

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CONTRIBUTION DES RÉCEPTEURS DE TYPE ET_B DANS
LES EFFETS PHARMACOLOGIQUES DES ENDOTHÉLINES DANS
LE POU MON ET LE REIN PERFUSÉS DE LAPIN**

par

MARIE-CLAUDE MAURICE

Département de pharmacologie

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

Octobre 1996



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21801-5

*À mes parents,
Micheline et André*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	i
LISTE DE PUBLICATIONS	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	x
INTRODUCTION	1
1.1 VOIES DE BIOSYNTHÈSE DES ENDOTHÉLINES	2
1.2 PHARMACOLOGIE DES ENDOTHÉLINES	5
1.3 RÉCEPTEURS DES ENDOTHÉLINES	7
1.4 SOUS-TYPE DE RÉCEPTEURS DE TYPE ET _B	11
1.5 RÉCEPTEURS DE TYPE ET _B ENDOTHÉLIAUX	12
1.6 ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS DES ENDOTHÉLINES	13
1.7 EFFETS RÉNAUX DE L'ENDOTHÉLINE	15
1.8 HYPOTHÈSE UNIFICATRICE DE L'ÉