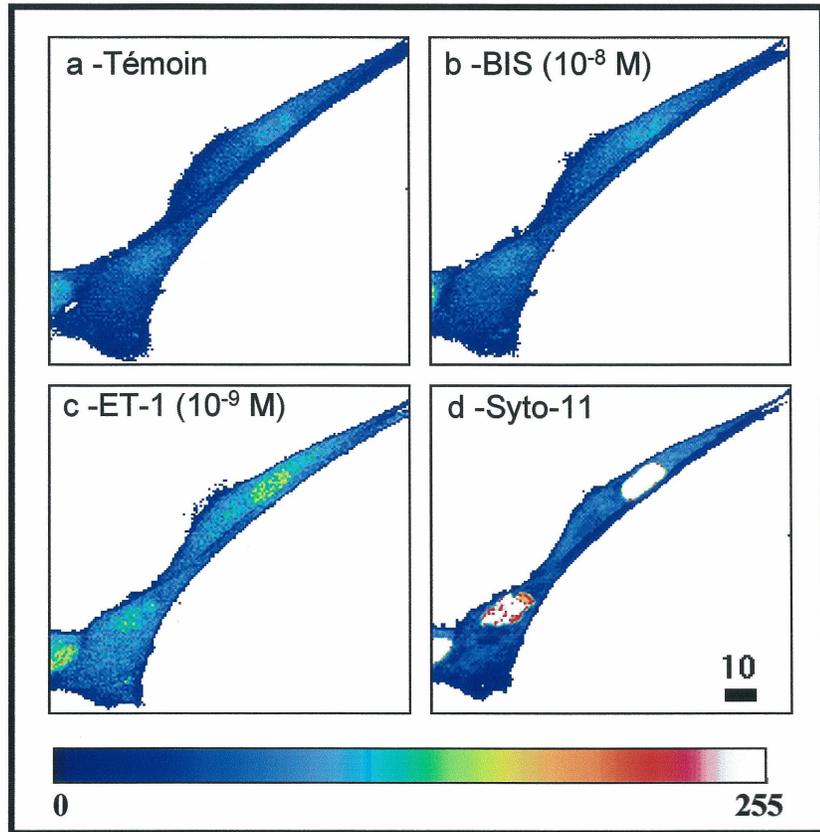
Dans une deuxième série d'expériences, nous avons inhibé l'activité de la PKC à l'aide de l'inhibiteur de la PKC, le Bisindolylmaleimide (BIS) afin de confirmer davantage que l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh, ne dépend pas de la stimulation de l'activité de la PKC. Dans cette série d'expériences, nous avons exposé nos cellules pendant 10 min à l'inhibiteur de la PKC (BIS) à une concentration de 10^{-8} M connue pour inhiber complètement l'activité de la PKC avant de stimuler les cellules avec l'ET-1.

Comme nous pouvons constater dans la figure 25A, le prétraitement des cellules du MLVh au BIS (10^{-8} M) n'affecte pas le taux basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. De plus, l'inhibition de l'activité de la PKC dans les cellules du MLVh ne prévient pas l'effet de l'ET-1 (10^{-9} M) sur l'augmentation du calcium cytosolique et nucléaire. La figure 25B regroupe tous les résultats obtenus.

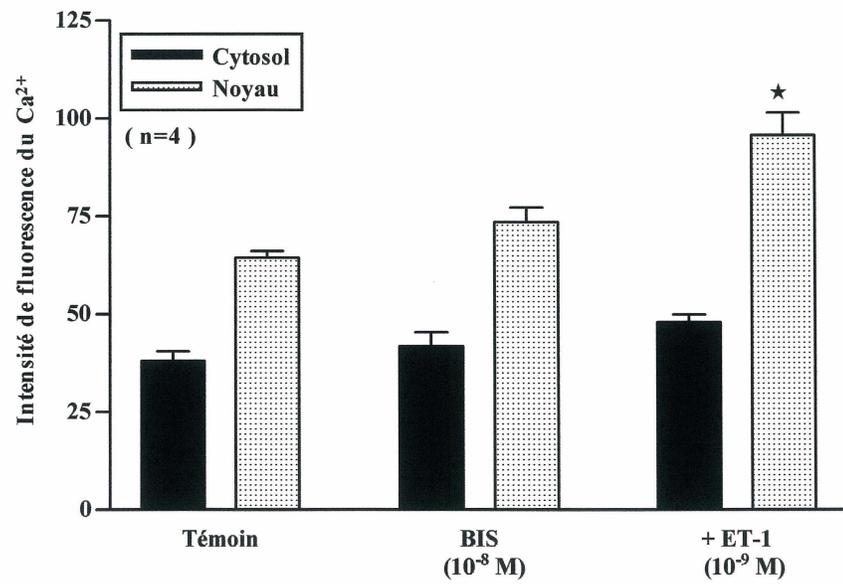
Figure 25 Effet de l'ajout, en préventif, de l'inhibiteur de la PKC (Bisindolylmaleimide/BIS) sur la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

A) Une représentation des cellules du MLVh en situation contrôle (a). b) L'ajout du BIS n'affecte pas le niveau basal du $[Ca]_i$. c) L'ET-1 à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ qui n'est pas affectée par l'inhibition de la PKC. d) Marquage du noyau par la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle en pseudocouleur représente les niveaux d'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Pour le panneau d, les couleurs n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en noir est en μm . **B)** Des histogrammes montrant que l'inhibiteur de la PKC n'a pas d'effet sur le niveau basal du $[Ca]_i$ et n'affecte pas la réponse calcique cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 (10^{-9} M) dans les cellules du MLVh. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 4 expériences. * $p < 0.05$ vs. BIS noyau.

A)



B)



Comme nous pouvons remarquer dans cette figure, en milieu contrôle et en absence de l'inhibiteur de la PKC et d'ET-1, les niveaux du $[Ca]_c$ est de 38.0 ± 2.4 et du $[Ca]_n$ est de 64.4 ± 1.6 (n=4). La superfusion des cellules du MLVh avec un milieu contenant 10^{-8} M de BIS n'a pas augmenté le $[Ca]_c$ (41.8 ± 3.6 ; n= 4) et le $[Ca]_n$ (73.5 ± 3.81 ; n=4) des cellules du MLVh. En présence de l'inhibiteur de la PKC, l'ajout de l'ET-1 (10^{-9} M) dans le milieu extracellulaire induit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ (48.0 ± 2.0 ; n= 4) et du $[Ca]_n$ (96.0 ± 5.8 ; n=4). L'augmentation du $[Ca]_n$ par l'ET-1 est significative ($p < 0.05$ vs. BIS noyau).

Ces résultats confirment davantage ceux déjà obtenus dans la série précédente et suggèrent ainsi que le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ n'est pas modulé par l'activité basale de la PKC et que l'activation des récepteurs à l'ET-1 induisant une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules du MLVh se fait via un mécanisme indépendant de l'activation de la voie de la PKC.

3.6. Localisation et distribution de l'ET-1 ainsi que les récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du muscle lisse aortique humain.

En se basant sur les résultats obtenus dans les sections précédentes. Les récepteurs ET_A et ET_B sont présents au niveau de la membrane de surface de nos cellules et médient la réponse calcique cytosolique et nucléaire soutenue induite par l'ET-1. Les récepteurs ET_A, sont connus pour être surtout présents au niveau de la membrane de surface des cellules du MLV et médient l'effet vasoconstricteur de l'ET-1. Par contre, les récepteurs ET_B sont surtout

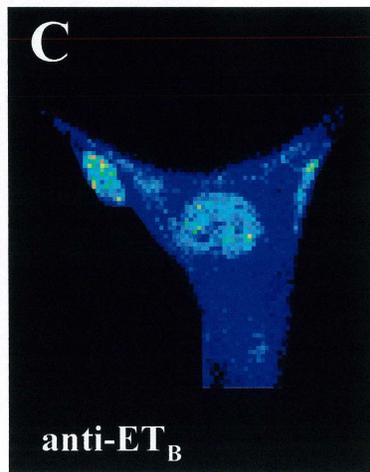
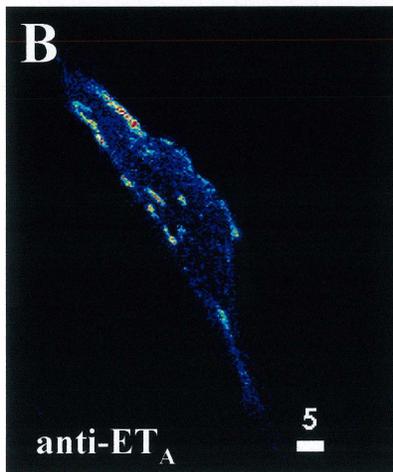
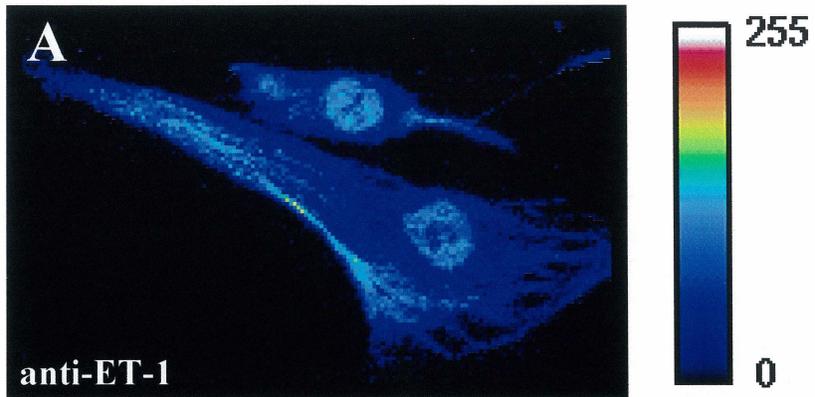
présents au niveau de la membrane de surface des cellules endothéliales vasculaires et médient l'effet vasodilatateur de l'ET-1.

Cependant, plusieurs rapports dans la littérature indiquent la présence de récepteur ET_B au niveau de la membrane de surface des cellules musculaires lisses et que ces récepteurs participent aussi à l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 (MORELAND *et al.*, 1992). De plus, des travaux récents publiés par notre laboratoire ont suggéré que les récepteurs à l'ET-1 sont localisés non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau de l'enveloppe nucléaire (BKAILY *et al.*, 1997a). En se basant sur ces données ainsi que sur les résultats décrits précédemment, nous avons tenté de localiser la présence d'ET-1 et de ses récepteurs ET_A et ET_B au niveau des cellules du MLVh. Dans ces séries d'expériences, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte combinée à la technique de microscopie confocale qui nous permet de visualiser en trois dimensions les récepteurs ET_A et ET_B ainsi que l'ET-1.

Comme le montre la figure 26, l'ET-1 est immunolocalisée partout dans la cellule du MLVh. Les récepteurs de l'ET-1, quant à eux montrent une distribution hétérogène dans ces cellules. Malgré la présence d'un faible marquage cytoplasmique, l'expression des récepteurs ET_A est prépondérante au niveau de la membrane plasmique. Cependant, les récepteurs ET_B sont exprimés non seulement au niveau de la membrane plasmique et dans le cytosol mais une immunoréactivité bien marquée est détectée au niveau nucléaire. La distribution préférentielle des récepteurs ET_A et ET_B dans les

Figure 26 Marquage de l'ET-1 et de ses récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du muscle lisse aortique humain.

A) Marquage de l'ET-1 dans les cellules du MLVh. L'anticorps monoclonal, anti-ET-1 montre une immunoréactivité partout dans la cellule. **B)** Marquage immunofluorescent du récepteur ET_A. L'anticorps polyclonal, anti-ET_A, présente une immunoréactivité très élevée au niveau de la membrane plasmique et très faible au niveau du cytosol ainsi qu'une absence de marquage dans le noyau. **C)** Marquage immunofluorescent du récepteur ET_B. L'anticorps polyclonal, anti-ET_B, présente une immunoréactivité très élevée au niveau nucléaire, ainsi qu'au niveau du cytosol et de la membrane plasmique mais qui semble être moins intense que celle des récepteurs ET_A. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .



cellules du MLVh fut par la suite validée par immunofluorescence en utilisant un marquage simultanée des récepteurs ET_A et ET_B dans les mêmes cellules.

La figure 27 montre un exemple type de cette série d'expériences. Comme nous pouvons remarquer dans cette figure, les récepteurs ET_A sont surtout localisés au niveau de la membrane plasmique avec une faible expression dans le cytosol. Par contre, les récepteurs ET_B sont présents d'une façon prépondérante dans le noyau et plus spécifiquement dans les nucléoles. Une immunoréactivité marquée a été aussi détectée pour les récepteurs ET_B au niveau de la membrane plasmique et du cytosol.

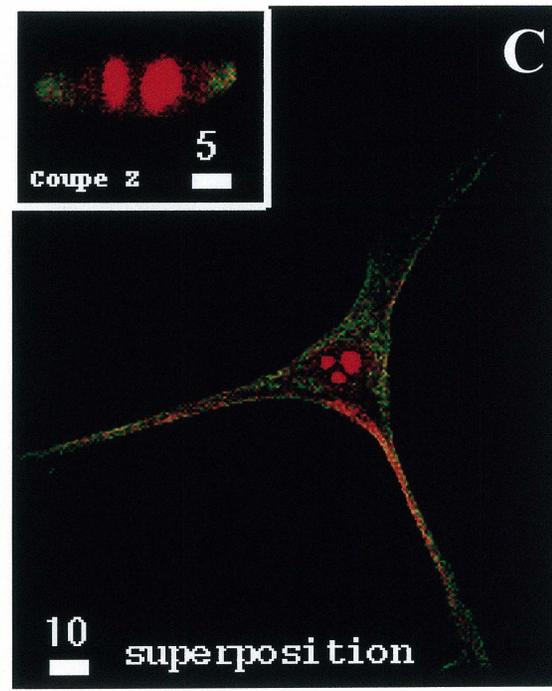
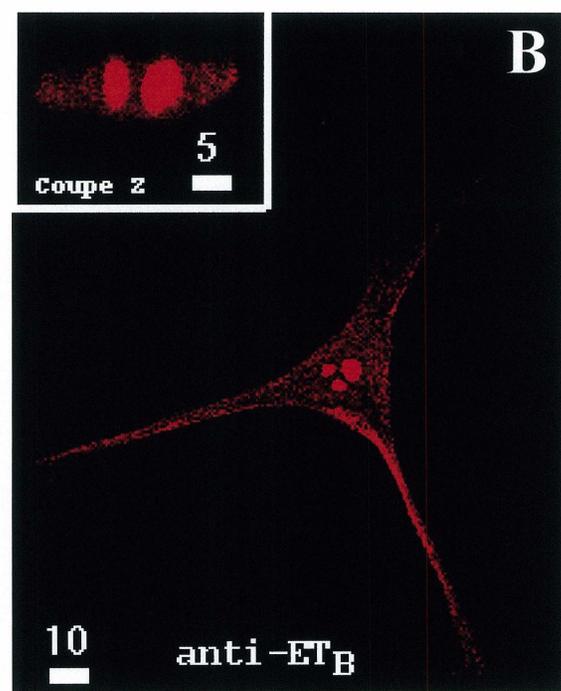
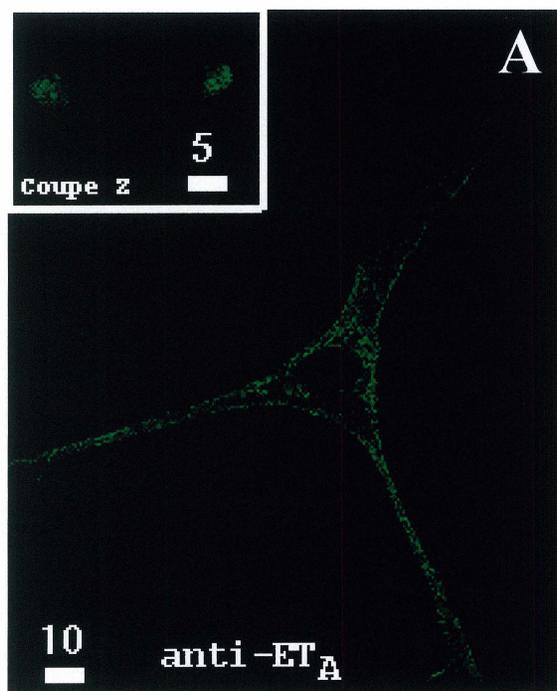
En conclusion, ces résultats montrent que les récepteurs ET_A et les récepteurs ET_B sont présents dans les cellules du MLVh et que la localisation de ces récepteurs est différente. Les récepteurs ET_A semblent être surtout localisés au niveau de la membrane de surface. Par contre, les récepteurs ET_B, quant à eux, sont présents en grande partie au niveau du noyau.

3.7. Effet de l'ET-1 cytosolique sur le [Ca]_n basal des cellules du MLVh en utilisant la méthode d'une cellule à la membrane plasmique perforée.

Récemment, en utilisant la méthode de perforation du sarcolemme, à l'aide de l'ionomycine ou du triton, notre groupe a rapporté que l'application d'une concentration élevée d'ET-1 (10^{-7} M) au niveau cytosolique et en absence de Ca²⁺, induit une augmentation du calcium nucléaire dans les cellules du MLVh (BKAILY et al., 1997a). De plus, l'ET-1 cytosolique (en présence de 100 nM Ca²⁺) induit une augmentation dose-

Figure 27 Double marquage des récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du muscle lisse aortique humain.

A) Marquage immunofluorescent du récepteur ET_A. L'anticorps polyclonal, anti-ET_A, présente une immunoréactivité très élevée au niveau de la membrane plasmique et très faible au niveau du cytosol ainsi qu'une absence de marquage dans le noyau. Le petit panneau en haut et à gauche représente la coupe Z prise tout au long de l'axe de la cellule montrant la distribution du marquage des récepteurs ET_A, très intense au niveau de la membrane plasmique et absente au niveau nucléaire. **B)** Marquage immunofluorescent du récepteur ET_B. L'anticorps polyclonal, anti-ET_B, présente une immunoréactivité très élevée au niveau nucléaire, ainsi qu'au niveau du cytosol et de la membrane plasmique mais qui semble être moins intense que celle des récepteurs ET_A. La coupe Z prise tout au long de l'axe de la cellule montre la distribution du marquage des récepteurs ET_B, partout dans la cellule et très intense au niveau nucléaire et plus spécifiquement dans les nucléoles. **C)** Superposition de l'immunoréactivité des 2 récepteurs présentée dans les panneaux A et B. Les récepteurs ET_A et ET_B se co-localisent (couleur jaune) au niveau de la membrane plasmique et dans certaines régions du cytosol. La coupe Z montre aussi la co-localisation en jaune des 2 types des récepteurs au niveau de la membrane plasmique et au niveau du cytosol. L'échelle de mesure en blanc est en μm .



dépendante du calcium nucléaire dans les cellules cardiaques (BKAILY *et al.*, 2002). Nos résultats présentés dans la section 3.6 ont montré que le récepteur ET_B est présent au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire. Dans cette série d'expériences, nous avons voulu vérifier si les récepteurs à l'ET-1 détectés au niveau des membranes nucléaires sont fonctionnels et si leur sensibilité à l'ET-1 est différente par rapport à ceux présents au niveau de la sarcolemme. Par conséquent, dans cette série d'expériences, nous avons testé les effets de différentes concentrations d'ET-1 cytosolique sur le Ca²⁺ nucléaire des cellules du MLVh à sarcolemme perforée.

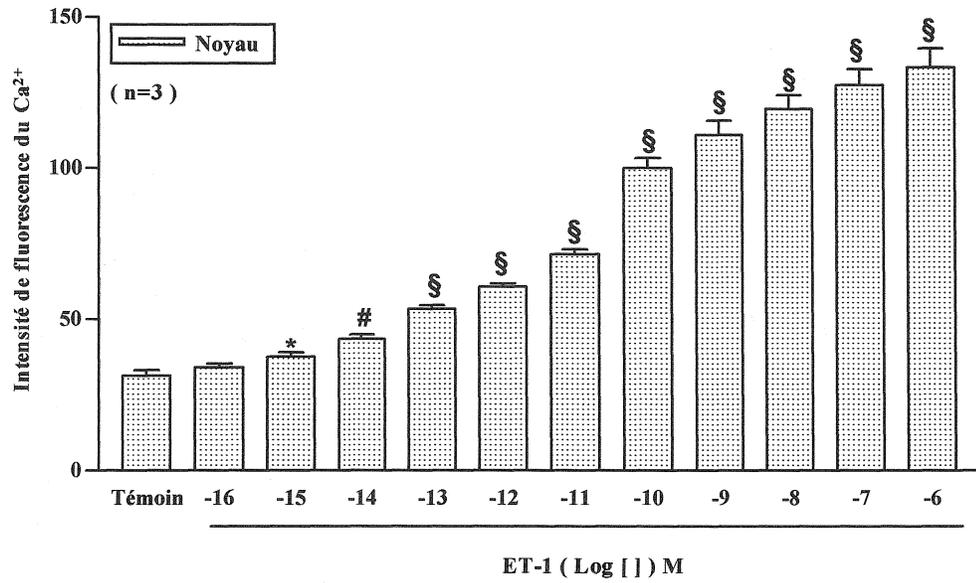
Dans ces expériences, les cellules du MLVh étaient perforées à l'aide de l'ionomycine (10⁻⁵ M), tel que décrit précédemment dans la section 2.4.2 du matériel et méthodes. Par la suite, ces cellules sont laissées pour se stabiliser dans une solution ionique intracellulaire contenant 100 nM de Ca²⁺ mimant la composition cytosolique. Des sections en série sont enregistrées avant et après l'exposition des cellules à sarcolemme perforée à des doses croissantes d'ET-1 allant de 10⁻¹⁶ M à 10⁻⁶ M. À la fin de l'expérience, le noyau est localisé à l'aide du syto-11 (100 nM), un marqueur des acides nucléiques. Ce marquage permet par la suite d'analyser l'intensité de la fluorescence calcique libre à l'intérieur du noyau.

La figure 28A résume l'effet des additions croissantes d'ET-1 sur les cellules du MLVh au sarcolemme perforé. On peut remarquer, d'après cette figure, que l'ET-1 induit une augmentation calcique nucléaire dose-dépendante à partir d'une concentration de 10⁻¹⁵ M jusqu'à 10⁻⁶ M. On observe

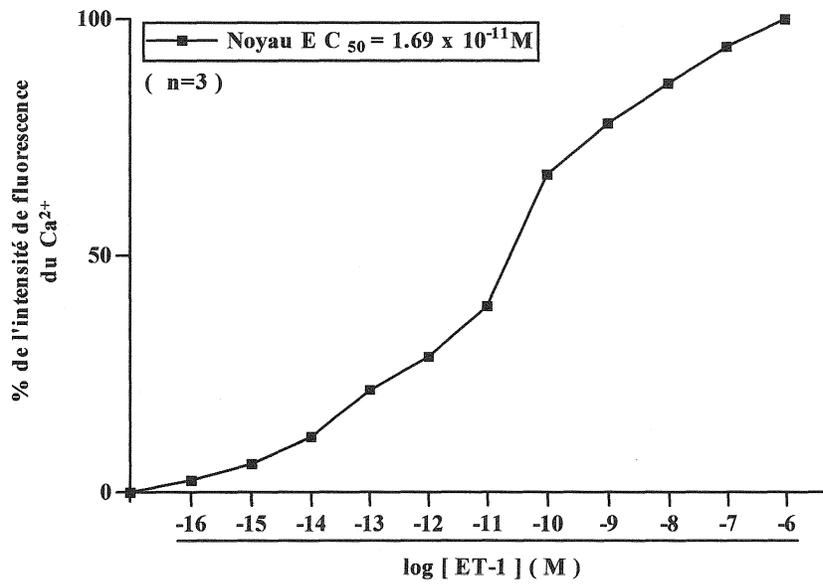
Figure 28 Effet de différentes concentrations de l'ET-1 cytosolique sur les niveaux de $[Ca]_n$ des cellules du muscle lisse aortique humain dont la membrane de surface a été perforée par l'ionomycine.

Dans les panneaux A et B, l'ET-1 à une concentration de 10^{-16} M a un effet, non significatif, sur le $[Ca]_n$, par contre une concentration plus élevée de l'ET-1 (10^{-15} M) augmente significativement le $[Ca]_n$. L'ajout par la suite de doses croissantes de l'ET-1 (10^{-14} - 10^{-6} M) induit une augmentation du $[Ca]_n$ dose-dépendante. **A)** Des histogrammes montrant qu'une augmentation significative des niveaux du $[Ca]_n$ est obtenue à des concentrations égales ou plus élevées que 10^{-15} M de l'ET-1. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à 10^{-6} M de l'ET-1. **B)** Courbe dose-réponse de l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_n$. L'ajout de doses croissantes de l'ET-1 (10^{-16} - 10^{-6} M) induit une augmentation dose dépendante du $[Ca]_n$ avec un EC_{50} de 1.7×10^{-11} M. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 3 expériences. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, § $p < 0.001$ vs. témoin.

A)



B)



un effet maximal d'ET-1 à 10^{-6} M. L'ET-1, à une concentration de 10^{-15} M, augmente d'une façon significative le $[Ca]_n$ (34.2 ± 1.3 ; $p < 0.05$; $n=3$) par rapport au $[Ca]_n$ (31.47 ± 1.7 ; $n=3$) dans les cellules contrôles à sarcolemme perforé. L'administration subséquente de l'ET-1 à une concentration de l'ordre de 10^{-14} M provoque davantage une augmentation significative du $[Ca]_n$ (43.5 ± 1.46 ; $p < 0.01$; $n=3$). L'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_n$ atteint son maximum à une concentration de 10^{-6} M (133.4 ± 6.23 ; $p < 0.001$; $n=3$). Le tracé de la courbe-dose réponse de l'effet de l'ET-1 cytosolique sur le Ca^{2+} libre nucléaire des cellules du MLVh perforées (Figure 28B), montre une augmentation calcique nucléaire dose-dépendante à partir de 10^{-15} M. Une réponse maximale est atteinte à une concentration de 10^{-6} M d'ET-1, alors que 50% de cet effet maximal (EC_{50}) est obtenu à 1.69×10^{-11} M d'ET-1.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs nucléaires (en particulier ET_B) par l'ET-1 cytosolique induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_n$ dans les cellules du MLVh à sarcolemme perforé.

3.8. L'ET-1 extracellulaire induit la mobilisation transcellulaire de ses récepteurs dans les cellules du MLVh.

Dans les sections précédentes, nous avons montré que l'ET-1 extracellulaire induit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ qui semble être médiée via la stimulation des deux types de récepteurs à l'ET-1, les récepteurs ET_A et ET_B . De plus, nous avons localisé par

immunofluorescence la distribution de ces récepteurs dans les cellules du MLVh. Nous avons remarqué que les récepteurs ET_A et ET_B sont distribués d'une façon différente dans nos cellules. Les récepteurs ET_A et ET_B se co-localisent au niveau de la membrane de surface, par contre, seuls les récepteurs ET_B sont présents au niveau du noyau et semblent être impliqués dans la réponse calcique nucléaire à l'ET-1 cytosolique.

Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons tenté de vérifier si comme la majorité des récepteurs couplés aux protéines G, la stimulation des récepteurs de l'ET-1 induit leur internalisation. De plus nous avons voulu vérifié que, comme il a été démontré pour les récepteurs AT₁ de l'AngII (BKAILY *et al.*, 2002), l'activation des récepteurs à l'ET-1 stimule non seulement leur internalisation mais aussi leur translocation nucléaire.

3.8.1. L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

Dans cette série d'expériences, les cellules du MLVh ont été traitées avec 10^{-7} M d'ET-1 (concentration connue pour induire l'effet maximal de l'ET-1) pendant 15 et 30 min afin de vérifier si l'ET-1 extracellulaire stimule l'internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET_B.

L'internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh ont été étudiés en utilisant 2 techniques différentes. Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé les cellules du MLVh intactes ainsi que la technique d'immunofluorescence indirecte couplée à la microscopie confocale en 3-D. Ces deux méthodes utilisées

simultanément nous permettent de visualiser d'une façon claire et précise la localisation des récepteurs dans les cellules intactes. Par la suite, afin de vérifier les résultats obtenus par immunofluorescence sur des cellules intactes, nous avons utilisé la technique de fractionnement cellulaire afin de séparer les fractions nucléaires du reste de la cellule. Suite au fractionnement, les extraits nucléaires sont analysés par immunobuvardage en utilisant le même anticorps des récepteurs ET_B utilisé pour les études en immunofluorescence.

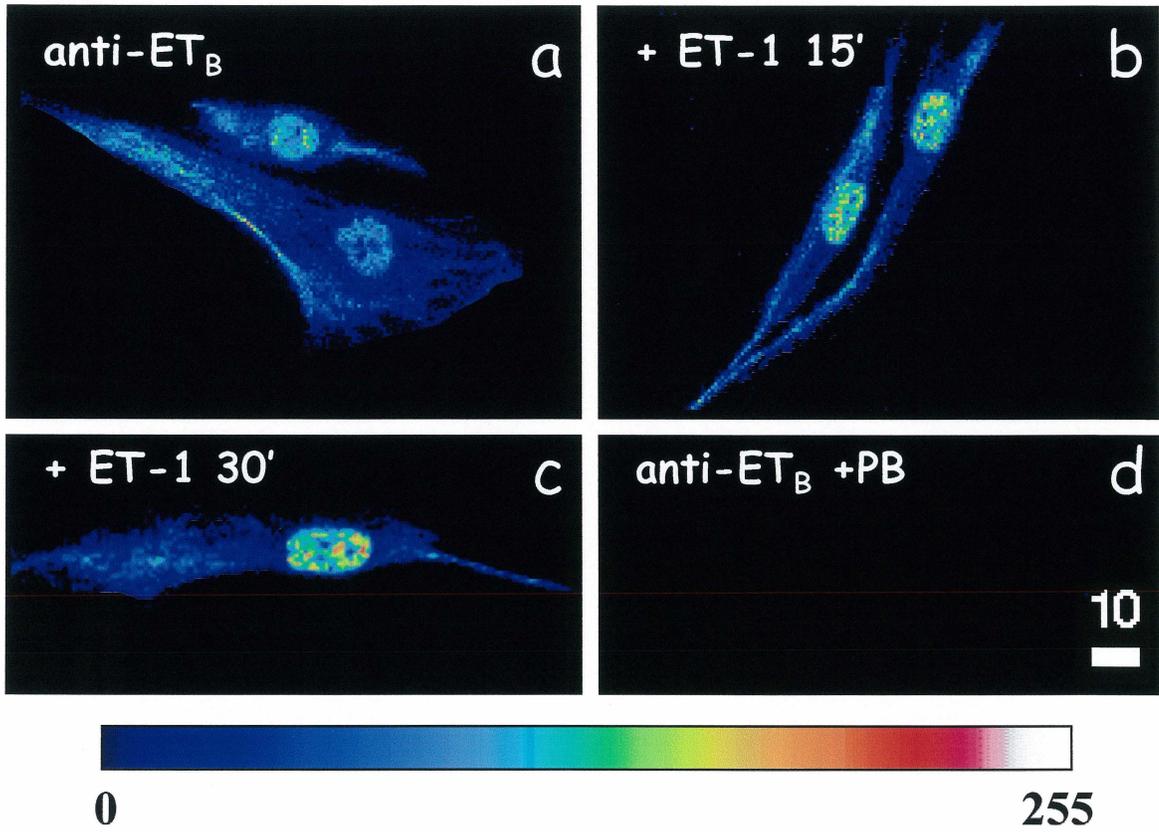
Nos résultats montrent que les récepteurs ET_B sont localisés partout dans la cellule et plus particulièrement dans le noyau (figure 29Aa). Suite au traitement des cellules du MLVh à une concentration de 10^{-7} M d'ET-1 pendant 15 et 30 min, nous assistons à une augmentation de la fluorescence des récepteurs ET_B dans le noyau. Après 15 et 30 min de prétraitement à l'ET-1 (figure 29Ab-c), nous avons aussi remarqué une diminution des récepteurs ET_B au niveau de la sarcolemme et du cytosol et une augmentation au niveau nucléaire.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons traité les cellules à 10^{-7} M d'ET-1 pendant 15 et 30 min en absence et en présence de l'antagoniste de récepteur ET_B, le BQ-788 (10^{-5} M). Par la suite, les cellules du MLVh ont été fractionnées afin d'isoler les fractions nucléaires (fraction N) du reste de la cellule (fraction C). Dans cette série d'expériences, 70µg de protéines des cellules non-traitées et traitées ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE (10%) et sont ensuite analysés par immunobuvardage avec un

Figure 29 L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

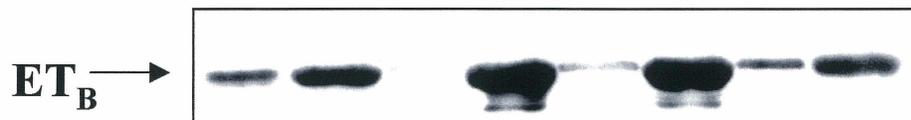
A) Un exemple type de deux cellules non-traitées à l'ET-1. a) Les cellules expriment les récepteurs ET_B avec une immunoréactivité plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. Suite au traitement à l'ET-1 (10^{-7} M) à différents temps (15 (b) et 30 (c) min), l'ET-1 induit une augmentation de l'intensité de fluorescence nucléaire des récepteurs ET_B. d) L'incubation de l'anticorps anti-ET_B en présence du peptide contrôle déplace complètement le marquage des récepteurs ET_B. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm . **B)** Les fractions nucléaires des cellules du MLVh traitées ou non avec l'ET-1 sont analysées par immunobuvardage avec un anticorps (1/200) qui reconnaît les récepteurs ET_B. L'analyse de la bande de ~ 50 kDa correspondante aux récepteurs ET_B montre l'augmentation de l'expression de ces récepteurs dans les fractions nucléaires (N) 15 et 30 min après le traitement des cellules du MLVh avec l'ET-1 (10^{-7} M). Cette augmentation dans la fraction N est suivie par une diminution dans le reste de la cellule (fraction C) à 15 min et une augmentation à 30 min. L'internalisation des récepteurs ET_B, observée à 15 min avec l'ET-1 (10^{-7} M), est bloquée par le pré-traitement des cellules du MLVh avec l'antagoniste des récepteurs ET_B le BQ-788 (10^{-5} M).

A)



B)

BQ-788 (10 ⁻⁵ M)	-	-	-	-	-	-	+	+
ET-1 (10 ⁻⁷ M)	-	-	+	+	+	+	+	+
Temps (min)	-	-	15	15	30	30	15	15
Fractions	C	N	C	N	C	N	C	N



anticorps (1/200) qui reconnaît les récepteurs ET_B. La figure 29B montre un exemple de cette série d'expériences (n=3 différentes expériences). Comme le montre la figure 29B, après 15 min de traitement des cellules à 10⁻⁷M d'ET-1, l'analyse de la bande de ~ 50 kDa correspondante aux récepteurs ET_B montre une diminution marquée des récepteurs ET_B dans les fractions cytosoliques (incluant la sarcolemme) et une augmentation de ce type de récepteurs dans la fraction nucléaire (incluant l'enveloppe nucléaire). Ce phénomène reste stable même après 30 min de traitement à l'ET-1. La diminution cytosolique et l'augmentation nucléaire des récepteurs ET_B, observée à 15 min avec l'ET-1 (10⁻⁷ M) est bloquée par le pré-traitement des cellules du MLVh avec l'antagoniste des récepteurs ET_B le BQ-788 (10⁻⁵ M).

Ces résultats suggèrent que l'ET-1 extracellulaire (10⁻⁷ M) induit l'internalisation et la translocation nucléaire des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

3.8.2. L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation des récepteurs ET_A dans les cellules du MLVh.

Comme nous avons montré précédemment, les récepteurs ET_A de MLVh semblent être présents au niveau de la sarcolemme et le cytosol. Dans cette série d'expériences, nous avons voulu vérifier si comme le récepteur ET_B, la stimulation des récepteurs ET_A de la sarcolemme induit leur internalisation ainsi que leur translocation nucléaire. Au cours de ces expériences, nous avons utilisé le même protocole expérimental que celui utilisé pour étudier l'internalisation et la translocation du récepteur ET_B. Les

cellules du MLVh non traitées ainsi que ceux traitées à l'ET-1 (10^{-7} M) pendant 15 et 30 min ont été fractionnées afin de séparer les fractions nucléaires du reste de la cellule. Les protéines (70 μ g) ont été soumises à une séparation par SDS-PAGE (10%) et analysés par immunobuvardage avec un anticorps (1/100) qui reconnaît les récepteurs ET_A. Comme le montre la figure 30A, l'analyse de la bande de ~ 34 kDa correspondante aux récepteurs ET_A montre, dans les cellules non traitées, une localisation des récepteurs ET_A dans la fraction cytosolique (incluant la sarcolemme) et une absence d'une bande correspondante aux récepteurs ET_A dans la fraction nucléaire (incluant l'enveloppe nucléaire). Le traitement à l'ET-1 (10^{-7} M) pour 15 min induit une diminution de la bande dans la fraction cytosolique et une apparition dans la fraction nucléaire. Par contre, après 30 min de traitement à l'ET-1, nous assistons à une relocalisation des récepteurs ET_A au niveau cytosolique qui est associée à une augmentation au niveau nucléaire (figure 30A). Cette figure montre un gel représentatif de trois différentes expériences.

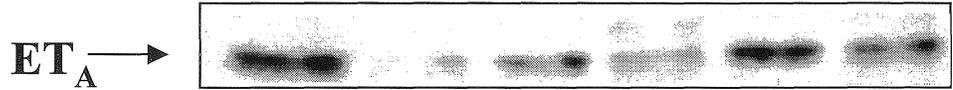
Dans une autre série d'expériences, nous avons vérifié si les récepteurs ET_A au niveau de la sarcolème sont internalisés suite au traitement à l'ET-1. Dans cette série d'expériences, une fois les cellules étaient traitées à l'ET-1 pour 15 min, nous avons procédé par la suite au fractionnement des cellules du MLVh et à l'isolation de membranes de surface. Ces extraits de protéines de la sarcolemme (70 μ g) ont été par la suite analysés par western blot. Comme le montre la figure 30B, le traitement des cellules à l'ET-1 (10^{-7} M) pour 15 min diminue l'intensité de la bande des

Figure 30 L'ET-1 extracellulaire induit l'internalisation des récepteurs ET_A dans les cellules du MLVh.

Les cellules du MLVh non-traitées et traitées avec l'ET-1 (10^{-7} M) pendant 15 et 30 min ont été fractionnées afin de séparer les fractions nucléaires (N) (incluant l'enveloppe nucléaire) du reste de la cellule (C) (membrane de surface et cytosol). **A)** L'analyse de la bande de ~ 34 kDa correspondante aux récepteurs ET_A montre dans les cellules non-traitées une localisation majeure des récepteurs ET_A dans la fraction C et absence d'une bande correspondante aux récepteurs ET_A dans la fraction N. Le traitement avec l'ET-1 (10^{-7} M) pour 15 min induit une diminution de la bande dans la fraction C et une augmentation légère dans la fraction N. De plus, 30 min après le traitement avec l'ET-1, il y a une augmentation de l'expression des récepteurs ET_A dans la fraction C. **B)** Les membranes plasmiques de cellules de MLVh ont été isolées par fractionnement et centrifugation et les extraits membranaires ont été analysés par western blot. Le traitement des cellules pour 15 min à l'ET-1 (10^{-7} M) diminue l'intensité de la bande des récepteurs ET_A de la membrane de surface.

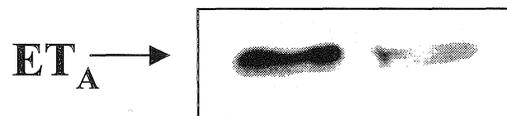
A)

ET-1 (10^{-7} M)	-	-	+	+	+	+
Temps (min)	-	-	15	15	30	30
Fractions	C	N	C	N	C	N



B)

ET-1 (10^{-7} M)	-	+
Temps (min)	-	15
Fractions	M	M



récepteurs ET_A de la sarcolemme. Cette figure montre un gel représentatif de trois différentes expériences.

Ces résultats suggèrent que la diminution des récepteurs ET_A observée dans la fraction cytoplasmique (incluant le sarcolemme) est due en particulier à l'internalisation de récepteurs ET_A de la sarcolemme.

3.9. L'ET-1 extracellulaire induit la synthèse *de novo* des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

Dans la sous section 3.8.1 et la figure 29, nos résultats ont montré que suite à la stimulation des récepteurs ET_B par l'ET-1, nous observons non seulement une internalisation et translocation nucléaire de ce type de récepteur, mais aussi une augmentation importante au niveau du noyau. Il est donc possible que cette augmentation de ce type de récepteur suite à sa stimulation par l'ET-1 peut être due en partie à la synthèse protéique *de novo* de ce récepteur dans les cellules du MLVh.

Afin de vérifier si l'ET-1 induit la synthèse *de novo* des récepteurs ET_B, nous avons prétraité les cellules du MLVh pour 30 min à l'inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide (10µg/ml). Par la suite, nous avons exposé ces cellules pour 15 et 30 min à 10⁻⁷ M d'ET-1.

Comme le montre les figures 31 et 32A, dans les cellules non-traitées à l'ET-1 et le cycloheximide, ces cellules expriment les récepteurs ET_B avec une immunoréactivité plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. Suite au traitement à l'ET-1 (10⁻⁷ M) pour 15 min, ce peptide induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence nucléaire des

Figure 31 Expérience représentative de l'effet de l'ET-1 sur la synthèse protéique *de novo* des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

Les cellules du MLVh sont traitées à l'ET-1 (10^{-7} M) en présence et en absence du cycloheximide 10 μ g/ml. **A)** Dans les cellules non-traitées à l'ET-1, ces cellules expriment les récepteurs ET_B avec une immunoréactivité plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. Suite au traitement avec l'ET-1 (10^{-7} M) à différents temps (15 **(B)** et 30 **(C)** min), l'ET-1 induit une augmentation de l'intensité de fluorescence nucléaire des récepteurs ET_B. Les cellules du MLVh traitées avec l'ET-1 (10^{-7} M) en absence du cycloheximide (10 μ g/ml) montre une diminution remarquable de l'intensité de fluorescence nucléaire des récepteurs ET_B 15 min **(D)** et 30 min **(E)** suite au traitement avec l'ET-1. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence des récepteurs ET_B allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μ m.

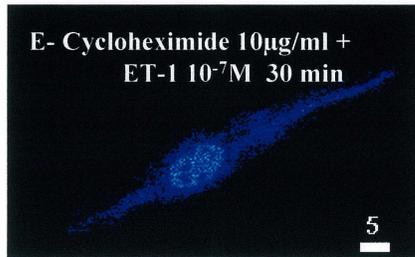
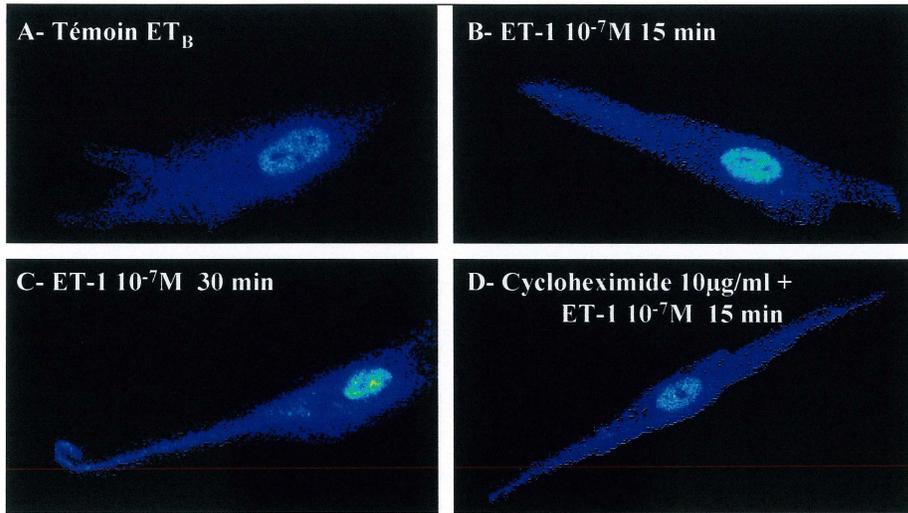
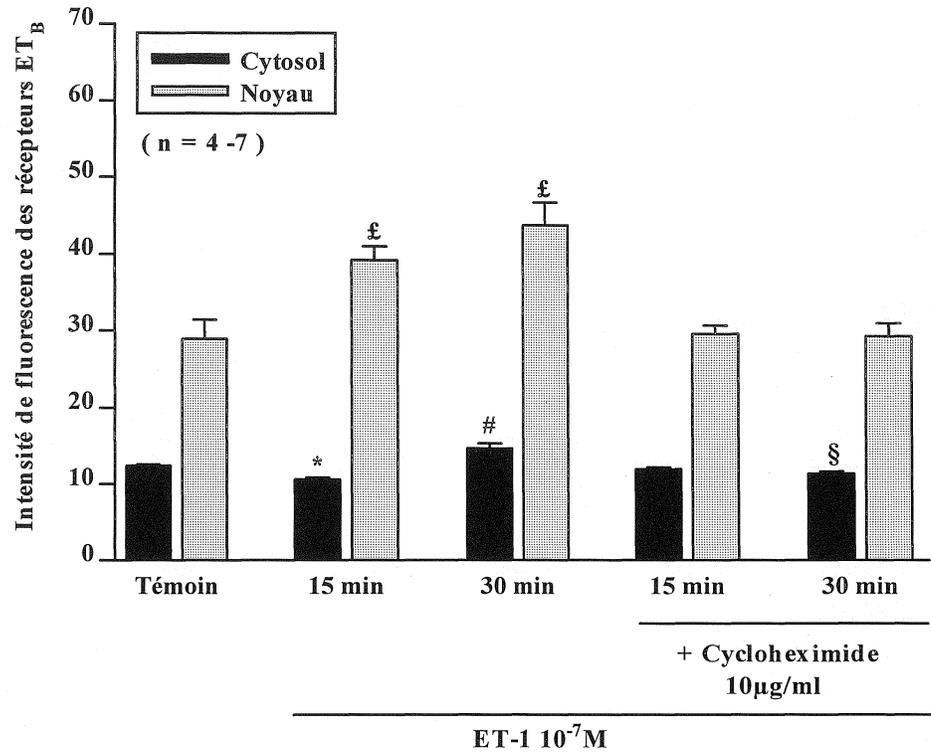


Figure 32 L'ET-1 induit la synthèse protéique *de novo* des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

A) Histogramme montrant la densité relative des récepteurs ET_B cytosoliques et nucléaires suite au traitement à l'ET-1 en absence et en présence du cycloheximide. Les cellules non-traitées à l'ET-1 expriment les récepteurs ET_B avec une immunoréactivité plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. Le traitement à l'ET-1 (10^{-7} M) pour 15 min induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence nucléaire des récepteurs ET_B et une diminution significative de l'intensité de fluorescence cytosolique de ces récepteurs. Par contre, à 30 min de traitement, l'ET-1 (10^{-7} M) augmente davantage l'intensité de fluorescence nucléaire des récepteurs ET_B et aussi augmente la densité de ce type de récepteurs au niveau cytosolique. L'augmentation des récepteurs ET_B est bloquée par le pré-traitement des cellules au cycloheximide (10µg/ml). Les valeurs sont présentées comme moyennes ± erreur standard de la moyenne de 4 à 7 expériences. *p<0.001, § p<0.05 vs témoin cytosol; # p<0.001 vs ET-1 15 min cytosol; £ p<0.01 vs. témoin noyau. **B)** Un gel type montrant l'augmentation des récepteurs ET_B suite à leur stimulation par l'ET-1 et l'inhibition de cet effet de l'ET-1 par le cycloheximide.

A)



B)

Cycloheximide (10µg/ml)	-	-	-	+	+
ET-1 (10 ⁻⁷ M)	-	+	+	+	+
Temps (min)	-	15	30	15	30



récepteurs ET_B au niveau nucléaire. Cet effet est associé à une diminution significative de l'intensité de fluorescence cytosolique des récepteurs ET_B. Par contre, 30 min de traitement à l'ET-1 (10^{-7} M) induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire des récepteurs ET_B. L'augmentation nucléaire des récepteurs ET_B est bloquée par le prétraitement des cellules avec 10µg/ml de cycloheximide. La figure 31 montre un exemple et la figure 32A résume ces résultats.

En utilisant le même protocole expérimentale décrit ci-haut, nous avons lysé nos cellules pour pouvoir extraire les protéines totales dans le but de vérifier si effectivement le blocage de la synthèse protéique par le cycloheximide prévient la synthèse *de novo* des récepteurs ET_B suite à leur stimulation avec l'ET-1. Les lysats totaux (70 µg) ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE (10%) et analysés par immunobuvardage avec un anticorps (1/200) qui reconnaît les récepteurs ET_B. Comme le montre la figure 31B, l'analyse de la bande de ~ 50 kDa correspondante aux récepteurs ET_B montre une augmentation de l'expression de ces récepteurs à 15 et 30 min de traitement des cellules du MLVh à l'ET-1 (10^{-7} M). Par contre, le prétraitement des cellules du MLVh à l'inhibiteur de synthèse protéique, le cycloheximide prévient la synthèse *de novo* du récepteur ET_B induite par l'ET-1. Cette prévention par le cycloheximide est associée à une diminution de ces récepteurs. La figure 32 B montre un exemple de trois différentes expériences.

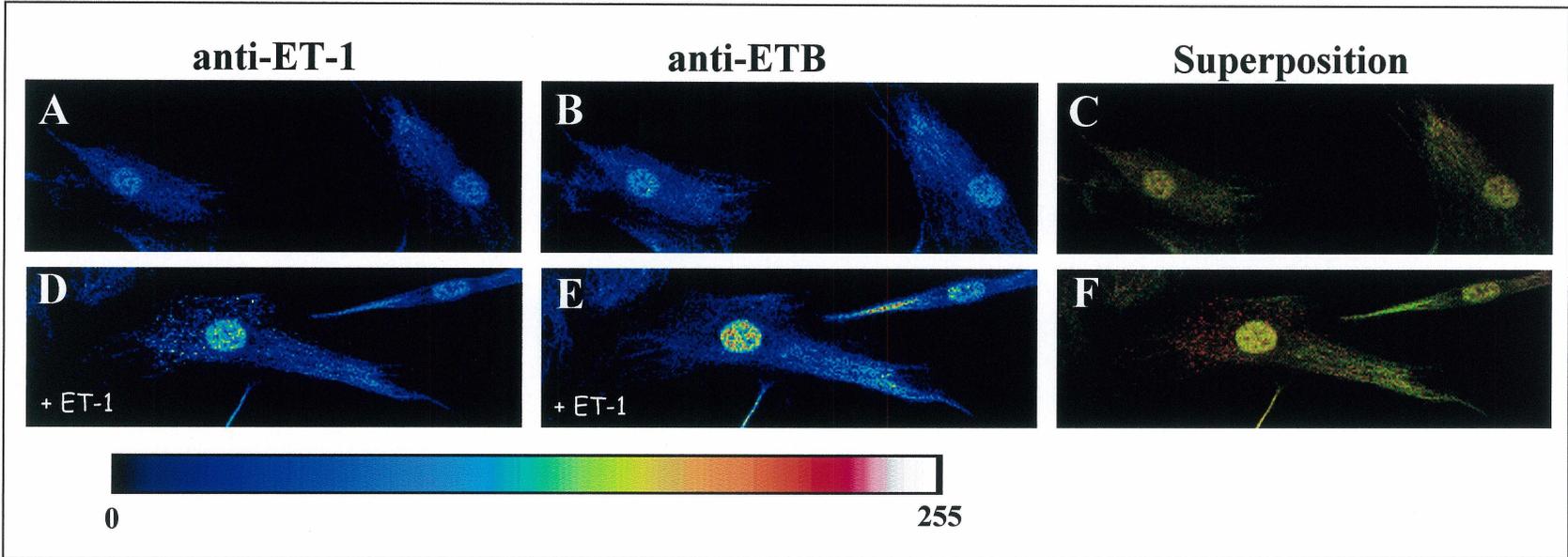
3.10. L'ET-1 s'internalise avec ses récepteurs de type ET_B dans les cellules du MLVh.

Nous avons montré, dans les sections précédentes que l'ET-1 induit l'internalisation et la translocation nucléaire du récepteur de type ET_B. De plus, il a été rapporté dans certaines études que l'ET-1 s'internalise avec ses récepteurs et reste couplé à ses récepteurs pendant plusieurs heures (SAWAMURA *et al.*, 1990). Afin de vérifier si dans nos cellules de MLVh ce processus a lieu, nous avons procédé à un protocole de double marquage qui nous permet de visualiser en même temps le marquage de l'ET-1 ainsi que celui de son récepteur de type ET_B.

Comme le montre la figure 33 A et B qui illustre un exemple représentatif de 4 différentes expériences de la distribution et localisation de l'ET-1 et son récepteur de type ET_B dans les cellules non-traitées à l'ET-1. Comme nous pouvons remarquer dans cette figure, l'anticorps monoclonal, anti-ET-1, présente une immunoréactivité très élevée au niveau du noyau et plus faible au niveau du cytosol des cellules non-traitées à l'ET-1. En parallèle, l'anticorps polyclonal, anti-ET_B, présente une immunoréactivité très élevée au niveau nucléaire, ainsi qu'au niveau du cytosol et de la membrane plasmique. La superposition de l'immunoréactivité de l'ET-1 et du récepteur ET_B illustre (en jaune) la co-localisation du peptide et son récepteur dans les cellules non-traitées à l'ET-1 (figure 33C). La figure 33C montre clairement que les récepteurs ET_B co-localisent (couleur jaune) avec l'ET-1 dans certaines régions du cytosol et surtout au niveau du noyau. Le traitement des

Figure 33 L'ET-1 s'internalise et transloque au niveau nucléaire avec ses récepteurs de type ET_B dans les cellules du MLVh.

A) Marquage immunofluorescent de l'ET-1 dans les cellules au repos. L'anticorps monoclonal, anti-ET-1, présente une immunoréactivité très élevée au niveau du noyau et plus faible au niveau du cytosol. **B)** Marquage immunofluorescent du récepteur ET_B dans les cellules au repos. L'anticorps polyclonal, anti-ET_B, présente une immunoréactivité très élevée au niveau nucléaire, ainsi qu'au niveau du cytosol et de la membrane plasmique **C)** Superposition de l'immunoréactivité de l'ET-1 (couleur rouge) et du récepteur ET_B (couleur verte). Les récepteurs ET_B co-localisent (couleur jaune) avec l'ET-1 au niveau de certaines régions du cytosol ainsi qu'au niveau du noyau. Le traitement des cellules du MLVh à l'ET-1 (10^{-7} M) pour 15 min induit la mobilisation de l'intensité de fluorescence du peptide **(D)** et du récepteur ET_B **(E)** qui est accompagnée par une augmentation de l'intensité de fluorescence nucléaire. Le panneau **(F)** montre la co-localisation (couleur jaune) des récepteurs ET_B avec le peptide ET-1 à 15 min de traitement à l'ET-1. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm . Les couleurs dans les panneaux C et F n'ont aucune valeur mesurable.



cellules du MLVh à l'ET-1 (10^{-7} M) pour 15 min induit la mobilisation du peptide (figure 33D) et de son récepteur ET_B (figure 33E). Ce phénomène est associé à une augmentation de l'intensité de fluorescence cytosolique et surtout nucléaire de l'ET-1 et ses récepteurs ET_B. Le panneau F de la figure 33 montre un exemple de la co-localisation (en jaune) des récepteurs ET_B avec le peptide ET-1 à 15 min de traitement avec l'ET-1.

Ces résultats suggèrent que l'ET-1 s'internalise avec son récepteur de type ET_B dans les cellules du MLVh.

3.11. Effet de l'ET-1 sur la modulation des fonctions cellulaires : son rôle dans la progression du cycle cellulaire et dans l'apoptose.

Nos résultats ont montré jusqu'à présent que dans les cellules de MLVh, l'ET-1 via l'activation de ces récepteurs de type ET_A et/ou ET_B au niveau de la membrane de surface module le calcium cytosolique et nucléaire. De plus, l'activation des récepteurs de l'ET-1 de l'enveloppe nucléaire (en particulier de type ET_B) semble moduler le taux du calcium libre nucléaire des cellules du MLVh. De plus, nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs ET_A et ET_B par l'endothéline-1 induit l'internalisation et la translocation nucléaire ainsi que la synthèse protéique de novo de ces récepteurs. Comme il a été décrit dans la section de l'introduction, la littérature concernant le rôle des récepteurs ET_A et ET_B dans l'apoptose et le cycle cellulaire semble être controversée et dépend du type cellulaire ainsi que de l'espèce. Compte tenu de nos résultats et en particulier la présence des récepteurs ET_B au niveau nucléaire ainsi que l'augmentation calcique

cytosolique et nucléaire induite par l'activation de ces récepteurs par l'ET-1, il est donc important de tester notre hypothèse que les récepteurs à l'endothéline-1 et en particulier le récepteur ET_B jouent un rôle important en modulant non seulement la contractilité des cellules du MLVh mais aussi en modulant le cycle cellulaire et/ou la survie de ces cellules. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié les effets de l'activation des récepteurs de l'ET-1 sur le cycle cellulaire ainsi que sur l'apoptose des cellules du MLVh.

3.11.1. Effet de l'ET-1 et de l'IRL 1620 sur l'expression des molécules régulatrices du cycle cellulaire.

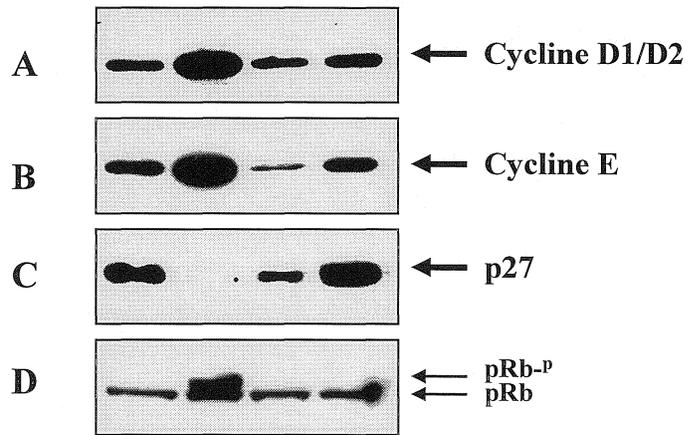
L'étape la plus importante de la prolifération cellulaire réside au cœur du cycle cellulaire et plus précisément durant la phase G1. Dans ces séries d'expériences nous avons étudié les effets de l'ET-1 et de l'agoniste de récepteur ET_B, l'IRL 1620 sur l'expression des différentes protéines régularisant la phase G1 du cycle cellulaire.

La figure 34 nous montre un exemple (n=3) de l'effet de l'ET-1 (10^{-7} M) ou l'IRL 1620 (10^{-7} M) sur l'expression des cyclines D et E ainsi que p27^{Kip1} et pRb. Comme nous pouvons remarquer dans cette figure, l'ET-1 ainsi que l'IRL 1620 ne semble pas augmenter le niveau des cyclines D et E. Par contre, l'ET-1 et non l'IRL 1620 semble plutôt diminuer le niveau de la cycline E (figure 34B). Ensuite nous avons procédé à l'évaluation de l'effet de l'ET-1 et l'IRL 1620 sur l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire le p27^{Kip1}. Comme nous pouvons remarquer dans la figure 34 C, le traitement des cellules du MLVh à l'ET-1 ainsi qu'à l'IRL 1620 augmente le niveau

Figure 34 Effet de l'ET-1 et de l'IRL 1620 sur l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire.

Les cellules du MLVh non traitées (-) ou traitées (+) ont été pré-traitées pendant 24h à 10^{-7} M d'ET-1 ou d'IRL 1620 ou de sérum (FBS). 70 μ g de protéines ont par la suite été soumis à une séparation par SDS-PAGE 10% (panneaux A, B et C) et 7.5% (panneau D) et analysés par immunobuvardage avec un anticorps (1/1000) qui reconnaît la cycline D (A), la cycline E (B), la protéine p27 (C) et la protéine pRb non phosphorylée (pRb) et phosphorylée (pRb-p) (D).

IRL 1620	-	-	-	+
ET-1	-	-	+	-
FBS	-	+	-	-



d'expression de p27^{Kip1}. Par contre, cette augmentation de p27^{Kip1} par l'ET-1 est moins importante que celle induite par l'IRL 1620 et la privation de sérum. Cette augmentation de l'expression de p27^{Kip1} suite à l'activation des récepteurs ET_A et surtout ET_B pourrait expliquer l'absence d'augmentation de niveau d'expression de la cycline E dans les cellules du MLVh.

Comme il a été expliqué dans l'introduction, les protéines pRb hyperphosphorylées permettent la libération de facteurs de transcription E2F qui sont importants dans la transcription de gènes utiles à l'entrée en phase S du cycle cellulaire (NEVINS *et al.*, 1992; GRANA *et al.*, 1998). Afin de pouvoir mieux analyser si l'ET-1 et l'IRL 1620 exercent un effet mitogène sur les cellules du MLVh, nous avons déterminé les effets de l'ET-1 et de l'IRL 1620 sur les niveaux de phosphorylation des protéines de la famille pRb. La figure 34 D montre un exemple. Comme nous pouvons remarquer dans cette figure, les cellules privées du sérum (24h) n'expriment pas la forme hyperphosphorylée de pRb par rapport aux cellules cultivées en présence de sérum. Le traitement des cellules (en absence de sérum) à l'ET-1 (10^{-7} M) ou à l'IRL 1620 (10^{-7} M), n'a pas modifié le niveau d'expression de la forme hyperphosphorylée de pRb. Comme pour les cyclines D et E, l'absence de la forme phosphorylée de pRb suggère que l'ET-1 et l'IRL 1620 ne stimulent pas les cellules du MLVh à entrer dans la phase G1 du cycle cellulaire.

En conclusion, ces résultats montrent que les cellules du MLVh privées de sérum pendant 24 h et traitées à l'ET-1 et surtout l'IRL 1620 exprime un niveau élevé de p27^{Kip1}. Cette augmentation de niveau

d'expression de p27^{Kip1} peut expliquer en partie l'absence d'augmentation des cyclines (D et E) et par la suite leur incapacité d'hyperphosphoryler la protéine pRb. Cet effet de l'ET-1 pourrait expliquer l'inhibition de la rentrée en phase G1 du cycle cellulaire et le freinage de la prolifération des cellules du MLVh par l'ET-1 et en particulier l'activation des récepteurs ET_B.

3.11.2. Effet de l'activation des récepteurs ET_A et ET_B sur l'activité des p42/p44 MAPKs dans les cellules du muscle lisse aortique humain.

La réponse de la cellule à un facteur mitogène est caractérisée par l'activation de la cascade de MAPKs menant par la suite à l'activation biphasique de p42/p44 MAPKs, le premier pic d'activation est notamment observé à 5 min de traitement au mitogène par contre le deuxième pic a lieu après une heure de traitement et il est attribué aux substances mitogéniques (KAHAN *et al.*, 1992). Nos résultats ont montré que l'ET-1 et l'IRL 1620 freinaient la prolifération des cellules du muscle lisse aortique humain.

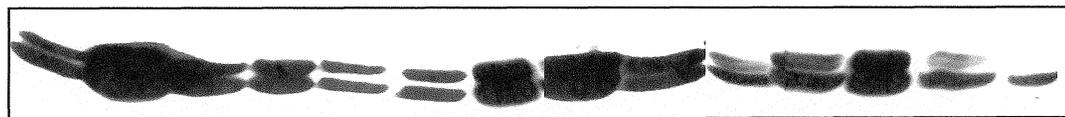
Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons étudié les effets de l'activation des récepteurs ET_A et ET_B sur le niveau des p42/p44 MAPKs. Ces protéines kinases sont impliquées dans le processus d'initiation du cycle cellulaire suite à la translocation de la forme phosphorylée active au noyau qui corrèle avec la présence du deuxième pic d'augmentation et un niveau soutenu de la MAPKs au-delà du niveau de contrôle.

La figure 35 montre un exemple de trois différentes expériences. Comme le montre cette figure, le traitement des cellules du MLVh à l'ET-1 (10^{-7} M) pour des périodes de 2, 5, 30 et 60 min n'a pas d'effet important sur

Figure 35 Effet de l'activation ou l'inhibition des récepteurs ET_A et ET_B sur l'activité des p42/p44 MAPK dans les cellules du muscle lisse aortique humain.

Les cellules du MLVh ont été pré-traitées en absence du sérum avec les antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B, le BQ-123 et le BQ-788 (10^{-5} M) respectivement puis stimulées avec 10^{-7} M d'ET-1. De même d'autres cellules ont été traitées avec l'ET-1 seul 10^{-7} M en absence du sérum. Tous les traitements ont été réalisés pour des périodes de 2, 5, 30 et 60 min. Par la suite, 70 μ g de protéines ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE 10% et analysés par immunobuvardage avec un anticorps (1/500) qui reconnaît la forme phosphorylée active de p42/p44 MAPKs.

BQ-788	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
BQ-123	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
ET-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
FBS	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Temps (min)	-	-	2	5	30	60	2	5	30	60	2	5	30	60	



← p44^P
← p42^P

le niveau de l'expression de la forme phosphorylée active de p42/p44 MAPKs. De plus, nous avons étudié l'effet de la stimulation des récepteurs ET_A sur le niveau de p42/p44 MAPKs. Comme le montre la figure 35, après avoir bloqué les récepteurs ET_B par le BQ-788 (10^{-5} M), la stimulation des récepteurs ET_A induit une augmentation transitoire du niveau de p42/p44 MAPKs. Par contre, aucune autre augmentation n'est observée après 30 minutes. Comme pour l'activation des récepteurs ET_A, l'activation des récepteurs ET_B par l'ET-1 (en bloquant initialement les récepteurs ET_A avec le BQ-123 10^{-5} M) induit une augmentation transitoire des p42/p44 MAPKs. Par contre, il est à noter que la durée de l'augmentation transitoire induite par l'activation du récepteur ET_B est plus longue que celle induite par l'activation des récepteurs ET_A. Ces résultats suggèrent que l'activation des récepteurs ET_A ou ET_B stimulent la première phase de l'activité des p42/p44 MAPKs mais ne semblent pas induire la deuxième phase connue pour être induite par des substances mitogènes. Ces résultats peuvent, en partie, expliquer le mécanisme de freinage du cycle cellulaire observé lors de l'analyse des protéines régulatrices du cycle cellulaire suite à la stimulation des récepteurs ET_A ou ET_B des cellules du MLVh.

3.11.3. L'effet de différentes concentrations du $[Ca]_c$ sur le niveau du calcium libre nucléaire des cellules du MLVh à la membrane plasmique perforée.

Il est bien documenté dans la littérature que la surcharge calcique soutenue au niveau du noyau peut contribuer non seulement à l'expression des gènes et la mitose mais aussi peut être impliquée dans le processus de la mort cellulaire (CARAFOLI *et al.*, 1997). Dans cette série d'expériences, nous avons tenté de vérifier la capacité tampon du noyau pour le calcium cytosolique. Nous avons utilisé le même protocole expérimental de perforation comme décrit dans la section 2.4.2 du matériel et méthodes.

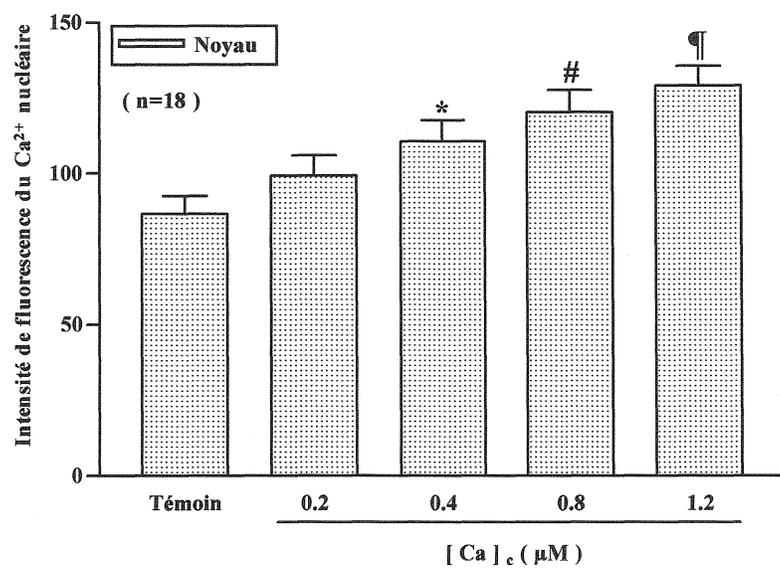
Comme le montre la figure 36, l'ajout séquentiel de doses croissantes de $[Ca]_c$ de 0.2 à 1.2 μM induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_n$ qui atteint une valeur maximale à 1.2 μM (129.0 ± 6.7 ; $p < 0.001$; $n = 18$) par rapport au niveau du $[Ca]_n$ (86.6 ± 5.9 ; $n = 18$) dans les noyaux contrôles.

3.11.4. L'augmentation de l'ET-1 cytosolique bloque la capacité tampon calcique du noyau dans les cellules du MLVh à la membrane plasmique perforée.

Nos résultats décrits précédemment ont montré que l'ET-1 est présent dans les cellules de MLVh et que ce peptide peut être internalisé et transloqué à l'intérieur du noyau avec ses récepteurs membranaires. De plus, des études dans la littérature indiquent que l'ET-1 internalisé avec ses récepteurs reste intact pendant plusieurs heures. De plus, nos résultats ont montré la présence de récepteurs à l'ET-1 dans l'enveloppe nucléaire. Il est donc possible que l'activation de ces récepteurs peut non seulement stimuler l'entrée du calcium à l'intérieur du noyau mais aussi affecter la capacité tampon calcique du

Figure 36 Effet tampon du noyau pour le calcium cytosolique des cellules du muscle lisse aortique humain, dont la membrane de surface a été perforée par l'ionomycine.

En présence de 100 nM du calcium cytosolique, l'ajout subséquent de concentrations croissantes de $[Ca]_c$ (0.2-1.2 μ M) induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_n$. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 18 expériences. * $p < 0.05$; # $p < 0.01$; ¶ $p < 0.001$ vs. témoin.



noyau. Un tel effet peut empêcher une surcharge calcique et ainsi protéger la cellule de la mort cellulaire programmée.

Afin de vérifier si les récepteurs à l'ET-1 de l'enveloppe nucléaire sont fonctionnels et si leur stimulation diminue la surcharge calcique nucléaire, nous avons étudié les effets de l'ET-1 cytosolique sur la capacité tampon du noyau pour le calcium cytosolique des cellules de MLVh à sarcolemme perforé. Une fois la perforation accomplie, les cellules étaient baignées dans un milieu cytosolique contenant 100 nM Ca^{2+} puis laissées pour se stabiliser. Ensuite, nous avons superfusé le noyau à l'ET-1 (10^{-7} M). Par la suite, nous avons administré des concentrations croissantes du Ca^{2+} cytosolique allant de 0.2 à 2.0 μM . La figure 37A montre un exemple et la figure 37 B résume les résultats.

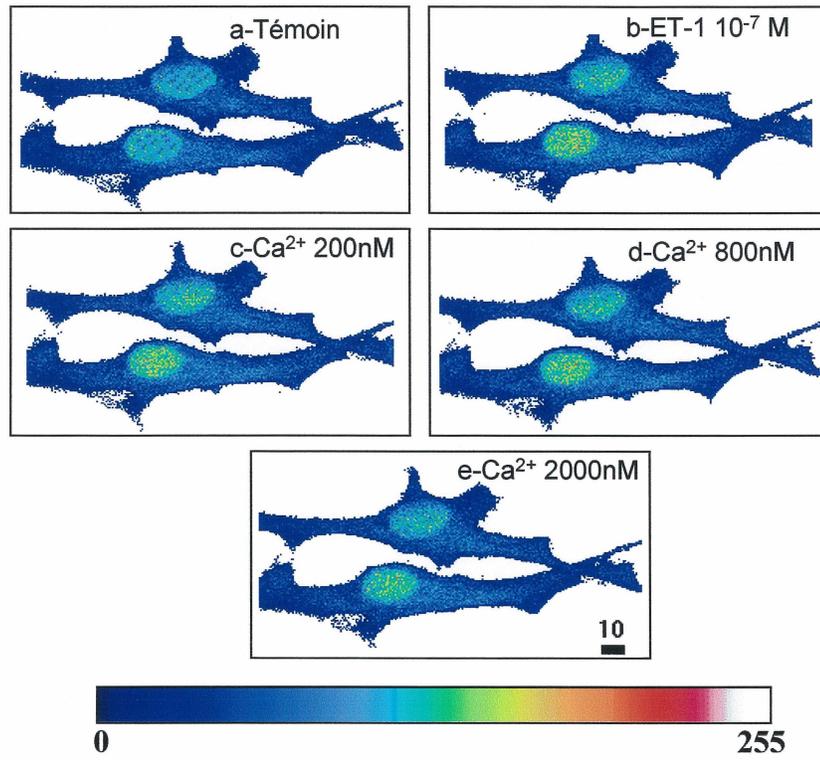
Comme nous pouvons le constater dans cette figure, l'ET-1 cytosolique (10^{-7} M) augmente le $[\text{Ca}]_n$ d'une façon significative ($p < 0.001$) de 67.2 ± 3.7 à 155.2 ± 8.6 ($n=19$). En présence de l'ET-1 cytosolique, l'ajout subséquent de doses croissantes de $[\text{Ca}]_c$ allant de 0.2 à 2.0 μM n'affecte pas le $[\text{Ca}]_n$ (178.2 ± 10.4); $n=19$.

Comme nous pouvons remarquer dans la figure 37 A, l'ajout de l'ET-1 (10^{-7} M) au niveau cytosolique, augmente de façon évidente le taux calcique nucléaire. En effet, cette augmentation est indiquée d'après une échelle d'intensité de la fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} , où le bleu-foncé est associé à une fluorescence minimale alors que le blanc représente l'intensité maximale. Cependant, lorsque des concentrations calciques cytosoliques

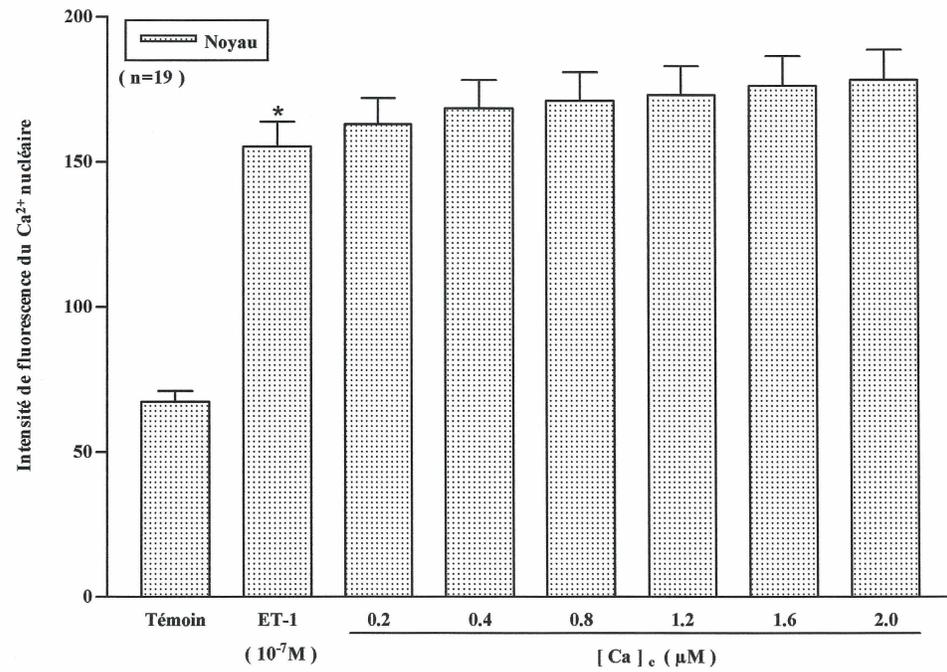
Figure 37 Effet de l'ET-1 cytosolique sur l'effet tampon calcique des noyaux des cellules du muscle lisse aortique humain, dont la membrane de surface a été perforée par l'ionomycine.

A) Le panneau a, représente la distribution et le niveau du calcium libre des cellules du MLVh en milieu contrôle. b) L'ajout de l'ET-1 (10^{-9} M) induit une augmentation de l'intensité de fluorescence du $[Ca]_n$. c - e) En présence de l'ET-1, l'ajout séquentiel de doses croissantes du $[Ca]_c$ n'induit pas une augmentation additionnelle du $[Ca]_n$. L'échelle en pseudocouleur représente les niveaux d'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en noir est en μm . B) Histogrammes montrant qu'en présence d'ET-1 cytosolique, l'ajout subséquent de concentrations croissantes de $[Ca]_c$ (0.2-2.0 μM) n'a pas d'effet sur le $[Ca]_n$. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 19 expériences. * $p < 0.001$ vs témoin.

A)



B)



croissantes du Ca^{2+} (0.2 à 2.0 μM) sont administrées au milieu cytosolique (en présence de l'ET-1) nous n'observons pas d'augmentation calcique significative de la fluorescence du $[\text{Ca}]_n$.

Ces résultats montrent que l'activation des récepteurs à l'ET-1 de l'enveloppe nucléaire (en particulier ET_B) induit une augmentation nucléaire calcique et prévient la surcharge calcique nucléaire.

3.11.5. Atténuation de l'apoptose des cellules du MLVh par l'activation des récepteurs ET_B .

Dans la sous-section précédente, nos résultats ont montré que l'ET-1 cytosolique, en stimulant ses récepteurs nucléaires, module la capacité tampon calcique du noyau en prévenant la surcharge calcique nucléaire. La prévention d'une surcharge calcique nucléaire peut prévenir le déclenchement du processus d'apoptose (NICOTERA *et al.*, 1994; BKAILY *et al.*, 2000a).

Dans cette série d'expériences, nous avons tenté de vérifier si l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B préviennent ou non l'apoptose induite par la génistéine dans les cellules du MLVh. La figure 38 montre un exemple de cette séries d'expériences (n=4).

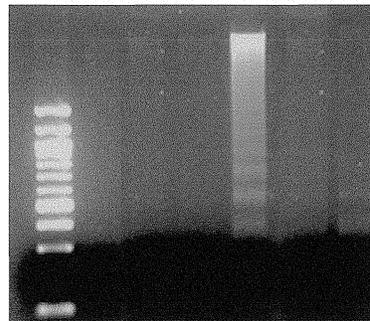
Cette figure montre que la privation prolongée (48h) des cellules du MLVh du sérum n'induit pas l'apoptose. Ces résultats suggèrent qu'elles sont capables de survivre dans de telles conditions. De plus, en absence du sérum, le traitement pour une période de 48h à l'ET-1 (10^{-7} M) ou l'IRL 1620 (10^{-7} M) n'a pas induit l'apoptose des cellules du MLVh. Par contre, les cellules du MLVh traitées avec l'inhibiteur de l'activité tyrosine kinase, la génistéine

Figure 38 Effet de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase sur la fragmentation de l'ADN observée suite au traitement des cellules du MLVh avec l'ET-1 ou l'IRL 1620.

Les cellules du MLVh ont été traitées pendant 48 en absence du sérum avec l'ET-1 (10^{-7} M) ou l'IRL 1620 (10^{-7} M) en absence et en présence de l'inhibiteur de l'activité tyrosine kinase, la génistéine (300 μ g). L'ADN des cellules traitées a été ensuite extrait et 20 μ g ont été portés sur gel d'agarose 2% afin d'être visualisés par coloration au bromure d'éthidium. La privation des cellules du MLVh du sérum ainsi que le traitement avec l'ET-1 ou l'IRL 1620 n'induit pas l'apoptose dans ces cellules. Par contre, la génistéine induit l'apoptose observée par la fragmentation de l'ADN internucléosomique. Le traitement de ces cellules avec l'ET-1 ou l'IRL 1620 en présence de la génistéine atténue l'apoptose induite par l'inhibition de l'activité tyrosine kinase.

Fragmentation de l'ADN

Génistéine	-	-	-	+	+	+
IRL 1620	-	-	+	-	-	+
ET-1	-	+	-	-	+	-
FBS	-	-	-	-	-	-



(isoflavonoid phytoestrogène naturel), qui est utilisé comme marqueur des cellules qui ont entamé un processus apoptotique (GAUTHIER *et al.*, 2001; DUBEY *et al.*, 1999; MATSUKAWA *et al.*, 1993; SPINOZZI *et al.*, 1994) a résulté en une fragmentation de l'ADN. Le prétraitement de ces cellules à l'ET-1 ou l'IRL 1620 en présence de génistéine atténue d'une façon très marquée l'apoptose induite par la génistéine. Cette atténuation est constatée par les degrés d'inhibition de la fragmentation d'ADN.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs ET_A et ET_B des cellules du MLVh atténue l'apoptose induite par la génistéine.

IV- DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1. L'utilisation des cellules du MLVh et la sonde calcique Fluo-3 constitue un excellent moyen pour étudier l'effet de l'endothéline-1 sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$.

Dans la première partie de notre étude, nous avons évalué les effets de l'endothéline-1 sur la modulation du calcium intracellulaire dans les cellules du MLVh. Ces travaux ont été réalisés en utilisant les cellules du MLVh originant de l'aorte humaine adulte et la microscopie confocale.

L'isolation et la culture des cellules du MLVh sont réalisées dans notre laboratoire d'une façon routinière. Les conditions de culture, le temps d'incubation avec la sonde calcique Fluo-3 ainsi que les propriétés électrophysiologiques de ces cellules ont été bien caractérisés (BKAILY *et al.*, 1997a). De plus, ces cellules retiennent leurs phénotypes ainsi que leurs propriétés contractiles (BKAILY *et al.*, 1997a). À noter que, puisque les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de ces cellules en culture sont semblables à celles fraîchement isolées à partir d'aorte humaine (BKAILY *et al.*, 1997a), elles constituent donc un excellent modèle pour les études, *in vitro*, de l'effet de l'ET-1 sur la modulation du tonus vasculaire ainsi que sur la prolifération et la mort cellulaire programmée.

D'autre part, l'approche par microscopie confocale, nous a permis de mieux caractériser les variations des niveaux calciques intracellulaires. En effet, nous avons visualisé en trois dimensions ces variations à l'aide du Fluo-3 qui, ayant un caractère plus lipophile que le Fura-2, se distribue plus uniformément dans les différents compartiments de la cellule (BKAILY *et al.*,

2000c). Dans les cellules du MLVh, nous avons observé une distribution du complexe Ca^{2+} -Fluo-3 légèrement plus élevée au niveau du noyau qu'au niveau du cytosol. Cette distribution hétérogène a été confirmée par l'usage d'autres sondes calciques telles que la sonde ratiométrique Indo-1, qui a montré une distribution similaire à celle observée avec le Fluo-3 (BKAILY *et al.*, 2002a). Cette distribution différentielle du calcium libre dans le noyau par rapport au cytosol a été davantage confirmée par l'usage des protéines fluorescentes possédant une haute affinité pour le calcium telles le cam 3.1 pour le calcium cytosolique et le cam 3.1nu pour le calcium nucléaire (Miyawaki *et al.*, 1999). La co-transfection des cellules du MLVh avec la protéine cam 3.1 (se lie au $[\text{Ca}]_c$) et la protéine cam 3.1 nu (se lie au $[\text{Ca}]_n$) montre, encore une fois, une distribution du calcium dans les cellules du MLVh similaire à celle observée avec le Fluo-3 et l'Indo-1 (BKAILY *et al.*, 2002a). Ces observations montrent clairement que la différence entre le $[\text{Ca}]_c$ et le $[\text{Ca}]_n$ observée avec la sonde calcique Fluo-3 n'est pas le produit d'une compartimentalisation de la sonde fluorescente comme il a été suggéré initialement dans les oocytes par PEREZ-TERZIC *et al.* (1997). En revanche, il a été possible de visualiser les changements du calcium dans le cytosol et dans le noyau, ce dernier étant co-marqué avec la sonde Syto-11 qui se lie spécifiquement aux acides nucléiques.

En conclusion, nos cellules du MLVh constituent un excellent modèle pour des études pharmacologiques et contractiles, afin de mieux comprendre le fonctionnement normal et pathologique du muscle lisse vasculaire humain.

De plus, le Fluo-3 constitue une excellente sonde calcique qui permet de mieux discerner les variations calciques non seulement au niveau du cytosol mais aussi au niveau du noyau.

4.2. L'ET-1 extracellulaire induit d'une façon dose-dépendante une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ dans les cellules du MLVh.

L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur qui a été amplement étudié dans différents modèles cellulaires. L'ET-1 provoque, d'une façon dose-dépendante, la contraction des aortes isolées humaines (SHBAKLO, 2001) et du lapin (BKAILY *et al.*, 2000b).

Afin de mieux caractériser l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 dans les cellules du MLVh, nous avons étudié l'effet de ce peptide sur le niveau du calcium libre cytosolique et nucléaire des cellules isolées en culture du muscle lisse aortique humain.

Nos résultats ont démontré que, dans les cellules du MLVh, l'ET-1 extracellulaire induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une façon dose-dépendante. Nos résultats montrent que pour une concentration de l'ET-1 extracellulaire proche des niveaux physiologiques de l'ET-1 circulant, soit de l'ordre de 1pM (BATTISTINI *et al.*, 1993), cette hormone induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Ces résultats suggèrent que, dans les conditions physiologiques normales, l'ET-1 circulant contribue au maintien du tonus vasculaire de base en augmentant le niveau basal soutenu du $[Ca]_i$. De plus, nos résultats montrent que dans les cellules du MLVh, l' EC_{50} pour l'effet de l'ET-1 extracellulaire sur le $[Ca]_i$ est similaire pour le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$.

(de l'ordre de 10^{-10} M). Cette concentration est relativement basse, suggérant ainsi qu'une légère augmentation du taux d'endothéline circulante (ou extracellulaire) peut induire une élévation substantielle du calcium libre basal, cytosolique et nucléaire. Cette augmentation du $[Ca]_c$ est capable d'augmenter d'une façon importante le tonus vasculaire (BKAILY, 1990; BKAILY *et al.*, 1996; 1997a; 1997b), et ainsi contribue à l'effet vasoconstricteur de l'ET-1. Ceci est en accord avec nos résultats où l'ET-1 à une concentration de 10^{-10} M induit non seulement une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ mais aussi une contracture cellulaire qui devient de plus en plus prononcée avec l'ajout de doses croissantes d'ET-1. De plus, l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ et la contraction observé dans nos expériences, démontre que les récepteurs à l'ET-1 au niveau de la membrane de surface des cellules du MLVh utilisées dans cette étude sont fonctionnels.

À souligner que, nos résultats ont aussi montré que l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par l'ET-1 extracellulaire est bloquée par l'ajout extracellulaire du chélateur du calcium, l'EGTA. Ceci est en accord avec les résultats obtenus sur l'aorte fœtale et adulte humaine (SHBAKLO, 2001) ainsi que sur l'aorte du lapin (BKAILY *et al.*, 2000b). Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation soutenue du calcium libre intracellulaire induite par l'ET-1 extracellulaire est due principalement à la stimulation de l'influx calcique via des canaux calciques de type R de la sarcolemme, insensibles à la nifédipine mais sensibles à l'isradipine (BKAILY *et al.*, 1997a; 1997b). Cette augmentation calcique intracellulaire soutenue est responsable de

l'augmentation du tonus vasculaire induite par l'ET-1 (POLLOCK *et al.*, 1995). De plus, puisque les valeurs de l'EC₅₀ de l'ET-1 sont similaires au niveau du noyau et du cytosol, nos résultats suggèrent ainsi que l'augmentation du [Ca]_n est la conséquence directe de l'élévation du [Ca]_c (BKAILY *et al.*, 1996; 1997a).

4.3. Implication des récepteurs ET_A et ET_B dans la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 extracellulaire.

Plusieurs études ont suggéré que l'activation des récepteurs de l'ET-1 pouvait induire une augmentation de la concentration de [Ca]_i dans les cellules du muscle lisse vasculaire (BIALECKI *et al.*, 1989). Nos résultats ont montré que les antagonistes peptidiques (BQ-123) et non-peptidique (BMS-182874) des récepteurs ET_A prévenaient la réponse calcique cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1. Par contre, seul le BMS-182874 est capable de renverser l'effet de l'ET-1 dans les cellules du MLVh. D'autre part, nos résultats ont montré que l'antagoniste peptidique des récepteurs ET_B (BQ-788) prévient l'effet de l'ET-1 mais, comme l'antagoniste peptidique des récepteurs ET_A (BQ-123), il n'est pas capable d'antagoniser en mode curatif l'effet de l'ET-1 sur l'augmentation du [Ca]_c et [Ca]_n dans les cellules du MLVh. Ces résultats sont similaires à ceux rapportées par HAY *et al.* (1998) dans les cellules du muscle lisse bronchique humain. Ces auteurs ont montré que la contraction induite par l'ET-1 via la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B est renversée seulement par l'usage d'un antagoniste non-peptidique des récepteurs ET_A et ET_B, le SB 209670. Par contre, les antagonistes peptidiques BQ-123 et BQ-

788 des récepteurs ET_A et ET_B (respectivement) n'étaient pas capable de bloquer (en mode curatif) la contraction induite par l'ET-1 dans les cellules du muscle lisse bronchique humain (HAY *et al.* 1998). Ces résultats suggèrent que l'usage des antagonistes non-peptidiques qui possèdent une haute affinité pour les récepteurs ET_A et ET_B et qui sont structurellement différents de l'ET-1 pourrait être un outil important dans le traitement des pathologies liées à l'augmentation de l'ET-1 circulant (OHLSTEIN *et al.*, 1998). La différence entre l'effet curatif de l'antagoniste peptidique BQ-123 et l'antagoniste non-peptidique BMS-182874 des récepteurs ET_A peut être due en partie à la courte demi-vie du BQ-123 par rapport au BMS-182874 (STEIN *et al.*, 1994) ou à la présence d'une population de récepteurs à l'ET-1 insensible aux BQ-788 et BQ-123 comme suggéré par HAY *et al.* (1998).

D'autre part, un effet bénéfique de l'antagonisme des récepteurs ET_A dans l'athérosclérose a été rapporté par KOWALA *et al.* (1995). De plus, le blocage des récepteurs ET_A/ET_B par le bosentan s'est avéré efficace dans le traitement de l'hypertension chez l'homme (KRUM *et al.*, 1998).

Enfin, afin de confirmer l'implication des récepteurs ET_B dans la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh, nous avons étudié l'effet de la stimulation du récepteur ET_B par son agoniste sélectif, l'IRL 1620, sur la réponse calcique. Nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs ET_B par l'IRL 1620 provoque une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Ces résultats suggèrent l'implication des récepteurs ET_B dans

les effets de l'ET-1 sur la modulation du $[Ca]_i$; observée dans les cellules du MLVh.

En conclusion, nos résultats ont montré que l'augmentation calcique induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est médiée via l'activation des récepteurs ET_A et ET_B . De plus, les antagonistes non-peptidiques de ces récepteurs sont plus efficaces que les antagonistes peptidiques pour bloquer les effets de l'ET-1 sur le calcium intracellulaire des cellules du MLVh. Il est donc possible de postuler que ces antagonistes non-peptidiques constituent un moyen efficace pour contrôler les effets vasoconstricteurs de l'ET-1 chez l'homme. L'efficacité et le bénéfice de ces antagonistes non-peptidiques dans le traitement de l'hypertension chez l'homme semble donner des résultats encourageants (HAY *et al.*, 1998).

4.4. Mécanismes impliqués dans la signalisation intracellulaire de l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ dans les cellules du MLVh.

Les effets physiologiques multiples de l'ET-1 sont médiés par l'activation d'au moins deux types de récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs ET_A et ET_B (SAKURAI *et al.*, 1992). Les premières études menées sur la caractérisation de la protéine G couplée aux récepteurs humains de l'ET-1 ont montré que les récepteurs ET_A et ET_B sont couplés à une protéine G insensible à la PTX, possiblement appartenant à la famille $G_{\alpha q}$ (TAKUWA *et al.*, 1989). Ultérieurement, certaines études ont montré que les récepteurs de l'ET-1 peuvent activer plusieurs types de protéines G (TAKAGI *et al.*, 1995), soit la famille $G_{\alpha s}$ (sensible à la PTX) (ODA *et al.*, 1992; ARAMORI *et*

NAKANISHI, 1992; EGUCHI *et al.*, 1993), et soit la famille G α i (sensible à la CTX) (ARAMORI *et* NAKANISHI, 1992; EGUCHI *et al.*, 1993).

Cependant, nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs à l'ET-1 est associée à leur couplage à une protéine G sensible à la PTX et la CTX. Une double sensibilité des récepteurs à l'ET-1 à une protéine G sensible à la PTX et la CTX, a été observée aussi dans les cellules COS-7 transfectées avec les récepteurs ET_A et ET_B (TAKIGAWA *et al.*, 1995). De plus, BOCKAERT (1995) a montré la présence d'une protéine G de type G τ qui est doublement sensible au PTX et la CTX. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les études sur le PAF (GHANDI *et* OLSON, 1991) ainsi que sur l'insuline (BKAILY *et al.*, 1996), qui montrent la double sensibilité des récepteurs du PAF et de l'insuline à la PTX et la CTX.

Il a été rapporté par notre groupe que l'activation des récepteurs à l'ET-1 stimule l'influx calcique via le canal calcique de type R (BKAILY *et al.*, 1997a). Ce canal, une fois activé indirectement par l'ET-1 (via le couplage à une protéine G sensible à la PTX et la CTX) ne peut pas être stimulé davantage par une dépolarisation de la membrane (BKAILY *et al.*, 1997a).

Nos résultats ont montré que la réponse à l'ET-1 généralement observée dans les cellules du MLVh, a été inhibée par le prétraitement de ces cellules à la PTX et /ou la CTX. Cette inhibition a permis au canal d'être disponible pour être activé par une dépolarisation de la membrane. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du [Ca]_i induite par l'ET-1 dans les cellules du MLVh est due à l'augmentation de la probabilité d'ouverture de ce

canal par l'ET-1 (BKAILY *et al.*, 1997a). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés pour l'insuline dans le MLV du lapin (BKAILY *et al.*, 1996).

En conclusion, il est donc possible de postuler que, dans les cellules du MLVh, l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ induite par l'endothéline-1 est due au couplage des récepteurs (ET_A et ET_B) à une protéine G sensible à la PTX et la CTX. La stimulation de cette dernière par l'ET-1 augmente la probabilité d'ouverture du canal calcique de type R (BKAILY *et al.*, 1997a).

D'autre part, il est bien documenté que la protéine kinase C joue un rôle important dans la réponse vasoconstrictrice induite par l'ET-1 dans différents types de cellules du muscle lisse (WANG *et al.*, 1992; EUDE *et al.*, 2000; SHIMODA *et al.*, 1998). Comme il a été montré dans la présente étude, le taux basal calcique ainsi que la réponse calcique soutenue induite par l'ET-1 n'ont pas été affectés par l'administration de l'activateur ou de l'inhibiteur de la PKC dans les cellules du MLVh. Ces résultats suggèrent que la PKC ne module pas le taux basal calcique soutenu du MLVh. De plus, l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ des cellules du MLVh n'est pas médié via la stimulation de la voie de la protéine kinase C. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les cellules du MLV du lapin (BKAILY *et al.*, 1998) ainsi que dans l'artère coronaire porcine (CAIN *et al.*, 2002).

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs ET_A et ET_B des cellules du MLVh par l'ET-1 semble induire leur couplage à une protéine G doublement sensible à la PTX et à la CTX. De plus, nos résultats ont montré que l'effet de l'activation des récepteurs de l'ET-1 sur

l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ des cellules du MLVh se fait via un mécanisme indépendant de la PKC.

4.5. Localisation et distribution de l'ET-1 et de ces récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du MLVh.

Dans le système vasculaire, les cellules endothéliales sont une source importante d'ET-1 (10-80 fmole/10⁵ cellules pendant 24 h); cependant, les cellules du muscle lisse vasculaire produisent aussi une quantité appréciable mais moins faible d'ET-1 (0.1-1 fmole/10⁵ cellules pendant 24 h) (KANSE *et al.*, 1991). Le rôle possible de cette sécrétion et de l'action autocrine de l'ET-1 sur les cellules du MLV n'est pas encore bien déterminé. Par contre, plusieurs indications pointent déjà vers une action mitogénique de l'ET-1 (HIRATA *et al.*, 1989 et ALBERTS *et al.*, 1994). Il a été suggéré que, dans une condition pathologique tel l'athérosclérose, l'endothéline agira de façon autocrine et/ou paracrine afin de stimuler la prolifération des cellules du MLV (HAUG *et al.*, 1996).

D'autre part, la distribution des récepteurs de l'ET-1 dans les cellules du MLVh et endothéliales semble être différente. Les récepteurs ET_A sont présents dans les cellules du muscle lisse et médient une vasoconstriction prolongée (MARSAULT *et al.*, 1993; BKAILY *et al.*, 1994). Par contre, les récepteurs ET_B sont présents au niveau de la sarcolemme des cellules endothéliales, et sont principalement considérés comme médiateurs d'une vasodilatation NO-dépendante (YANAGISAWA et MASAKI, 1989). Ces récepteurs semblent jouer également un rôle dans la clairance de l'ET-1

plasmatique de la circulation (DUPUIS *et al.*, 1996 ; FUKURODA *et al.*, 1994; OPGENORTH *et al.*, 2000; BERTHIAUME *et al.*, 2000).

Nos résultats présentés dans cette étude ont montré que l'ET-1 est immunolocalisée partout (incluant le noyau) dans la cellule du muscle lisse aortique humain. La densité relative de l'ET-1 semble être plus élevée au niveau du noyau. De plus ces résultats ont montré pour la première fois que les récepteurs ET_A et ET_B de l'ET-1 ne sont pas distribués d'une façon homogène dans les cellules du MLVh. Bien que les récepteurs ET_A semblent être localisés en grande densité au niveau de la sarcolemme, les récepteurs ET_B sont distribués plus uniformément partout dans la cellule avec une densité relative plus élevée au niveau nucléaire (incluant l'enveloppe nucléaire et les nucléoles). La présence de sites de liaison nucléaires à l'ET-1 a été rapportée pour la première fois par HOSHER *et al.* (1992) sur des noyaux isolés de foie de rat. Plus tard, notre groupe a démontré, dans les cellules cardiaques embryonnaires de poulet (dont la membrane de surface a été perforée avec l'ionomycine) la présence des récepteurs à l'ET-1 et l'AngII dans les membranes de l'enveloppe nucléaire (BKAILY *et al.*, 1997a).

Cependant, et jusqu'à présent, aucune étude n'a pu identifier le type de récepteurs nucléaires de l'ET-1. Nos résultats présentés dans cette thèse montrent clairement et pour la première fois que les récepteurs de type ET_B et non les récepteurs de type ET_A sont présents dans le noyau des cellules du MLVh. Ces récepteurs nucléaires semblent être fonctionnels et médient l'effet de l'ET-1 sur le [Ca]_n (comme il a été montré avec la courbe dose-réponse de

l'effet de l'ET-1 cytosolique sur le calcium nucléaire dans les cellules du MLVh dont la membrane de surface a été perforée avec l'ionomycine ou le triton). De plus, la comparaison des valeurs de l' EC_{50} obtenues pour l'effet de l'ET-1 extracellulaire (10^{-10} M) et de l'ET-1 cytosolique (10^{-11} M) suggèrent que les récepteurs nucléaires de l'ET-1 sont plus sensibles à l'ET-1 par rapport aux récepteurs présents au niveau de la sarcolemme. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par des études de liaison sur des noyaux isolés de foie de rat (HOSHER et al., 1992). De plus, les récepteurs des membranes nucléaires semblent moduler le $[Ca]_n$ suite à leur activation par leurs ligands (BKAILY *et al.*, 2002b). L'augmentation du $[Ca]_n$, suite à la stimulation des récepteurs nucléaires (ET_B et AT_1), pourrait être due à l'activation du canal calcique de type R connu pour être présent au niveau du noyau (BKAILY, 1994), ainsi qu'à la mobilisation du calcium nucléaire (BKAILY *et al.*, 1997a). À noter que des études multiples suggèrent la présence au niveau de l'enveloppe nucléaire des récepteurs couplés aux protéines G (BOOZ *et al.*, 1992; BKAILY *et al.*, 1997a; 2000a; 2002b; BHATTACHARYA *et al.*, 1999) ainsi que la présence des récepteurs sensibles à l' IP_3 (NICOTERA *et al.*, 1994; MALVIYA, 1990; MIYAZAKI, 1995; GERASIMENKO *et al.*, 1995).

En conclusion, nos résultats montrent que les cellules du MLVh contiennent de l'ET-1. De plus, les récepteurs ET_B connus pour être présents en faible densité au niveau de la sarcolemme, semblent être présents en grande densité au niveau du noyau des cellules du MLVh. Ces récepteurs de

l'enveloppe nucléaire peuvent contribuer au maintien du niveau basal du calcium nucléaire. De plus, la présence préférentielle des récepteurs ET_A au niveau de la membrane de surface suggère que ce type de récepteurs est responsable, en grande partie, de l'effet de l'ET-1 sur le [Ca]_i des cellules du MLVh. D'autre part, il est à noter que la présence de l'ET-1 et de son récepteur ET_B dans les cellules du MLVh d'une façon préférentielle au niveau nucléaire suggère que ce peptide et son récepteur peuvent jouer un rôle dans la régulation des fonctions nucléaires ainsi que dans la modulation du calcium nucléoplasmique. La présence de l'ET-1 et de son récepteur ET_B au niveau du nucléoplasme et les nucléoles suggère que l'ET-1 ainsi que les récepteurs ET_B sont aussi synthétisés au niveau nucléaire (IBORRA *et al.*, 2001). Des études plus poussées sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

4.6. L'ET-1 provoque l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B ainsi que la translocation nucléaire des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

Plusieurs études récentes ont tenté d'étudier les mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans la réponse physiologique de l'ET-1 suite à l'activation des récepteurs ET_A et ET_B. Cependant, le recyclage rapide des récepteurs ET_A (BREMNES *et al.*, 2000), et /ou la stabilisation des ces récepteurs (ABE *et al.*, 2000) pourraient fournir une base pour la réponse contractile prolongée médiée via l'activation de ces types de récepteurs. Par

contre, le ciblage des récepteurs ET_B vers les lysosomes pourrait apporter des indications suggérant un rôle de ces récepteurs dans l'élimination de l'ET-1 de la circulation. (BREMNES *et al.*, 2000).

L'analyse de nos résultats sur l'expression des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh en western blot, montre une bande principale de ~ 49kDa correspondant au récepteur ET_B. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par TANAKA *et al.* (1998) dans les cellules CHO transfectées avec le récepteur ET_B humain.

Pour les récepteurs ET_A, une bande de 34 kDa a été identifiée dans les cellules mésangiales de rat (SIMONSON *et* ROONEY, 1994) et qui correspond à celle obtenue dans nos résultats.

Par contre, une bande de 70 kDa correspondant aux récepteurs de l'ET-1 a été détectée dans les tissus périphériques tels l'iléum du cochon d'inde, l'oreillette de rat (BOUSSO-MITTLER *et al.*, 1991) et les cellules dérivées de l'oreillette humaine (MIHARA *et* FUJIMOTO, 1992). De plus, une autre bande de 65 kDa correspondant aussi au récepteur de l'ET-1 a été identifiée dans le cœur bovin (SHANNON *et* HALE, 1994). Il est donc possible que, la différence de la taille des récepteurs de l'ET-1 soit la résultante de la différence au niveau post-traductionnelles due à des modifications au niveau de la glycosylation ou de la phosphorylation du récepteur. Ces modifications post-traductionnel pourraient justifier 30 % de la masse moléculaire de la protéine (SOKOLOVSKY, 1995).

Nos résultats ont montré clairement que les récepteurs ET_A de la membrane de surface des cellules du MLVh sont internalisés en réponse à l'ET-1 extracellulaire. Par la suite, une fraction de ces récepteurs internalisés se retrouve dans une région nucléaire et réapparaissent de nouveau au niveau de la membrane de surface. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par BREMNES *et al.* (2000) et ABE *et al.* (2000).

De plus, nos résultats ont montré que, comme pour les récepteurs ET_A, l'ET-1 extracellulaire induit aussi l'internalisation des récepteurs ET_B. Cette internalisation est suivie par une translocation nucléaire de la majorité des récepteurs ET_B mobilisés par l'ET-1. De plus, nos résultats ont montré que l'antagoniste du récepteur ET_B (BQ-788) inhibe le processus d'internalisation et de translocation nucléaire du récepteur. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés pour les récepteurs AT₁ dans les cellules du MLVh (BKAILY *et al.*, 2002b).

De plus, nos résultats, en utilisant le double marquage de l'ET-1 et de son récepteur ET_B, montrent clairement que le récepteur ET_B s'internalise avec son ligand. Des observations similaires ont été rapportées dans les cellules COS pour l'ET-1 et ses récepteurs ET_A (SAWAMURA *et al.*, 1990). Ces études ont suggéré que l'ET-1 reste intacte pendant une heure après l'internalisation et reste couplé au récepteur ET_A. Nos résultats ont montré aussi que non seulement le récepteur ET_B est internalisé avec son ligand mais que le ligand et son récepteur sont par la suite transloqués au niveau du noyau. La co-localisation du complexe ET-1/ET_B internalisé est extrêmement

importante puisqu'elle permet non seulement la clairance de l'ET-1 extracellulaire mais aussi permet de transporter le ligand jusqu'aux récepteurs ET_B localisés au niveau de l'enveloppe nucléaire. De plus, puisque les récepteurs des membranes nucléaires sont plus sensibles à l'ET-1 par rapport à ceux internalisés de la sarcolemme. Il est donc possible que les récepteurs des membranes nucléaires arrachent l'ET-1 des complexes ET-1/ET_A ou ET_B internalisés. L'ET-1 pourrait ainsi contribuer à la régulation de l'expression des gènes, notamment le gène du récepteur ET_B puisque l'ET-1 en stimulant ses récepteurs semblent induire la synthèse protéique des récepteurs ET_B.

En résumé, l'activation des récepteurs à l'ET-1 stimule non seulement leur internalisation mais aussi leur translocation nucléaire comme il a été rapporté pour les récepteurs AT₁ de l'Ang II (BKAILY *et al.*, 2002b). D'autre part, il a été rapporté que le transport passif des protéines à travers le pore nucléaire est régularisé par le remplissage des réserves calciques de l'enveloppe nucléaire (STEHNO-BITTEL *et al.*, 1995). La présence d'une nucléoprotéine gp210 (glycoprotéine transmembranaire du pore nucléaire) possédant une haute affinité pour le calcium suggère son implication dans le transport des macromolécules à travers le complexe du pore nucléaire (GREBER *et GERACE*, 1992). De plus, il a été rapporté que l'ATP et une haute concentration de calcium déclenchent le transport des macromolécules à travers le canal central du pore nucléaire, probablement par le biais des vagues de contraction péristaltique (SHINDLER *et JIANG*, 1986). Il est donc possible que l'augmentation du [Ca]_i induite par l'ET-1 dans les cellules du

MLVh peut contribuer en partie à son internalisation et plus particulièrement à sa translocation nucléaire. Cette hypothèse doit être vérifiée dans le futur.

Il est finalement possible de postuler que l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca]_i$ des cellules du MLVh soit la résultante de :

- 1) L'activation des récepteurs ET_A et ET_B de la sarcolemme;
- 2) L'augmentation du calcium cytosolique suivie par une augmentation du calcium nucléaire;
- 3) L'internalisation des complexes ligand/ ET_A et ligand/ ET_B ;
- 4) Le détachement du ligand du complexe internalisé et son attachement aux récepteurs des membranes nucléaires;
- 5) L'activation du récepteur ET_B nucléaire par l'ET-1 qui induit une augmentation supplémentaire du $[Ca]_n$ et;
- 6) La relâche lente du calcium nucléaire vers le cytosol a pour conséquence de maintenir un niveau élevé du $[Ca]_c$ qui est responsable en grande partie de l'augmentation maintenue et pour de longue durée de la tension vasculaire induite par l'ET-1.

4.7. L'ET-1 induit la synthèse protéique *de novo* des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh.

Le niveau d'expression des récepteurs ET_B , dans les cellules du MLV dérivé de l'aorte, augmente dans certaines pathologies vasculaires tel l'hypertension (BATRA *et al.*, 1993). Cette augmentation de la densité des récepteurs ET_B corrèle avec l'augmentation de l'immunoréactivité de l'ET-1

observée dans l'intima de la paroi vasculaire des rats hypertensifs (LARIVIERE *et al.*, 1995).

De plus, Il a été rapporté que l'ET-1 forme un complexe hautement stable avec ses récepteurs de type ET_B (TAKASUKA *et al.*, 1994) et que la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs est connue d'être largement irréversible (WAGGONER *et al.*, 1992). De plus, l'ET-1 induit un effet vasoconstricteur soutenu (VANE, 1990) qui pourrait être due à l'occupation du récepteur par l'ET-1 pour de longue durée (SPINELLA *et al.*, 1993). D'autre part, ABE *et al.* (2000) ont montré dans plusieurs lignées cellulaires transfectées par les récepteurs ET_A et ET_B que, l'ET-1 augmente le nombre des récepteurs ET_A et ET_B même en présence de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique), ce qui suggère qu'une stimulation prolongée avec l'ET-1 augmente le nombre intact des récepteurs ET_A et ET_B non pas en renforçant l'expression des ces protéines mais en les stabilisant. Par contre, nos résultats ont montré que l'ET-1, en stimulant les récepteurs ET_B, induit l'expression de ces récepteurs qui est inhibée par le prétraitement des cellules du MLVh avec le cycloheximide. Ces résultats suggèrent que dans les cellules du MLVh, l'ET-1 induit la synthèse protéique *de novo* des récepteurs ET_B. Cette expression *de novo* des récepteurs ET_B induite par l'ET-1 suggère d'une part un rôle important de ce type de récepteurs dans la modulation de l'effet soutenu de l'ET-1 dans les cellules du MLVh. D'autre part, cette expression *de novo* des récepteurs ET_B induite par l'ET-1 peut servir à compenser la dégradation des récepteurs ET_B. Ces derniers semblent être dégradés plus vite

que les récepteurs ET_A d'où leur importance dans la clairance de l'ET-1 de la circulation (DUPUIS *et al.*, 1996 ; FUKURODA *et al.*, 1994; OPGENORTH *et al.*, 2000; BERTHIAUME *et al.*, 2000).

4.8. Inhibition de la prolifération des cellules du MLVh par l'ET-1.

L'ET-1 joue un rôle mitogène pour plusieurs types cellulaires, entre autres les cellules du MLV (BOBIK *et al.*, 1990; HIRATA *et al.*, 1989; SIMONSON *et al.*, 1989; WEBER *et al.*, 1994; KURIHARA *et al.*, 1997). Dans les cellules B103 du neuroblastome, il a été suggéré, en utilisant la méthode de l'incorporation de la thymidine [³H], que l'ET-1, via la stimulation de son récepteur de type ET_B, active la MAPK mais cette dernière est incapable de produire un effet mitogène (KAWANABE Y *et al.*, 2001). De plus, WANG *et al.* (1992) ont montré que l'ET-1 active la MAPK dans les cellules mésangiales de rat. De plus, ce processus activé par l'ET-1 induit l'activation de la protéine kinase C et une tyrosine kinase.

Nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs ET_A ou ET_B augmente à l'intérieur de 5 min l'expression de la forme phosphorylée des p42/p44 MAPKs. Cet effet a été suivi par une diminution des p42/p44 MAPKs jusqu'au niveau contrôle (30 à 60 min). Il est connu que les agents mitogéniques provoquent une stimulation biphasique des p42/p44 MAPKs; un premier pic d'activation entre 5-10 minutes suivi d'un deuxième pic d'activation qui peut durer jusqu'à six heures (KAHAN *et al.*, 1992). Ce

deuxième pic d'activation suivi par une augmentation soutenue des p42/p44 MAPK correspond à la translocation nucléaire des p42/p44 MAPKs (LENORMAND *et al.*, 1998). L'activation soutenue (PAGÈS *et al.*, 1993) et la translocation nucléaire (BRUNET *et al.*, 1999) des p42/p44 MAPK sont des prérequis essentiels pour la prolifération cellulaire observée dans plusieurs types cellulaires (ROBINSON *et* COBB, 1997). Dans nos résultats, la présence du premier pic d'activation et l'absence de l'activation biphasique des p42/p44 MAPKs correspond à la rétention cytoplasmique des p42/p44 MAPKs suite à la stimulation des récepteurs ET_A et/ou ET_B par l'ET-1, et pourrait d'une part justifier l'absence de la prolifération des cellules du MLVh en réponse à l'ET-1. D'autre part, la rétention cytoplasmique des p42/p44 MAPKs pourrait contribuer à la phosphorylation de certaines protéines cytosoliques et ainsi contribuer à l'effet contractile de l'ET-1 sur les cellules du MLVh. Cette hypothèse est supportée par les études de ZUBKOV *et al.* (2000) qui ont montré, que la contraction de l'artère basilaire de lapin par l'ET-1 implique l'activation de la MAPK. De plus, un rôle important est attribué au p42/p44 MAPKs dans la phosphorylation des protéines contractiles afin de maintenir le tonus vasculaire (ADAM *et al.*, 1995). Ce phénomène est basée sur une corrélation temporelle entre l'activation de p42/p44 MAPKs et la phosphorylation de la protéine caldesmone (une protéine des filaments fins) (TAKAHASHI *et* BERK, 1998).

À noter aussi que d'autres études ont suggéré un rôle du récepteur internalisé dans la rétention cytoplasmique de la p42/p44 MAPKs. En effet,

l'activation de PAR2 (récepteur activé par la protéinase 2, un récepteur couplé à la protéine G) induit l'activation de la p42/p44 MAPK (DEFEA *et al.*, 2000). Cette dernière reste dans le cytosol et n'induit pas la prolifération cellulaire comme il a été démontré avec nos résultats suite à l'activation des récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du MLV. Par contre, l'activation de PAR2 induit la formation d'un complexe protéique dans les vésicules d'endocytose contenant le récepteur PAR2, la β -arrestine 1, la protéine Raf-1 et la p42/p44 MAPKs active (DEFEA *et al.*, 2000). Ce complexe multiprotéique sert d'ailleurs à maintenir la p42/p44 MAPK dans le cytoplasme et de prévenir par la suite sa translocation dans le noyau. Un mécanisme similaire est observé avec le récepteur AT₁ de l'AngII qui, suite à son activation et son internalisation, forme un complexe protéique regroupant plusieurs molécules dans le but d'activer la protéine JNK3 (MCDONALD *et al.*, 2000; POUYSSEGUR, 2000). Il est donc possible de postuler que la compartimentalisation des complexes signalétiques dans les vésicules d'endocytose suite à l'internalisation des récepteurs à l'ET-1 (ET_A et/ou ET_B) peut être un mécanisme favorisant le contrôle de l'activité de la MAPK par les récepteurs internalisés (MCPHERSON *et al.*, 2001).

D'autre part, la protéine p27^{Kip1} maintient les cellules en état de quiescence et régule la phase G1 du cycle cellulaire (FIRPO *et al.*, 1994; NOURSE *et al.*, 1994). Cette protéine a pour rôle d'inhiber les complexes cyclines-cdks nécessaires à la progression de la phase G1 et la phase de transition G1-S du cycle cellulaire. Nos résultats présentés dans cette thèse

montrent l'expression de p27^{Kip1} dans les cellules quiescentes privées de sérum. À noter qu'aucune expression de p27^{Kip1} n'a été détectée dans les cellules cultivées en présence du sérum. De plus, nos résultats ont montré que la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B par l'ET-1 n'induit pas une augmentation de l'expression de p27^{Kip1}. Par contre, la stimulation des récepteurs ET_B par l'IRL 1620 augmente le niveau de p27^{Kip1}. De plus, comme l'ET-1, l'agoniste des récepteurs ET_B n'affecte pas les niveaux des cyclines D1/D2 et E et il n'est pas capable en conséquence d'hyperphosphoryler la protéine pRb. Il est donc possible que le maintien de certains niveaux d'expression de la protéine p27^{Kip1} (suite à la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B) ou l'augmentation du niveau d'expression de p27^{Kip1} (suite à la stimulation des récepteurs ET_B) dans les cellules du MLVh soient suffisants pour freiner l'expression des cyclines D, E et la forme hyperphosphorylée de pRb et ainsi prévenir l'entrée des cellules du MLVh dans le cycle cellulaire.

Nos résultats semblent être différents de ceux rapportés par HAFIZI *et al.* (1999) sur les cellules du muscle lisse de l'artère coronaire humaine. Ces auteurs ont rapporté un effet mitogénique de l'ET-1 qui est médié via l'activation des récepteurs ET_A. Cette différence peut être expliquée par la différence du type cellulaire utilisé dans les deux cas. De plus, bien que nos résultats et ceux rapportés par YANG *et al.* (1999) sur les cellules du MLV de l'aorte humaine sont en accord sur le fait que l'ET-1 n'induit pas la prolifération de ce type de cellules, il est possible par contre que ce peptide

via l'activation de ses récepteurs (en particulier ET_A), potentialise l'effet mitogénique induit par certains facteurs de croissance comme le PDGF (YANG *et al.*, 1999; FUJITANI *et BERTRAND*, 1997; PANETTIERI *et al.*, 1996).

Finalement, puisque nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs ET_B augmente l'expression de p27^{Kip1} et puisque cette dernière inhibe les cyclines D et E, il est donc possible de postuler que l'activation des récepteurs ET_B peut jouer un rôle anti-proliférateur pour les cellules du MLVh. Cette hypothèse doit être vérifiée dans le futur.

4.9. L'ET-1 module l'effet tampon calcique du noyau dans les cellules du MLVh.

Le rôle ubiquitaire du calcium dans la biologie de la cellule laisse suspecter qu'il pourrait jouer un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires tel le processus d'apoptose (BKAILY *et al.*, 2000a; FILIPPATOS *et al.*, 2001). En fait, l'augmentation et la diminution du niveau du calcium intracellulaire semblent promouvoir l'apoptose de plusieurs types cellulaires (TRUMP *et BEREZESKY*, 1995; KLUCK *et al.*, 1994). De plus, une augmentation du taux du calcium nucléaire précède la fragmentation de l'ADN (MASON *et al.*, 1999). Cette augmentation semble être attribuée à une augmentation sélective de la perméabilité du pore nucléaire pour le calcium ou à une stimulation du transport du calcium des réserves périnucléaires (NICOTERA *et al.*, 1994).

Nos résultats ont montré que le noyau joue un rôle important comme tampon pour le [Ca]_c dans le couplage excitation-contraction des cellules du

MLVh. Ces résultats ont montré que le noyau cesse de tamponner le niveau du calcium libre une fois la concentration cytosolique de cet ion est de l'ordre de 1.2 mM. Cet effet tampon maximal du noyau pour le calcium cytosolique est similaire à ceux rapportés pour les cellules endothéliales vasculaires (BKAILY *et al.*, 1997a) et les cellules embryonnaires de cœur de poulet (BKAILY *et al.*, 1996). Nos résultats suggèrent que le noyau joue un rôle important dans le maintien du couplage excitation-contraction des cellules du MLVh. La prise du $[Ca]_c$ par le noyau pourrait être impliquée dans i) le contrôle du niveau basal calcique cytosolique dans les cellules au repos, ii) le maintien du niveau du $[Ca]_c$ à un niveau nécessaire pour maintenir la tension des cellules du MLV et iii) la stimulation des protéines liant le calcium comme la calmoduline dans le but de promouvoir l'expression de certaines protéines (BKAILY *et al.*, 1997a).

Nos résultats ont aussi montré que les récepteurs de l'ET-1 au niveau de l'enveloppe nucléaire sont fonctionnels et que la stimulation de ces récepteurs par l'ET-1 module la capacité tampon du noyau pour le calcium cytosolique. Ces résultats suggèrent que l'ET-1 cytosolique module la capacité tampon maximale du noyau afin de prévenir une surcharge calcique nucléaire. Une telle prévention de la surcharge calcique nucléaire par l'ET-1 cytosolique peut contribuer à prévenir l'apoptose des cellules du MLVh (BKAILY *et al.*, 1997b).

4.10. L'ET-1 atténue l'apoptose induite par la génistéine dans les cellules du MLVh.

Dans la section précédente, nos résultats ont montré que l'ET-1 cytosolique, en stimulant ses récepteurs de l'enveloppe nucléaire, module la capacité tampon calcique du noyau en prévenant la surcharge calcique nucléaire. L'augmentation excessive du calcium nucléaire est impliquée dans le déclenchement du processus d'apoptose (NICOTERA *et al.*, 1994).

Nos résultats ont montré que la privation prolongée du sérum (48h) n'induit pas l'apoptose des cellules du MLVh. Ces résultats suggèrent que les cellules du MLVh sont aptes à survivre dans de telles conditions. De plus, en absence du sérum, l'activation des récepteurs ET_A et ET_B n'induit pas l'apoptose dans les cellules du MLVh. Ces résultats suggèrent que l'activation des récepteurs ET_A et ET_B par l'ET-1 n'induit pas l'apoptose des cellules du MLVh. Par contre, nos résultats ont montré que le traitement des cellules du MLVh à l'inhibiteur de l'activité tyrosine kinase, la génistéine, induit une fragmentation de l'ADN. Ces résultats suggèrent que la génistéine peut induire l'apoptose des cellules du MLVh. Par contre, la réponse apoptotique des cellules du MLVh induite par la génistéine est prévenue par la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B ou ET_B seulement.

À noter qu'une sur-expression de p27^{Kip1} a déjà été associée à la fragmentation de l'ADN (KATAYOSE *et al.*, 1997) et qu'une inhibition prolongée des p42/p44 MAPKs par la génistéine peut contribuer à l'initiation de l'apoptose (BOUCHER *et al.*, 2001). Par contre, nos résultats ont montré

que la stimulation des récepteurs ET_B par l'IRL 1620 augmente la p27^{Kip1} et diminue à long terme le niveau basal soutenu des p42/p44 MAPKs. Il est donc possible de postuler que l'effet antiapoptotique de la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B ainsi que ET_B seulement ne soit pas médié via la modulation du niveau de p27^{Kip1} et des p42/p44 MAPKs. Par contre, il est possible que cet effet anti-apoptotique de l'ET-1 soit due en partie à la prévention de la surcharge calcique nucléaire par l'ET-1 cytosolique via l'activation de ses récepteurs de l'enveloppe nucléaire et en particulier ET_B. Des études sur les effets de la génistéine sur la p27^{Kip1} et les p42/p44 MAPKs sont nécessaires afin de confirmer nos résultats.

4.11. Considérations physiologiques et pathologiques des résultats.

Nos résultats ont montré que l'ET-1 stimule la synthèse *de novo* des récepteurs ET_B dans les cellules du MLVh. L'augmentation de l'expression de ces récepteurs suite à leur stimulation induite par l'ET-1 pourrait expliquer la prédominance des récepteurs ET_B dans les cellules du MLV dérivées de la plaque fibreuse et leur rôle potentiel dans le contrôle de la progression de l'athérosclérose en réponse à l'ET-1 (PRAT *et al.*, 1993; DASHWOOD *et al.*, 1993; IWASA *et al.*, 1999). De plus, un rôle bénéfique du blocage du récepteur ET_A par un antagoniste non-peptidique, le BMS-182874, a été observé chez les hamsters suivant une diète en cholestérol. Ces études montrent l'effet bénéfique des antagonistes non-peptidiques des récepteurs ET_A dans l'antagonisme des effets de l'ET-1. Le blocage du récepteur ET_A semble retarder le développement de l'athérosclérose en diminuant de 80% la

surface grasseuse de l'aorte et le nombre des macrophages dans la paroi vasculaire (KOWALA *et al.*, 1995). Il est possible de postuler que le blocage des récepteurs ET_A peut engendrer un mécanisme de compensation qui se traduit par une augmentation de la synthèse des récepteurs ET_B. Comme nos résultats ont montré un effet anti-proliférateur des récepteurs ET_B, l'augmentation de ce type de récepteur conjuguée à une diminution des activités des récepteurs ET_A peut être la cause de l'effet bénéfique observé sur l'inhibition de la prolifération par les antagonistes des récepteurs ET_A. L'effet anti-proliférateur et anti-apoptotique de l'activation des récepteurs de l'ET-1 et en particulier ET_B suggère que ces récepteurs exercent un mécanisme de freinage de la prolifération des cellules du MLVh. Ce processus de freinage peut contribuer à limiter la masse cellulaire des tissus souffrant d'athérosclérose.

De plus, nos résultats ont montré que l'ET-1 protège les cellules du MLVh contre l'apoptose tout en bloquant ou atténuant la prolifération de ces cellules. Ces résultats sont importants car ils nous aident à mieux comprendre non seulement le rôle pathologique mais aussi le rôle protecteur de l'ET-1 dans les désordres reliés à la croissance cellulaire tel la resténose (WU-WONG *et al.*, 1997)

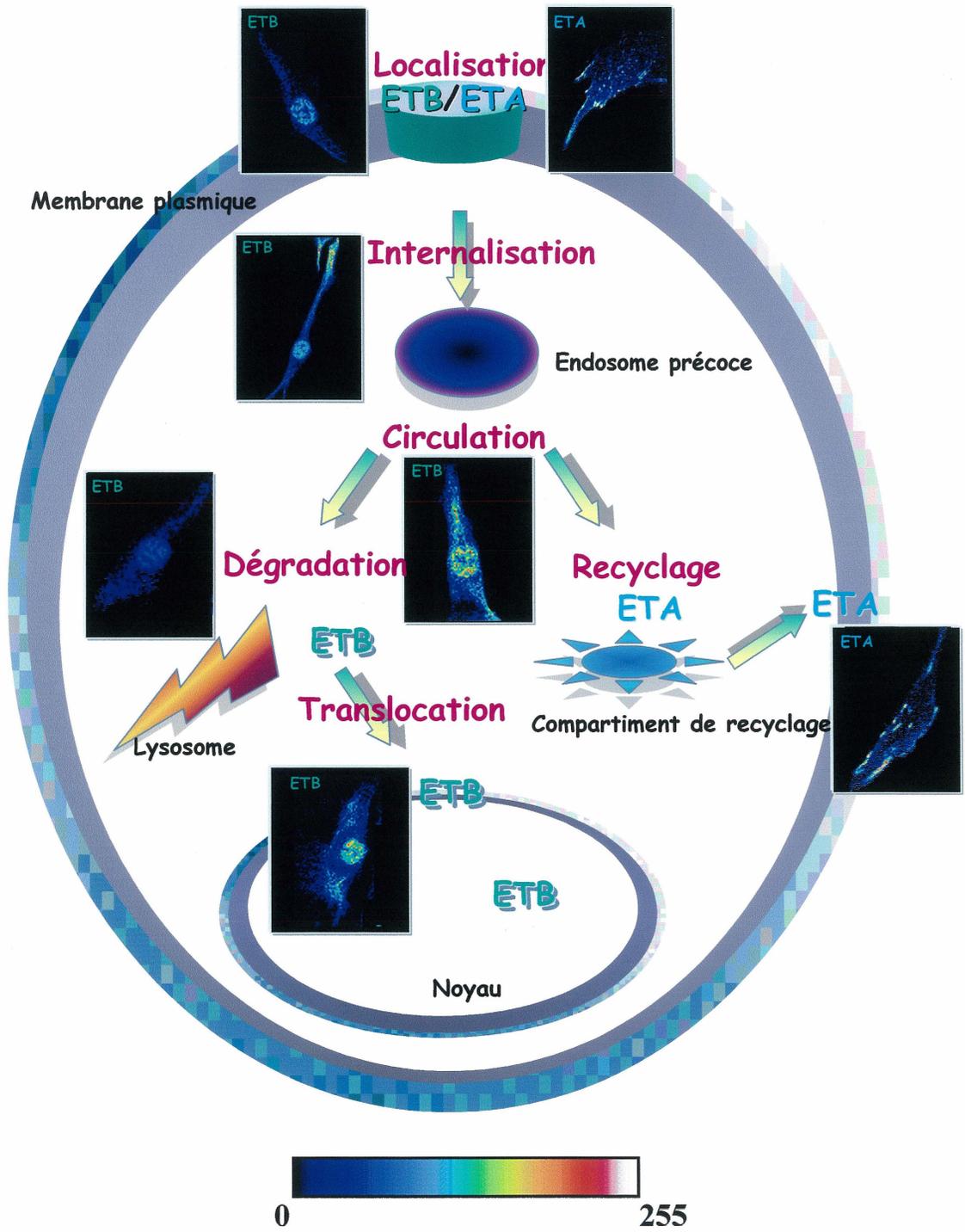
Finalement, avec l'émergence du concept de la présence des récepteurs couplés aux protéines G au niveau nucléaire, ainsi que leurs implications dans la modulation du calcium nucléaire, il est donc possible de postuler que ces récepteurs nucléaires peuvent être impliqués non seulement dans le

fonctionnement normal du MLVh mais aussi dans la pathologie cellulaire. Ces récepteurs nucléaires de l'ET-1 pourraient être une cible thérapeutique indispensable dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

Nos résultats ont montré que dans les cellules du MLVh, l'ET-1 en activant ses récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique, induit une augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire. Cette augmentation calcique semble être due à un influx calcique à travers les canaux calciques de type-R de la membrane plasmique. Puisque l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B induit une stimulation de l'activité des canaux calciques de type-R. Il est donc possible de postuler que des bloqueurs de ce type de canal peuvent constituer un excellent moyen thérapeutique pour bloquer l'effet physiologique d'une sur-stimulation des récepteurs à l'ET-1 (BKAILY *et al.*, 1997b).

De plus, nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs ET_A et ET_B de la sarcolemme par l'ET-1 induit l'internalisation de ces récepteurs comme il est proposé dans la figure 39. Les récepteurs ET_A de la membrane de surface sont internalisés suite à leur stimulation par l'ET-1. Ces récepteurs se retrouvent par la suite au niveau nucléaire avant d'être recyclés de nouveau au niveau de la sarcolemme. Ces résultats suggèrent que puisque ces récepteurs sont recyclés au niveau de la membrane de surface, ils peuvent donc être de nouveau une cible non seulement pour l'ET-1 extracellulaire mais aussi pour les antagonistes de ce type de récepteur. Par contre, nos résultats ont montré que les récepteurs ET_B sont localisés partout dans la

Figure 39 Représentation schématique de l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du MLVh.



cellule avec une densité plus élevée au niveau nucléaire des cellules au repos. De plus, suite à leur stimulation par l'ET-1 extracellulaire, les récepteurs ET_B sont internalisés avec leur ligand et sont par la suite transloqués au noyau. De plus, nos résultats ont montré que le récepteur nucléaire de type ET_B module le niveau du calcium libre nucléaire suite à sa stimulation par l'ET-1 et contribue surtout à la modulation de la capacité tampon du noyau pour le calcium cytosolique. Ces résultats suggèrent un rôle important de ces récepteurs nucléaires dans la prévention d'une surcharge calcique nucléaire qui pourrait expliquer l'effet anti-apoptotique suite à la stimulation de ces récepteurs comme il a été observé dans nos expériences. Nos résultats ont aussi montré que la stimulation des récepteurs ET_B par l'ET-1 dans les cellules du MLVh induit l'augmentation de l'expression de la protéine p27^{kip1} qui confirme le mécanisme de freinage du cycle cellulaire due à l'incapacité de l'ET-1 d'augmenter la synthèse des cyclines et d'hyperphosphoryler la protéine pRb. Ces résultats montrent clairement le rôle important de p27^{kip1} dans la régulation de la prolifération des cellules du MLVh.

En perspective, des études plus poussées sont nécessaires afin de confirmer le rôle du calcium dans l'internalisation et la translocation des récepteurs de l'ET-1. D'autre part, BREMNES *et al.* (2000) ont montré dans les cellules COS, que les récepteurs ET_A et ET_B s'internalisent rapidement suite à la stimulation par l'ET-1. Le processus d'internalisation semble dépendre de GRK (Kinase des protéines-G), l'arrestine, la dynamine et la

clathrine. Des études plus poussées sont nécessaires afin d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules du MLVh en réponse à l'ET-1.

De plus, des études réalisées sur des noyaux isolés des cellules du MLVh sont nécessaires afin de confirmer davantage la sensibilité des récepteurs nucléaires de type ET_B à des doses physiologiques de l'ET-1.

Finalement, afin de mieux élaborer le rôle des récepteurs ET_A et ET_B dans l'atténuation de l'apoptose dans les cellules du MLVh, il s'avère nécessaire de vérifier l'effet du blocage des récepteurs ET_A ou ET_B sur l'atténuation de l'apoptose et de confirmer ces études en utilisant d'autres agents apoptotiques. Les perspectives à long terme seraient de vérifier si les voies de JNK et p38 constituent des cibles dans la voie de signalisation menant à la régulation de l'apoptose par l'ET-1 dans les cellules du MLVh.

V- REMERCIEMENTS

A l'issue de ces années de travaux, le moment est venu, pour moi, de remercier toutes les personnes qui m'ont entouré pour mener à bien ce projet. La liste est longue et je vais essayer de n'oublier personne.

Mes remerciements les plus vifs vont tout particulièrement à mon directeur de recherche, Dr Ghassan Bkaily, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, où j'ai pu travailler sur cette thèse et sur bien d'autres sujets passionnants, pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé et pour m'avoir attribué l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur. La confiance qu'il m'a témoigné, le temps qu'il m'a consacré, et les conseils qu'il m'a donné tout au long de mes travaux, m'ont largement aidé à mener à bien cette thèse.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance envers les membres de mon jury de thèse. Dr. Jacques Bérard, Dr. Pedro d'Orléans-Juste et Dr. Mohamed Chahine qui ont bien voulu accorder leur temps précieux à l'évaluation de ma thèse.

Je tiens à remercier aussi Dr. Danielle Jacques, Dr. Nathalie Rivard et Dr. Pierre Vachon pour les nombreuses discussions échangées ainsi que les nombreux conseils pertinents offerts sur plusieurs aspects de mes travaux de recherche.

Je n'oublierai pas les aides permanentes reçues de certains membres du département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire incluant le corps professoral qui a contribué à ma formation ainsi que les étudiants, les assistants de recherche et les secrétaires qui ont participé à créer une bonne ambiance de travail.

Ma sincère gratitude à Pierre Pothier qui m'a communiqué sa passion pour l'informatique. De même je tiens à remercier Pierre ainsi que Ghassan B. Bkaily pour leur assistance technique.

Pour son amitié, la confiance qu'elle me témoigna, pour son aide lors de mon séjour à Sherbrooke, pour son soutien dans les moments difficiles, pour toutes nos conversations scientifiques et non-scientifiques, je lui serai toujours profondément reconnaissante. Sawsan MERCI!!!!

Une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, un café, un repas ou une console d'ordinateur pendant ces années : Sawsan S., Ghada H., Sama S., Joe S., Hadia S., Nesrine EB., Nelly AM., Rami S. et toute le nouveau groupe du Laboratoire du Dr. Bkaily, je remercie tout d'abord Ghada k. et Moni N. pour leur aide dans la réalisation de certaines expériences ainsi que Johnny K., Maud K., Magda D., Mirna C., Claudine P. et Dani B. pour leur amitié.

Tout au long d'une thèse, il y a des hauts et des bas. Il y a aussi des absences prolongées. Une personne est cependant toujours là avec le moral pour nous soutenir. Personnellement, il s'agit de mon ami de coeur, Paul Habib. J'aimerais te remercier pour ta patience, ta compréhension et ta joie de vivre qui illumine ma vie. MERCI!!!

Enfin, je ne pourrais pas terminer sans rendre hommage à mes parents, mes frères, la famille de ma sœur ainsi que la famille de ma cousine Elham M. Choufani. Je ne saurais jamais leur témoigner suffisamment toute ma gratitude pour m'avoir toujours soutenu.

Ma profonde gratitude s'adresse aussi au Ministère de l'Éducation du Québec et au Consulat Général du Liban à Montréal pour m'avoir accordé une exemption des frais de scolarité exigés aux étudiants étrangers durant toutes mes études doctorales.

Le support financier de ce travail a été assuré par les subventions de recherche du ICRS (*Institut Canadien de la Recherche en Santé*).

VI- BIBLIOGRAPHIE

ABE Y., NAKAYAMA K., YAMANAKA A., SAKURAI T., et GOTO K. (2000). Subtype-specific trafficking of endothelin receptors. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 8664-71.

ABRAHAM S.T., BENSCOTER H., SCHWORER CM., et SINGER H.A. (1996). In situ Ca^{2+} dependence for activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 2506-13.

ADAM L.P., FRANKLIN M.T., RAFF G.J., et HATHAWAY D.R. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase in porcine carotid arteries. *Circ. Res.* **76**: 183-90.

ALBERTS G.F., PEIFLEY K.A., JOHNS A, KLEHA J.F. et WINKLES J.A. (1994). Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *Journal of Biological Chemistry* **269** :10112-8.

ALIAGA J.C., DESCHENES C., BEAULIEU J.F., CALVO E.L., et RIVARD N. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *American Journal of Physiology* **277**: 631-41.

ALLCOCK G.H., VENEMA R.C., et POLLOCK D.M. (1998). ETA receptor blockade attenuates the hypertension but not renal dysfunction in DOCA-salt rats. *American Journal of Physiology* **275**:245-52.

ARAI H., HORIE S., ARAMORI I., OHKUBO H. et NAKANISHI S. (1990). Cloning and expression of cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**: 730-732.

ARAMORI I. et NAKANISHI S. (1992). Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 12468-74.

ARINAMI T., ISHIKAWA M., INOUE A., YANAGISAWA M., MASAKI T., YOSHIDA M.C., et HAMAGUCHI H. (1991). Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am. J. Human Gen.* **48**: 990-996.

ARNAL J.F., DIHN-XUAN A.T., PUERO M., DARBLADE B. et RAMI J. (1999). Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 1078-1087.

- BADING H., HARDINGHAM G.E., JOHNSON C.M., et CHAWLA S. (1997). Gene regulation by nuclear and cytoplasmic calcium signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 541-3.
- BAKER P.F., HODGKIN A.L., et RIDGWAY E.B. (1971). Depolarisation and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol.* **218**: 709-755.
- BATRA V.K., MCNEIL J.R., XU Y., WILSON T.W., et GOPALKRISTAN V. (1993). ETB receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **264** :479-84.
- BATTISTINI B., D'ORLEANS-JUSTE P., et SIROIS P. (1993). Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.* **68**:600-28.
- BAUTERS C. et ISNER J.M. (1997). The biology of restenosis. *Progress in Cardiovascular Diseases.* **40**:107-16.
- BENCHEKROUN M.T., GROS-LOUIS N., BKAILY G., et D'ORLÉANS-JUSTE P. (1995). R-type calcium channel involved in endothelin-1 induced contraction of newborn rabbit aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26** : 300-2
- BENNETT M.R., EVAN G.I., et SCHWARTZ S.M. (1995). Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **95**: 2266-74.
- BENY J.L. et PACICCA C. (1994). Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *Am. J. Physiol.* **266**: 1465-1472.
- BERRA E., DIAZ-MECO M.T., et MOSCAT J. (1998). The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Biological Chemistry* **273**:10792-7.
- BERRIDGE M.J. (1995). Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays* **17**: 491-500.
- BERTHIAUME N., YANAGISAWA M., LABONTE J. et D'ORLEANS-JUSTE P. (2000). Heterozygous knock-Out of ET(B) receptors induces BQ-123-sensitive hypertension in the mouse. *Hypertension.* **36**: 1002-7.
- BHATTACHARYA M., PERI K., RIBEIRO-DA-SILVA A., ALMAZAN G., SHICHI H., HOU X., VARMA D.R., et CHEMTOB S. (1999). Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **274**:15719-24.

BHOWMICK N., NARAYAN P., et PUETT D. (1999). Identification of ionizable amino acid residues on the extracellular domain of the lutropin receptor involved in ligand binding. *Endocrinology* **140**:4558-63.

BIALECKI R.A., IZZO N.J. JR et COLUCCI W.S. (1989). Endothelin-1 increases intracellular calcium mobilization but not calcium uptake in rabbit vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164** : 474-479.

BIGAUD M. et PELTON J.T. (1992). Discrimination between ETA- and ETB-receptor-mediated effects of endothelin-1 and [Ala1,3,11,15]endothelin-1 by BQ-123 in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **107**: 912-918.

BKAILY G. (1991). Receptor and second messenger modulation of Ca²⁺ and K⁺ channels activity in vascular smooth muscle cells. In: *Ion channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells*. Eds. N. Sperelakis and H. Kuriyama. New York: Elsevier pp: 185-198.

BKAILY G. (ed) (1994). Biophysical and pharmacological properties of T-, L- and R-type Ca²⁺ channels. In: *Ionic Channels in Vascular Smooth Muscle*. R.G. Landes Company, Austin, pp: 9-21.

BKAILY G. (ed) (1994a). Regulation of R-type Ca²⁺ channels by insulin and ET-1 in VSM. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 41-52.

BKAILY G. (ed) (1994b). Regulation of Ca²⁺ channels in VSM by monocyte-released factors. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 53-64.

BKAILY G. (ed) (1994c). The possible role of Ca²⁺ and K⁺ channels in vascular smooth muscle pathophysiology. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle*. Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 103-113.

BKAILY G., CHOUFANI S., HASSAN G., EL-BIZRI N., et D'ORLEANS-JUSTE P. (2000). Presence of functional ET-1 receptors in the nuclear membrane of human vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: 414-417.

BKAILY G., CHOUFANI S., SADER S., JACQUES D. et D'ORLÉANS-JUSTE, P. (2002a). Activation of sarcolemma and nuclear membranes ET-1 receptors regulates transcellular calcium levels in heart and vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (en presse).

BKAILY G., D'ORLEANS-JUSTE P., NAIK R., PERODIN J., STANKOVA J., ABDULNOUR E. et ROLA-PLESZCZYNSKY M. (1993). PAF activation of a voltage-gated R-type Ca^{2+} channel in human and canine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **110** : 519-520.

BKAILY G., D'ORLÉANS-JUSTE P., POTHIER P., CALIXTO J. B., et YUNES R. (1997b). Nuclear membrane receptors and channels : Potential therapeutical targets for drug action. *Drug Dev. Res.* **42** : 211-222.

BKAILY G., ECONOMOS D., POTVIN L., ARDILOUZE J.L., MARRIOTT C., CORCOS J., BONNEAU D., et FONG C.N. (1992). Blockade of insulin sensitive steady-state R-type Ca^{2+} channel by PN 200-110 in heart and vascular smooth muscle. *Mol. Cell Biochem.* **177**: 93-106.

BKAILY G., GROS-LOUIS N., NAIK R., JAALOUK D. et POTHIER P. (1996). Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Mol. Cell Biochem.* **154**: 113-121.

BKAILY G., JACQUES D., D'ORLEANS-JUSTE P., HASSAN G., et CHOUFANI S. (2000c). Using confocal imaging to measure changes in intracellular ions. In: Receptors: A practical approach. *S.C. Stanford and R.W. Horton eds. Oxford University Press.* pp:209-232.

BKAILY G., MASSAAD D., CHOUFANI S., JACQUES D. et D'ORLEANS-JUSTE P. (2002c). Role of the modulation of Cytosolic and Nuclear calcium by nuclear envelope membrane ET-1 receptors in heart cells. *Clinical Science* (en presse).

BKAILY G., NAIK R., JAALOUK D., JACQUES D., ECONOMOS D., D'ORLEANS-JUSTE P. et POTHIER P. (1998). Endothelin-1 and insulin activate the steady-state voltage dependent R-type Ca^{2+} channel in aortic smooth muscle cells via a pertussis toxin and cholera toxin sensitive G-protein. *Mol. Cell Biochem.* **183** : 39-47.

BKAILY G., POTHIER P., D'ORLÉANS-JUSTE P., SIMAAN M., JACQUES D., JAALOUK D., BELZILE F., BOUTIN C., HADDAD G., et NEUGEBAUER W. (1997a). The use of confocal microscopy in the investigation of cell structure and function in heart, vascular endothelium and smooth muscle cells. *Mol. Cell Biochem.* **172** : 171-94.

BKAILY G., SHBAKLO H., TAOUDI BENCHEKROUN M., SADER S., DUVAL M., JACQUES D. et D'ORLEANS-JUSTE P. (2000b). Nitric oxide relaxes the vascular smooth muscle independently of ET-1 and U46619-induced intracellular increase of calcium. *J. cardiovasc. Pharmacol.* **36** : 110-116.

BKAILY G., SLEIMAN S., ASSELIN C., STEPHAN J., CHOUFANI S., JACQUES D. et D'ORLÉANS-JUSTE P. (2002b). Angiotensin II AT₁ receptor internalization and translocation modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *J. British Pharm.* (en presse).

BKAILY G., WANG S., BUI M. et MÉNARD D. (1995). ET-1 stimulates Ca²⁺ currents in cardiac cells. *J. Cardio. Pharmacol.* **26**: 293-296.

BLOCH K.D., FRIEDRICH S.P., LEE M.E., EDDY R.L. et SHOWS T.B. (1989). Quertermous T. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J. Biol. Chem.* **264**: 10851-10857.

BOBIK A., GROOMS A., MILLAR J.A., MITCHELL A. et GRINPUKEL S. (1990). Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **258** : 408- 415.

BOCKAERT J. (1995). Les récepteurs à sept domaines transmembranaires : physiologie et pathologie de la transduction. *Méd Sci* **11** : 382-394.

BOLTON T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* **59**: 606-718.

BOOZ G.W., CONRAD K.M., HESS A.L., SINGER H.A., et BAKER K.M. (1992). Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* **130**:3641-9.

BOUCHER M.J., DUCHESNE C., LAINE J., MORISSET J., et RIVARD N. (2001). cAMP protection of pancreatic cancer cells against apoptosis induced by ERK inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 207-16.

BOULANGER C. et LUSCHER T.F. (1990) Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* **85**:587-90.

BOULANGER C.M., TANNER F.C., BEA M.L., HAHN A.W., WERNER A., et LUSCHER T.F. (1992). Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ. Res.* **70**:1191-7.

BOUSSO-MITTLER D., GALRON R., et SOKOLOVSKY M. (1991). Endothelin/ sarafotoxin receptor heterogeneity: evidence for different glycosylation in receptors from different tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 921-6.

BREMNES T., PAASCHE J.D., MEHLUM A., SANDBERG C., BREMNES B., et ATTRAMADAL H. (2000). Regulation and intracellular trafficking

pathways of the endothelin receptors. *Journal of Biological Chemistry* **275**:17596-604.

BREUILLER-FOUCHE M., HELUY V., FOURNIER T., DALLOT E., VACHER-LAVENU M.C., et FERRE F. (1998). Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured human uterine smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* **4**: 33-9.

BRUNET A., BONNI A., ZIGMOND M.J., LIN M.Z., JUO P., HU L.S., ANDERSON M.J., ARDEN K.C., BLENIS J., et GREENBERG M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**:857-68.

BRUZZI I., REMUZZI G., et BENIGNI A. (1997). Endothelin: a mediator of renal disease progression. *J. Nephrol.* **10**:179-83.

BURNIER M., CENTENO G., BURKI E., et BRUNNER H.R. (1994). Confocal microscopy to analyze cytosolic and nuclear calcium in cultured vascular cells. *Am. J. Physiol.* **266**: 1118-27.

CAIN A.E., TANNER D.M., et KHALIL R.A. (2002). Endothelin-1--induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent $[Ca^{2+}]_i$ sensitization pathways. *Hypertension* **39**: 543-9.

CARAFOLI E., GENAZZANI A., et GUERINI D. (1999). Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* **266**:624-32.

CARAFOLI E., NICOTERA P., et SANTELLA L. (1997). Calcium signalling in the cell nucleus. *Cell Calcium* **22**: 313-9.

CASTELLOT J.J., ADDONIZIO M.L., ROSENBERG R., et KARNOVSKY M.J. (1981). Cultured endothelial cells produce a heparinlike inhibitor of smooth muscle cell growth. *J. Cell. Biol.* **90**: 372-379.

CATTARUZZA M., DIMIGEN C., EHRENREICH H., et HECKER M. (2000). Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB Journal.* **14**:991-8.

CELERMAJER D.S. (1997). Endothelial dysfunction : does it matter? Is it reversible? *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**: 325-333.

CHANDRA S., SARKAR S., ELLIOT J.D., et OHLSTEIN E.H. (1998). Application of magnetic resonance imaging for evaluation of the efficacy of SB 217242 in neointimal formation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**:317-9.

- CHAO T.S., BYRON K.L., LEE K.M., VILLERREAL M., et ROSNER M.R. (1992). Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **267**:19876-83.
- CHUN M., LIYANAGE U.K., LISANTI M.P., et LODISH H.F. (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:11728-32.
- CLOZEL M. et GRAY G.A. (1995). Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: 262-4.
- CLOZEL M., GRAY G.A., BREU V., LOFFLER B.M., et OSTERWALDER R. (1992). The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186**: 867-873.
- CODY R.J. (1992). The potential role of endothelin as a vasoconstrictor substance in congestive heart failure. *Eur. Heart J.* **13**:1573-8.
- COWLEY S., PATERSON H., KEMP P., et MARSHALL C.J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**: 841-52.
- CRISTOL J.P., WARNER T.D., THIEMERMANN C., et VANE J.R. (1993). Mediation via different receptors of the vasoconstrictor effects of endothelins and sarafotoxins in the systemic circulation and renal vasculature of the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **108**: 776-779.
- CZUBRYT M.P., RAMJIWAN B., GILCHRIST J.S.C., MASSAELI H., et PIERCE G.N. (1996). The presence and partitioning of calcium binding proteins in hepatic and cardiac nuclei. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**: 455-465.
- D'ORLÉANS-JUSTE P., GRATTON J.P., BKAILY G. et CLAING A. (1996). L'endothéline : de la pharmacologie moléculaire à ses implications en physiopathologie. *Med. Sci.* **12** : 563-574.
- DASHWOOD M.R., BARKER S.G., MUDDLE J.R., YACOUB M.H., et MARTIN J.F. (1993). [125I]-endothelin-1 binding to vasa vasorum and regions of neovascularization in human and porcine blood vessels: a possible role for endothelin in intimal hyperplasia and atherosclerosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**: 343-7.
- DAVIES M.J. (1996). Stability and instability : two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* **94**: 2013-20.

- DAVIES P.F., GANZ P., et DIEHL P.S. (1985). Reversible microcarrier-mediated junctional communication between endothelial and smooth muscle cell monolayers: an in vitro model of vascular cell interactions. *Lab. Invest.* **85**: 710-718.
- DAVIES P.F., OLESEN S.P., CLAPHAM D.E., MORREL E.M., et SCHOEN F.J. (1988). Endothelial communication: state of the art lecture. *Hypertension* **11**: 563-572.
- DE NUCCI G., THOMAS R., D'ORLÉANS-JUSTE P., ANTUNES E., WALDER C., WARNER T.D. et VANE J.R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited in its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9797-9800.
- DEFEA K.A., ZALEVSKY J., THOMA M.S., DERY O., MULLINS R.D., et BUNNETT N.W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell. Biol.* **148**: 1267-81.
- DENAULT J.B., CLAING A., D'ORLEANS-JUSTE P., SAWAMURA T., KIDU T., MASAKI T., et LEDUC R. (1995). Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.* **362**: 276-280.
- DERIJARD B., HIBI M., WU I.H., BARRETT T., SU B., DENG T., KARIN M., et DAVIS R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-37.
- DESCHENES C., VEZINA A., BEAULIEU J.F., et RIVARD N. (2001). Role of p27^{Kip1} in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**: 423-438.
- DINGWALL C. (1991). Transport across the nuclear envelope: enigmas and explanations. *Bioessays* **13**: 213-8.
- DIPOLO R. (1979). Calcium influx in internally dialysed squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* **73**: 91-113.
- DIVECHA N. et IRVINE R.F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* **80**:269-78.
- DODGE A.B., LU X., ET D'AMORE P.A. (1993). Density-dependent endothelial cell production of an inhibitor of smooth muscle cell growth. *J. Cell. Biochem.* **53**: 21-31.

DOOHAN M.M. et RASMUSSEN H.H. (1993). Myocardial cation transport. *J. Hypertension* **11**: 683-691.

DOUGLAS S.A. et OHLSTEIN E.H. (1997). Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *Journal of Vascular Research*. **34**: 152-64.

DOUGLAS S.A., BECK G.R., ELLIOTT J.D., et OHLSTEIN E.H. (1995). Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.* **114**: 1529-1540.

DOUGLAS S.A., LOUDEN C., VICKERY-CLARK L.M., STORER B.L., HART T., FEUERSTEIN G.Z., ELLIOTT J.D., et OHLSTEIN E.H. (1994). A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circulation Research* **75**: 190-71.

DUBEY R.K., GILLESPIE D.G., IMTHURN B., ROSSELLI M., JACKSON E.K., et KELLER P.J. (1999). Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* **33**: 177-82.

DUPUIS D.S. et PAUWELS P.J. (2001). Diversité de signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G. *Médecine Sciences* **17** : 320-6.

DUPUIS J., GORESKY C.A., et FOURNIER A. (1996). Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *Journal of Applied Physiology* **8**: 1510-5.

EBIHARA Y., HAIST J., et KARMAZYN M. (1996). Modulation of endothelin effects on rat hearts and cardiomyocytes by nitric oxide and 8-bromo cyclic GMP. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**: 265-277.

EGUCHI S., HIRATA Y., IMAI T., et MARUMO F. (1993). Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* **132** : 524-9.

EMORI T., HIRATA Y., IMAI T., OHTA K., KANNO K., EGUCHI S., et MARUMO F. (1992). Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 2409-11.

EUDE I., PARIS B., CABROL D., FERRE F., et BREUILLER-FOUCHE M. (2000). Selective protein kinase C isoforms are involved in endothelin-1-

induced human uterine contraction at the end of pregnancy. *Biol. Reprod.* **63**: 1567-73.

FELETOU M. et VANHOUTTE P.M. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **93**: 515-24.

FILIPPATOS G.S., GANGOPADHYAY N., LALUDE O., PARAMESWARAN N., SAID S.I., SPIELMAN W., et UHAL B.D. (2001). Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **281**: 749-61.

FIRPO E.J., KOFF A., SOLOMON M.J., et ROBERTS J.M. (1994). Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Molecular & Cellular Biology* **14**: 4889-901.

FISHER R.P. et MORGAN D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**: 713-24.

FOX, A.P., NOWYCKY M.C., et TSIEN R.W. (1987). Single-channel recording of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J. Physiol.* **394**: 173-200.

FRANK H.J., LEVIN E.R., HU R.M., et PEDRAM A. (1993). Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **133**: 1092-7.

FRELIN C. (1991). Mechanisms of vasoconstriction. *Am. Heart J.* **121**:958-960.

FRISCH S.M. (1999). Methods for studying anoikis. In: *Methods in Molecular Biology: Integrin Protocols*, edited by Howlett AR. Totowa, NJ: Humana, **129**: 251-256.

FRISCH SM. et FRANCIS H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology* **124**: 619-26.

FUJITANI Y. et BERTRAND C. (1997). ET-1 cooperates with EGF to induce mitogenesis via a PTX-sensitive pathway in airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **272**: 1492-8.

FUJITANI Y., NINOMIYA H., OKADA T., URADE Y., et MASAKI T. (1995). Suppression of endothelin-1-induced mitogenic responses of human aortic smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *J. Clin. Invest.* **95**: 2474-82.

FUKURODA T., FUJIKAWA T., OZAKI S., ISHIKAWA K., YANO M., et NISHIKIBE M. (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 1461-5.

FURCHGOTT R.F. (1983). Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* **53**: 557-573.

FURCHGOTT R.F. et VANHOUTTE P.M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB* **3**: 2007-2018.

FURCHGOTT R.F. et ZAWADZKI J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.

GARDINER S.M., COMPTON A.M., KEMP P.A., et BENNETT T. (1990). Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bardenkinin and endothelin in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 632-9.

GARDNER A.M. et JOHNSON GL. (1996). Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 14560-6.

GAUTHIER R., HARNOIS C., DROLET J.F., REED J.C., VEZINA A., et VACHON P.H. (2001). Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am.J. Physiol. Cell. Physiol.* **280**: 1540-1554.

GERASIMENKO O.V., GERASIMENKO J.V., TEPIKIN A.V., et PETERSON O.H. (1995). ATP-dependent accumulation and inositol triphosphate or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell* **80**: 439-444.

GHEORGHIU I., DESCHÊNES C., BLAIS M., BOUDREAU F., RIVARD N. et ASSELIN C., (2001). Role of specific CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *J. Biological Chemistry* **276**: 44331-44337.

GIAID A., YANAGISAWA M., LANGLEBEN D., MICHEL R.P., LEVY R., SHENNIB H., KIMURA S., MASAKI T., DUGUID W.P., et STEWART D.J. (1993). Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **328**: 1732-9.

GILCHRIST J.S.C., CZUBRYT M.P., et PIERCE G.N. (1994). Calcium and calcium-binding protein in the nucleus. *Mol. Cell. Biochem.* **135**: 79-88.

GOLOMB G., FISHBEIN I., BANAI S., MISHALY D., MOSCOVITZ D., GERTZ S.D., GAZIT A., PORADOSU E., et LEVITZKI A. (1996). Controlled delivery of a tyrophostin inhibits intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *Atherosclerosis* **125**: 171-82.

GOTO K., HIROSHI H., et KASUYA Y. (1996). Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn. J. Pharmacol.* **72**: 261-290.

GRAY G.A. et WEBB D.J. (1996). The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* **72**: 109-148.

GREBER U.F. et GERACE L. (1992). Nuclear protein import is inhibited by an antibody to a luminal epitope of a nuclear pore complex glycoprotein. *J. Cell. Biol.* **116**: 15-30.

GRIENGLING K.K. et ALEXANDER R.W. (1996). Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* **10**: 283-292.

GRIENGLING K.K., TSUDA T., et ALEXANDER R.W. (1989). Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 8237-40.

GUARDA E., KATWA L.C., MYERS P.R., TYAGI S.C., et WEBER K.T. (1993). Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research* **27**: 2130-4.

GUTKIND J.S. (1998). Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* **17**: 1331-42.

GYRNKIEWICK G., POENI M., et TSEIN R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.

HAFIZI S., ALLEN S.P., GOODWIN A.T., CHESTER A.H., et YACOUB M.H. (1999). Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis* **146**: 351-9.

HAHN A.W., REGENASS S., KERN F., BUHLER F.R., et RESINK T.J. (1993). Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin II and endothelin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**: 189-97.

HALLER H. (1997). Endothelial function: general considerations. *Drugs* **53**: 1-10.

HALLER H., LINDSCHAU C., ERDMANN B., QUASS P., et LUFT F.C. (1996). Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Cir. Res.* **79**: 765-772.

HALLER H., LINDSCHAU C., QUASS P., DISTLER A., et LUFT F.C. (1994). Nuclear calcium signalling is initiated by cytosolic calcium surges in vascular smooth muscle cells. *Kidney. Intern.* **46**: 1653-62.

HAMBERG M., SVENSSON J., et SAMUELSSON B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**: 2994-8.

HAN D.K., HAUDENSCHILD C.C., HONG M.K., TINKLE B.T., LEON M.B., et LIAU G. (1995). Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am. J. Pathol.* **147**: 267-77.

HAN J., LEE J.D., BIBBS L., et ULEVITCH R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**: 808-11.

HARDINGHAM GE., CHAWLA S., JOHNSON C.M., et BADING H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* **385**: 260-5.

HASSAN G. (2001). Présence des jonctions de type Gap dans les cellules endothéliales et les cellules du MLVh et leur contribution à la modulation du calcium intracellulaire. Thèse de Ph.D. *Université de Sherbrooke*.

HASSELBACH W. (1964). Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **14**: 167-222.

HAUG C., VOISARD R., LENICH A., BAUR R., HOHER M., OSTERHUES H., HANNEKUM A., VOGEL U., MATTFELDT T., HOMBACH V., et GRUNERT A. (1996). Increase endothelin release by cultures human smooth muscle cells from atherosclerotic coronary arteries. *Cardiovasc. Res.* **31**: 807-13.

HAUNSTETTER A. et IZUMO S. (1998). Apoptosis : Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Cir. Res.* **82**: 1111-1129.

HAY D.W., LUTTMANN M.A., PULLEN M.A., et NAMBI P. (1998). Functional and binding characterization of endothelin receptors in human

bronchus: evidence for a novel endothelin B receptor subtype? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 669-77.

HAYNES W.G. et WEBB D.J. (1994). Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* **344**: 852-4.

HAYNES W.G., FERRO C.J., O'KANE K.P., SOMERVILLE D., LOMAX C.C., et WEBB D.J. (1996). Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* **93**: 1860-1870.

HE J.Q., PI Y., WALKER J.W., et KAMP T.J. (2000). Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type Ca^{2+} current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* **524**: 807-20.

HENNAGER D.J., WELSH M.J., et DELISLE S. (1995). Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear Ca^{2+} concentration. *J. Biol. Chem.* **270**: 4959-62.

HERNANDEZ-CRUZ A., SALA F., et ADAMS P.R. (1990). Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science* **247**: 858-862.

HICKEY K.A., RUBANYI G., PAUL R.J., et HIGHEMITH R.F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **248** : 550.

HIMPENS B., DESMEDT H., DROOGMANS G., et CASTEELS R. (1992). Difference in regulation between nuclear and cytoplasmic Ca^{2+} in cultured smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **263**: 95-105.

HIMPENS B., DESMEDT H., et CASTEELS R. (1994). Relationship between $[Ca^{2+}]_i$ changes in nucleus and cytosol. *Cell Calcium* **16**: 239-246.

HIRATA M., HAYASHI Y., USHIKUBI F., YOKOTA Y., KAGEYAMA R., NAKANISHI S., et NARUMIYA S. (1991). Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature* **349**: 617-20.

HIRATA Y., TAKAGI Y., FUKUDA Y., et MARUMO F. (1989). Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **78**: 225-228.

HIRSHI K.K., ROHOVSKY S.A., BECK L.H., SMITH S.R., et D'AMORE P.A (1999). Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ. Res.* **84**: 298-305.

HUIZINGA J.D., LIU L.W.C., BLENNERHASSETT M.G., THUNEBERG L., et MOLLEMAN A. (1992). Intercellular communication in smooth muscle. *Experientia* **48**: 932-941.

HUNEIDI A.H., THIEMERMANN C., LIDBURY P.S., D'ORLEANS-JUSTE P., ANGGARD E.E., AFSHAR F., et VANE J.R. (1991). Endothelin-1 and big endothelin cause subarachnoid hemorrhage in the anesthetized rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**: 492-5.

HUTCHESON I.R., CHAYTOR A.T., EVAN W.H., et GRIFFITH T.M. (1999). Nitric oxide-independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication: role of gap junctions and phospholipase A₂. *Circ. Res.* **84**: 53-63.

IBORRA F.J., JACKSON D.A., et COOK P.R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* **293**:1139-42.

IHARA M., NOGUCHI K., SAEKI T., FUKURODA T., TSUCHIDA S., KIMURA S., FUKAMI T., ISHIKAWA K., NISHIKIBE M., et YANO M. (1992). Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* **50**: 247-55.

INDOLFI C., ESPOSITO G., DI LORENZO E., RAPACCIUOLO A., FELICIELLO A., PORCELLINI A., AVVEDIMENTO V.E., CONDORELLI M., et CHIARIELLO M. (1995). Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation* **92**: 1230-5.

INOUE A., YANAGISAWA M., KIMURA S., KASUYA Y., MIYAUCHI T., GOTO K., et MASAKI T. (1989a). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2863-2867.

INOUE, A., YANAGISAWA M., TAKUWA Y., MITSUI Y., KOBAYASHI M., et MASAKI T. (1989b). The human preproendothelin 1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.* **264**: 14954-14959.

ISHIKAWA K., IHARA M., NOGUCHI K., MASE T., MINO N., SAEKI T., FUKURODA T., FUKAMI T., OZAKI S., NAGASE T., NISHIKIBE M., et YANO M. (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 4892-6.

ITOH Y., YANAGISAWA M., OHKUBO S., KIMURA C., KOSATA T., INOUE A., ISHIDA N., MITSUI Y., ONDA H., FUJINO M., et MASAKI T. (1988). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelin-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS lett.* **231**: 440-444.

IWASA S., FAN J., SHIMOKAMA T., NAGATA M., et WATANABE T. (1999). Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. *Atherosclerosis* **146**: 93-100.

JAMES T.N. (1994). Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation* **90**: 556-573.

JAMES T.N. (1998). Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. s. *Ann. Rev. Physiol.* **60**: 309-325.

KAHAN C., SEUWEN K., MELOCHE S., et POUYSSEGUR J. (1992). Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition.. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 13369-75.

KANAIDE H. (1996). Endothelin Regulation of vascular tone. *Gen. Pharmacol.* **27**: 559-563.

KANSE SM, TAKAHASHI K, WARREN JB, PERERA T, PORTA M, GHATEI M, et BLOOM SR. (1991). Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17** : 113-6.

KARAKI H. et WEISS G.B. (1988). Calcium release in smooth muscle. *Life Science* **42**: 111-22.

KARNE S., JAYAWICKREME C.K., et LERNER M.R. (1993). Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **268**: 19126-19133.

KATAYOSE Y., KIM M., RAKKAR A.N., LI Z., COWAN K.H., et SETH P. (1997). Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res.* **57**: 5441-5.

KAWANABE Y., HASHIMOTO N., et MASAKI T. (2001). B103 neuroblastoma cells predominantly express endothelin ET(B) receptor; effects of extracellular Ca(2+) influx on endothelin-1-induced mitogenesis. *Eur J Pharmacol.* **425**:173-9.

KEDZIERSKI R.M. et YANAGISAWA M. (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **41**: 851-76.

KIOWSKI W, SUTSCH G, HUNZIKER P, MULLER P, KIM J, OECHSLIN E, SCHMITT R, JONES R. et BERTEL O. (1995). Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* **346**: 732-6.

KLUCK R.M., MCDUGALL C.A., HARMON B.V., et HALLIDAY J.W. (1994). Calcium chelators induce apoptosis--evidence that raised intracellular ionised calcium is not essential for apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1223** : 247-54.

KOCKX M.M. et HERMAN A.G. (2000). Apoptosis in atherosclerosis : Beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.* **45**: 736-746.

KOHNO M, HORIO T, YOKOKAWA K, KURIHARA N, et TAKEDA T. (1992b) C-type natriuretic peptide inhibits thrombin- and angiotensin II-stimulated endothelin release via cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Hypertension.* **19**:320-5.

KOHNO M., HORIO T., IKEDA M., YOKOKAWA K., FUKUI T., YASUNARI K., KURIHARA N., et TAKEDA T. (1992a). Angiotensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* **42**: 860-6.

KOPPLER P., MATTER N., et MALVIYA A.N. (1993). Evidence for stereospecific inositol 1,3,4,5-[³H]-tetrakisphosphate binding sites on rat liver nuclei. Delineating inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate interaction in nuclear calcium signaling process. *J. Biol. Chem.* **268**: 26248-26252.

KOWALA M.C., ROSE P.M., STEIN P.D., GOLLER N., RECCE R., BEYER S., VALENTINE M., BARTON D., et DURHAM S.K. (1995). Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am. J. Pathol.* **146**: 819-26.

KOYAMA H., RAINES E.W., BORNFELDT K.E., ROBERTS J.M., et ROSS R. (1996). Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* **87**: 1069-78.

KRUM H., VISKOPER R.J., LACOURCIERE Y., BUDDÉ M., et CHARLON V. (1998). The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N. Engl. J. Med.* **338**: 784-90.

KURIHARA H., KURIHARA Y., MAEMURA K. et YAZAKI Y. (1997). The role of endothelin-1 in cardiovascular development. *Ann N Y Acad Sci* **811** : 168-76.

KURIHARA H., YOSHIZUMI M., SUGIYAMA T., TAKAKU F., YANAGISAWA M., MASAKI T., HAMAOKI M., KATO H., et YAZAKI Y. (1989). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 1435-40.

KYRIAKIS J.M., BANERJEE P., NIKOLAKAKI E., DAI T., RUBIE E.A., AHMAD M.F., AVRUCH J., et WOODGETT J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**: 156-60.

LADHA M.H., LEE K.Y., UPTON T.M., REED M.F., et EWEN M.E. (1998). Regulation of exit from quiescence by p27 and cyclin D1-CDK4. *Molecular & Cellular Biology* **18**: 6605-15.

LAINÉ J., BOURGOIN S., BOURASSA J., et MORISSET J., (2000). Subcellular distribution and characterization of rat pancreatic phospholipase D isoforms. *Pancreas* **20**: 323-336.

LANGER G.A. (1992). Calcium and the heart: exchange at the tissue cell and organelle levels. *FASEB J.* **6**: 893-902.

LARIVIERE R., SVENTEK P., THIBAUT G., et SCHIFFRIN E.L. (1995). Endothelin-1 expression in blood vessels of DOCA-salt hypertensive rats treated with the combined ETA/ETB endothelin receptor antagonist bosentan. *Can J Physiol Pharmacol.* **73**: 390-8.

LEE H.J., CHUN M., et KANDROR K.V. (2001). Tip60 and HDAC7 interact with the endothelin receptor a and may be involved in downstream signaling. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 16597-60.

LENORMAND P., BRONDELLO J.M., BRUNET A., et POUYSSEUR J. (1998). Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *Journal of Cell Biology* **142**: 625-33.

LEVIN E.R. (1995). Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **333**: 356-63.

LEVY B. et MARTINEAUD J.P. (1993). Circulation. In: Anatomie et physiologie humaines. Ed: Marieb, E.M. Éditions du Renouveau. pp 198-210.

LIN H., KAJI E.H., WINKEL G.K., et LODFISH H.E. (1991). Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 3185-3189.

LIPP P. et NIGGLI E. (1993). Ratiometric confocal Ca^{2+} -measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes. *Cell Calcium* **14**: 359-72.

LU D., YANG H., SHAW G., et RAIZADA M.K. (1998). Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology* **139**: 365-75.

LUSCHER T.F. et WENZEL R.R. (1995). Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications. *Agents Actions Suppl.* **45**: 237-253.

LUTTRELL L.M., DAAKA Y., et LEFKOWITZ R.J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein -coupled receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 177-183.

MACNULTY E.E., PLEVIN R., et WAKELAM M.J. (1990). Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for Rat-1 fibroblasts. *Biochem. J.* **272**: 761-6.

MAGGI C.A., GUILIANI S., PATACCHINI R., SANTICIOLI P., GIACHETTI A., et MELI A. (1990). Further studies on the response of the guinea-pig bronchus to endothelins and sarafotoxin S6B. *Eur. J. Pharmacol.* **176**: 1-9.

MALLAT A., FOUASSIER L., PREAUX A.M., GAL C.S., RAUFASTE D., ROSENBAUM J., DHUMEAUX D., JOUNEAUX C., MAVIER P., et LOTERSZTAJN S. (1995). Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *Journal of Clinical Investigation* **96**: 42-9.

MALVIYA A.N., ROGUE P., et VINCENDON G. (1990). Stereospecific inositol 1,4,5- $[^{32}P]$ triphosphate binding to isolated rat liver: Evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 9270-9274.

MARINISSEN M.J. et GUTKIND J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* **22**: 368-76.

MARKS A.R. (1992). Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation* **86**: 61-67.

MARSAULT R., FEOLDE E., et FRELIN C. (1993). Receptor externalization determines sustained contractile responses to endothelin-1 in the rat aorta. *American Journal of Physiology* **264**: 687-93.

MARTIN-NIZARD F., HOUSSAINI H.S., LESTAVEL-DELATTRE S., DURIEZ P., et FRUCHART J.C. (1991). Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS Lett.* **293**: 127-30.

MASAKI T. (1993). Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endo. Rev.* **14**: 256-268.

MASAKI T. (1998). The discovery of endothelins. *Cardiovasc. Res.* **39**: 530-533.

MASON R.P. (1999). Calcium channel blockers, apoptosis and cancer: is there a biologic relationship? *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**: 1857-66.

MATSUKAWA Y., MARUI N., SAKAI T., SATOMI Y., YOSHIDA M., MATSUMOTO K., NISHINO H., et AOIKE A. (1993). Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res.* **53**: 1328-31.

MATSUSHIME H., QUELLE D.E., SHURTLEFF S.A., SHIBUYA M., SHERR C.J., et KATO J.Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular & Cellular Biology* **14**: 2066-76.

MATTER N., RITZ M.F., FREYERMUTH S., ROGUE P., et MALVIYA A.N. (1993). Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* **268**: 732-6.

MCDONALD P.H., CHOW C.W., MILLER W.E., LAPORTE S.A., FIELD M.E., LIN F.T., DAVIS R.J., et LEFKOWITZ R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**: 1574-7.

MCMAHON E.G., PALOMO M.A., MOORE W.M., MCDONALD J.F., et 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. U S A* **88**: 703-7.

- MCPHERSON P.S., KAY B.K., et HUSSAIN N.K. (2001). Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* **2**: 375-84.
- MEANS A.R. (1994). Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. *FEBS Letters* **347**: 1-4.
- MIHARA S. et FUJIMOTO M. (1992). Non-isopeptide-selective endothelin receptors in human Girardi heart cells. *Life Sci.* **50**: 219-26.
- MILLER R.C., PELTON J.T., et HUGGINS J.P. (1993). Endothelins: from receptors to medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 54-60.
- MITANI H., TAKIMOTO M., BANDO H., et KIMURA M. (2000). Increases of vascular endothelin-converting enzyme activity and endothelin-1 level on atherosclerotic lesions in hyperlipidemic rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* **387**: 313-9.
- MIYAUCHI T. et MASAKI T. (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annual Review of Physiology* **61**: 391-415.
- MIYAWAKI A., GRIESBECK O., HEIM R., et TSIEN R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 2135-40.
- MIYAZAKI S. (1995). Inositol trisphosphate receptor mediated spatiotemporal calcium signalling. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **7**: 190-196.
- MIZUGUCHI T, NISHIYAMA M, MOROI K, TANAKA H, SAITO T, MASUDA Y, MASAKI T, DE WIT D, YANAGISAWA M, et KIMURA S. (1997). Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br. J. Pharmacol.* **120**: 1427-30.
- MONCADA S., GRYGLEWSKI R., BUNTING S. et VANE J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-5.
- MORELAND S., MCMULLEN D.M., DELANEY C.L., LEE V.G., et HUNT J.T. (1992) Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 100-6.
- MORGAN D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 261-91.
- MOSES S., DREJA K., LINDQVIST A., LOVDAHL C., HELLSTRAND P., et HULTGARDH-NILSSON A. (2001). Smooth muscle cell response to

mechanical injury involves intracellular calcium release and ERK1/ERK2 phosphorylation. *Experimental Cell Research* **269**: 88-96.

MUELLER H. (1966). Effect of Bailey's tropomyosin purification on EGTA-sensitizing activity. *Nature* **209** :1128-9.

NAMBI P., KUMAR C., et OHLSTEIN E.H. (1995). Signal transduction processes involved in endothelin-mediated responses. In: *Endothelin receptors*.

NAMIKI A., HIRATA Y., ISHIKAWA M., MOROI M., AIKAWA J., et MACHII K. (1992). ET-1 and ET-3 induce vasorelaxation via common generation of endothelium-derived nitric oxide. *Life Sci.* **50**: 677-682.

NEVINS J.R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424-9.

NICOTERA P., ZHIVOTOVSKY B., et ORRENIUS S. (1994). Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* **16**: 279-288.

NIGGLI E. et LEDERER W.J. (1991). Real-time confocal microscopy and calcium measurements in heart muscle cells: towards the development of a fluorescence microscope with high temporal and spatial resolution. *Cell Calcium* **11**: 121-30.

NIGGLI E., PISTON D.W., KIRBY M.S., CHENG H., SANDISON D.R., WEBB W.W., et LEDERER W.J. (1994). A confocal laser scanning microscope designed for indicators with ultraviolet excitation wavelengths. *Am. J. Physiol.* **266**: 303-10.

NILSSON H., JENSEN P.E., et MULVANY M.J. (1994). Minor role for direct adrenoreceptor-mediated calcium entry in rat mesenteric small arteries. *J. Vasc. Res.* **31**: 314-21.

NISHIZUKA Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-8.

NOURSE J., FIRPO E., FLANAGAN W.M., COATS S., POLYAK K., LEE M.H., MASSAGUE J., CRABTREE G.R., et ROBERTS J.M. (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* **372**: 570-3.

OBERHOFF M., NOVAK S., HERDEG C., BAUMBACH A., KRANZHÖFER A., BOHNET A., HORCH B., HANKE H., HAASE K.K., et KARSCH K.R.. (1998). Local and systemic delivery of low molecular weight

heparin stimulates the reendothelialization after balloon angioplasty. *Cardiovas. Res.* **38**: 751-762.

ODA K., FUJITANI Y., WATAKABE T., INUI T., OKADA T., URADE Y., OKUDA-ASHITAKA E., et ITO S. (1992). Endothelin stimulates both cAMP formation and phosphatidylinositol hydrolysis in cultured embryonic bovine tracheal cells. *FEBS Lett.* **299** : 187-91.

OHLSTEIN E.H., NAMBI P., HAY D.W., GELLAI M., BROOKS D.P., LUENGO J., XIANG J.N., et ELLIOTT J.D. (1998). Nonpeptide endothelin receptor antagonists. XI. Pharmacological characterization of SB 234551, a high-affinity and selective nonpeptide ETA receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**: 650-6.

OHTSUBO M. et ROBERTS JM. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* **259**: 1908-12.

OHTSUBO M., THEODORAS A.M., SCHUMACHER J., ROBERTS J.M., et PAGANO M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular & Cellular Biology* **15**: 2612-24.

OKSCHE A., BOESE G., HORSTMAYER A., FURKERT J., BEYERMANN M., BIENERT M., et ROSENTHAL W. (2000). Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Molecular Pharmacology* **57**: 1104-13.

OPGENORTH T.J., WESSALE J.L., DIXON D.B., ADLER A.L., CALZADILLA S.V., PADLEY R.J., et WU-WONG J.R. (2000). Effects of endothelin receptor antagonists on the plasma immunoreactive endothelin-1 level. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **36**: 292-6.

PAASCHE J.D., ATTRAMADAL T., SANDBERG C., JOHANSEN H.K., et ATTRAMADAL H. (2001). Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 34041-50.

PACHER P., CSORDA G., et HAJNOCZKY G. (2001). Mitochondrial Ca²⁺ signaling and cardiac apoptosis. *Biol. Signals Recept.* **10**: 200-223.

PAGES G., LENORMAND P., L'ALLEMAIN G., CHAMBARD J.C., MELOCHE S., et POUYSSEGUR J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 8319-23.

PALMER R.M.J., FERRIGE A.G., et MONCADA S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.

PANETTIERI R.A. JR., GOLDIE R.G., RIGBY P.J., ESZTERHAS A.J., et HAY D.W. (1996). Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 191-7.

PANG D.C., JOHNS A., PATTERSON K., BOTELHO L.H., et RUBANYI G.M. (1989). Endothelin-1 stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and calcium uptake in isolated canine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**: 75-9.

PEREZ-TERZIC C., STEHNO-BITTEL L., et CLAPHAM D.E. (1997). Nucleoplasmic and cytoplasmic differences in the fluorescence properties of the calcium indicator Fluo-3. *Cell Calcium* **21**: 275-82.

PETKOVA SB., ASHTON A., BOUZAHZAH B., HUANG H., PESTELL R.G., et TANOWITZ H.B. (2000). Cell cycle molecules and diseases of the cardiovascular system. *Frontiers in Bioscience* **5**: 452-60.

PEUNOVA N. et ENIKOLOPOV G. (1993). Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* **364**: 450-453.

POLLOCK D.M., KEITH T.L., et HIGHSMITH R.F. (1995). Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.* **9**: 1196-1204.

POLLOCK D.M., KEITH T.L., et HIGHSMITH R.F. (1995). Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.* **9**: 1196-204.

POUYSSÉGUR J. (2000). Signal transduction. An arresting start for MAPK. *Science* **290**: 1515-8.

PRAT L., TORRES G., CARRIO I., ROCA M., RIAMBAU V., BERNA L., ESTORCH M., FERRER I., et GARCIA C. (1993). Polyclonal ¹¹¹In-IgG, ¹²⁵I-LDL and ¹²⁵I-endothelin-1 accumulation in experimental arterial wall injury. *Eur. J. Nucl. Med.* **20**: 1141-5.

PRINS B.A., HU R.M., NAZARIO B., PEDRAM A., FRANK H.J., WEBER M.A., et LEVIN E.R. (1994). Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 11938-44.

- PYLES J.M., MARCH K.L., FRANKLIN M., MEHDI K., WILENSKY R.L., et ADAM L.P. (1997). Activation of MAP kinase in vivo follows balloon overstretch injury of porcine coronary and carotid arteries. *Circ. Res.* **81**: 904-10.
- RAY L.B. et STURGILL T.W. (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**: 1502-6.
- REDMOND E.M., CAHILL P.A., HODGES R., ZHANG S., et SITZMANN J.V. (1996). Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **166**: 469-79.
- REED J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**: 3225-3236.
- REMBOLD C.M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* **20**: 129-137.
- RIVARD N., L'ALLEMAIN G., BARTEK J., et POUYSSEGUR J. (1996). Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 18337-41.
- ROBINSON M.J. et COBB M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 180-6.
- ROSENDORFF C. (1996). Endothelin, vascular hypertrophy, and hypertension. *Cardiov. Drugs Ther.* **10**: 795-802.
- ROSS R. (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340** : 115-26.
- ROUSE J., COHEN P., TRIGON S., MORANGE M., ALONSO-LLAMAZARES A., ZAMANILLO D., HUNT T., et NEBREDA A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**: 1027-37.
- RUBANYI G.M. (1991). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J. Cell. Biochem.* **46**: 27-36.
- RUBANYI G.M. et POLOKOFF M.A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**: 325-415.

RUETTEN H. et THIEMERMANN C. (1997). Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J. Physiol. Pharmacol.* **48**: 675-88.

RYAN U.S. et RYAN J.W. (1984). Cell biology of pulmonary endothelium. *Circulation* **70** : 46-62.

SAINI K.S. et WALKER N.I. (1998). Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Molecular & Cellular Biochemistry* **178**: 9-25.

SAKAI S., MIYAUCHI T., KOBAYASHI M., YAMAGUCHI I., GOTO K., et SUGISHITA Y. (1996). Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* **384**: 353-5.

SAKAMOTO A., YANAGISAWA M., SAKURAI T., TAKUWA Y., YANAGISAWA H., et MAZAKI 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., et MASAKI T. (1992). Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 103-108.

SAKURAI T., YANAGISAWA M., TAKUWA Y., MIYAZAKI H., KIMURA S., GOTO K., et MASAKI T. (1990). Cloning of cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**: 732-735.

SALEH D., FURUKAWA K., TSAO M.S., MAGHAZACHI A., CORRIN B., YANAGISAWA M., BARNES P.J., et GIAID A. (1997). Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **16**: 187-93.

SAMAIN E., BOUILLIER M., MISEREY S., PERRET C., RENAUD J.F., SAFA M., et DAGHER G. (2000). Extracellular signal-regulated kinase pathway is involved in basic fibroblast growth factor effect on angiotensin II-induced Ca^{2+} transient in vascular smooth muscle cell from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**: 61-67.

SANTELLA L. (1996). The cell nucleus: An eldorado to future calcium research? *J. Memb. Biol.* **153**: 83-92.

SAWAMURA T., KIMURA S., SHINMI O., SUGITA Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., YANAGISAWA M., GOTO K., et MASAKI T. (1990).

Characterization of endothelin converting enzyme activities in soluble fraction of bovine cultured endothelial cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **169**: 1138-44.

SCHINDLER M. et JIANG L.W. (1986). Nuclear actin and myosin as control elements in nucleocytoplasmic transport. *J. Cell. Biol.* **102**: 859-62.

SCOTT-BURDEN T. et VANHOUTTE P.M. (1993). The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* **87**: 51-55.

SHANNON T.R. et HALE C.C. (1994). Identification of a 65 kDa endothelin receptor in bovine cardiac sarcolemmal vesicles. *Eur. J. Pharmacol.* **267**: 233-8.

SHARIFI A.M. et SCHIFFRIN E.L. (1997). Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *Journal of Hypertension* **15**: 1441-8.

SHBAKLO H. (2001). Rôle modulateur de l'oxyde nitrique dans la vasoconstriction et l'élévation du calcium intracellulaire induites par l'endothéline-1 et le thromboxane A₂ dans des vaisseaux humains et de lapins. Thèse de Ph.D. *Université de Sherbrooke*.

SHEPRO D. et D'AMORE P.A. (1984). Physiology and biochemistry of the vascular wall endothelium. In: *Handbook of Physiology, The microcirculation*. Eds: Renkin, E.M. and C.C. Michel . American Physiological Society, Washington, D.C. pp: 103.

SHERR C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-65.

SHERR C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551-5.

SHERR C.J. et Roberts J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* **9**: 1149-63.

SHERR C.J. et Roberts J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* **13**:1501-12.

SHICHIRI M., KATO H., DOI M., MARUMO F., et HIRATA Y. (1999). Induction of max by adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide antagonizes endothelial apoptosis. *Molecular Endocrinology* **13**: 1353-63.

SHICHIRI M., KATO H., MARUMO F., et HIRATA Y. (1997). Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* **30**: 1198-203.

- SHICHIRI M., YOKOKURA M., MARUMO F., et HIRATA Y. (2000). Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20** : 989-97.
- SHIMODA L.A., SYLVESTER J.T., et SHAM J.S. (1998). Inhibition of voltage-gated K⁺ current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. *Am. J. Physiol.* **274**: 842-53.
- SHORT A.D., BIAN J., GHOSH T.K., WALDRON R.T., RYBAK S.L., et GILL D.L. (1993). Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 4986-90.
- SIMONSON M.S. (1993). Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev.* **73**: 375-411.
- SIMONSON M.S. et ROONEY A. (1994). Characterization of endothelin receptors in mesangial cells: evidence for two functionally distinct endothelin binding sites. *Mol Pharmacol.* **46**: 41-50.
- SIMONSON M.S., WANN S., MENE P., DUBYAK G.R., KESTER M., NAKAZATO Y., SEDOR J.R. et DUNN M.J. (1989). Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest* **83** : 708-12.
- SMITH J.B. (1996). Calcium homeostasis in smooth muscle cells. *New Horiz* **4**: 2-18.
- SMITH P.J., Teichert-Kuliszewska K., Monge J.C., et Stewart D.J. (1998). Regulation of endothelin-B receptor mRNA expression in human endothelial cells by cytokines and growth factors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**: 158-60.
- SOKOLOVSKY M. (1995). Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol Ther.* **68**: 435-71.
- SPINELLA M.J., MALIK A.B., EVERITT J., et ANDERSEN T.T. (1991). Design and synthesis of a specific endothelin 1 antagonist: effects on pulmonary vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**: 7443-6.
- SPINOZZI F., PAGLIACCI M.C., MIGLIORATI G., MORACA R., GRIGNANI F., RICCARDI C., et NICOLETTI I. (1994). The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk Res.* **18**: 431-9.

SPOKES R.A., GHATEI M.A., et BLOOM S.R. (1989). Studies with endothelin-3 and endothelin-1 on rat blood pressure and isolated tissues: evidence for multiple endothelin receptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13** : 191-2.

STEHNO-BITTEL L., LUCKHOFF A., et CLAPHAM D.E. (1995). Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron* **14**: 163-7.

STEHNO-BITTEL L., PEREZ-TERZIC C., et CLAPHAM D.E. (1995). Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca²⁺ store. *Science* **270** : 1835-8.

STEIN P.D., HUNT J.T., FLOYD D.M., MORELAND S., DICKINSON K.E., MITCHELL C., LIU E.C., WEBB M.L., MURUGESAN N., et DICKEY J. (1994). The discovery of sulfonamide endothelin antagonists and the development of the orally active ETA antagonist 5-(dimethylamino)-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1 naphthalenesulfonamide. *J. Med. Chem.* **37**: 329-31.

STEINHARDT R.A. et ALDERTON J. (1988). Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. *Nature* **332**: 364-366.

STRAYER L. (1988). *Biochemistry*, WH Freeman and Company, New York, pp. 935.

SUDJARWO S.A., HORI M., TAKAI M., URADE Y., OKADA T., et KARAKI, H. (1993). A novel subtype of endothelin B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. *Life Sci.* **53**: 431-7.

SUZUKI E., NAGATA D., KAKOKI M., HAYAKAWA H., GOTO A., OMATA M., et HIRATA Y. (1999). Molecular mechanisms of endothelin-1-induced cell-cycle progression: involvement of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase C, and phosphatidylinositol 3-kinase at distinct points. *Circulation Research* **84**: 611-9.

TAKAGI Y., NINOMIYA H., SAKAMOTO A., MIWA S., et MASAKI T. (1995). Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelinA/B chimeras. *J. Biol. Chem.* **270**: 10072-8.

TAKAHASHI E. et BERK B.C. (1998). MAP kinases and vascular smooth muscle function. *Acta. Physiol. Scand.* **164**: 611-21.

TAKAI M., UMEMURA I., YAMASAKI K., WATAKABE T., FUJITANI Y., ODA K., URADE Y., INUI T., YAMAMURA T., et OKADA T. (1992).

A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ETB receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* **184** : 953-9.

TAKASUKA T., SAKURAI T., GOTO K., FURUICHI Y., et WATANABE T. (1994). Human endothelin receptor ETB. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand. *J. Biol. Chem.* **269**: 7509-13.

TAKIGAWA M., SAKURAI T., KASUYA Y., ABE Y., MASAKI T., et GOTO K. (1995). Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur. J. Biochem.* **228**: 102-8.

TAKUWA N., TAKUWA Y., YANAGISAWA M., YAMASHITA K., et MASAKI T. (1989). A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **264**: 7856-61.

TANAKA H., MOROI K., IWAI J., TAKAHASHI H., OHNUMA N., HORI S., TAKIMOTO M., NISHIYAMA M., MASAKI T., YANAGISAWA M., SEKIYA S., et KIMURA S. (1998). Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization. *J Biol Chem.* **273**: 11378-83.

TEDGUI A. et MALLAT Z. (2001). Athérosclérose et inflammation. *Médecine Sciences* **17**: 162-9.

TOKUNAGA O., FAN J., WATANABE T., KOBAYASHI M., KUMAZAKI T., et MITSUI Y. (1992). Endothelin. Immunohistologic localization in aorta and biosynthesis by cultures human aortic endothelial cells. *Lab. Invest.* **67**: 210-7.

TOULLEC D., PIANETTI P., COSTE H., BELLEVERGUE P., GRAND-PERRET T., AJAKANE M., BAUDET V., BOISSIN P., BOURSIER E., LORIOLE F., DUHAME D., CHARON D., et KIRILOVSKY J. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem.* **266**: 15771-81.

TRUMP B.F. et BEREZESKY I.K. (1995). Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* **9**: 219-28.

TURNER N.C., DOLLERY C.T., et WILLIAMS A.J. (1989). Endothelin-1 induces contractions of vascular and tracheal smooth muscle: effects of nifedipine and BRL 34915. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**: 180-182.

VAN BREEMAN C., SKARSGARD P., LAHER I., MCMANUS B., et WANG X. (1997). Endothelium-smooth muscle interactions in blood vessels. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **24**: 989-992.

VANDER A.J., SHERMAN J.H., et LUCIANO D.S. (eds) (1975). Muscle: smooth muscle. In: *Human physiology: the mechanisms of body function*. Second edition. McGraw-Hill Inc. pp219-225.

VANE J. (1990). Endothelins come home to roost. *Nature* **348**: 673.

VANHOUTTE P.M. et RIMELE T.J. (1983). Role of the endothelium in the control of vascular smooth muscle function. *J. Physiol.* **78**: 681-686.

VANHOUTTE P.M., THOMAS T.F., et GRÄSER T. (1991). Endothelium-dependant contractions. *Blood Vessels* **28**: 74-83.

VAUX D.L. et STRASSER A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 2239-44.

VENIANT M., CLOZEL J.P., HESS P., et CLOZEL M. (1994). Endothelin plays a role in the maintenance of blood pressure in normotensive guinea pigs. *Life Sci.* **55**: 445-54.

VILLA A., PODINI P., PANZERI M.C., SOLING H.D., VOLPE P., et MELDOLESI J. (1993). The endoplasmic-sarcoplasmic reticulum of smooth muscle: immunocytochemistry of vas deferens fibers reveals specialized subcompartments differently equipped for the control of Ca²⁺ homeostasis. *Journal of Cell Biology* **121**: 1041-51.

WAGGONER W.G., GENOVA S.L., et RASH V.A. (1992). Kinetic analyses demonstrate that the equilibrium assumption does not apply to [125I]endothelin-1 binding data. *Life Sci.* **51**: 1869-76.

WAGNER O.F., CHRIST G., WOJTA J., VIERHAPPER H., PARZER S., NOWOTNY P.J., SCHNEIDER B., WALDHAUSL W., et BINDER BR. (1992). Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 16066-8.

WALLEN N., KITA H., WEILER D., et GLEICH G.J. (1991). Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. *Journal of Immunology* **147**: 3490-5.

WANG Y., SIMONSON M.S., POUYSSEGUR J., et DUNN M.J. (1992). Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase activity in rat mesangial cells. *Biochem. J.* **287**: 589-94.

WARNER T.D., ALLCOCK G.H., CORDER R., et VANE J.D. (1993). Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br. J. Pharmacol.* **110**: 777-782.

WARREN J.B. (1990). Introduction. In: The endothelium :an introduction to current research. Eds: J.B. Warren. Wiley-Liss, pp: xi-xii.

WAYBILL M.M., YELAMARTY R.V., ZHANG Y.L., SCADUTO R.C.JR., LANOUE K.F., HSU C.J., SMITH B.C., TILLOTSON D.L., YU F.T., et CHEUNG J.Y. (1991). Nuclear calcium gradients in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **261**: 49-57.

WEBB D.J. (1991). Endothelin receptors clones, endothelin converting enzyme characterized and pathophysiological roles of endothelin proposed. *TIPS* **12**: 43-46.

WEBER A. (1966). Energized calcium transport and relaxing factors. *Curr. Top Bioenerg.* **1**: 203-254.

WEBER H., WEBB M.L., SERAFINO R., TAYLOR D.S., MORELAND S., NORMAN J. et MOLLY C.J. (1994). Endothelin-1 and angiotensin II stimulate delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells : evidence for common signaling mechanisms. *Mol Endocrinol* **8** : 148-58.

WEGNER M., CAO Z., et ROSENFELD M.G. (1992). Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science* **256**: 370-373.

WHITE J.G., AMOS W.B., et FORDHAM M. (1987). An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescent light microscopy. *J. Cell Bio.* **105**: 41-48.

WU X., FAN Z., MASUI H., ROSEN N., et MENDELSON J. (1995). Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *Journal of Clinical Investigation* **95**: 1897-905.

WU-WONG J.R., CHIOU W.J., DICKINSON R., et OPGENORTH T.J. (1997). Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem. J.* **328** : 733-7.

WU-WONG J.R., CHIOU W.J., et WANG J. (2000). Extracellular signal-regulated kinases are involved in the antiapoptotic effect of endothelin-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**: 514-21.

XIA Z., DICKENS M., RAINGEAUD J., DAVIS R.J., et GREENBERG M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-31.

YANAGISAWA M. et MASAKI T. (1989). Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochemical Pharmacology* **38**: 1877-83.

YANAGISAWA M., KURIHARA H., KIMURA S., TOMOBE Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., YAZAKI Y., GOTO K., et MASAKI T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415.

YANG Z., KRASNICI N., et LUSCHER T.F. (1999). Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* **100**: 5-8.

YORK J.D., SAFFITZ J.E., et MAJERUS P.W. (1994). Inositol polyphosphate 1-phosphatase is present in the nucleus and inhibits DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 19992-9.

YOSHIBAYASHI M., NISHIOKA K., NAKAO K., SAITO Y., MATSUMURA M., UEDA T., TEMMA S., SHIRAKAMI G., IMURA H., et MIKAWA H. (1991). Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects. Evidence for increased production of endothelin in pulmonary circulation. *Circulation* **84**: 2280-5.

YOSHIZUMI M., KURIHARA H., MORITA T., YAMASHITA T., OHHASHI Y., SUGIYAMA T., TAKAKU F., YANAGISAWA M., MASAKI T., et YAZAKI Y. (1990). Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**: 324-9.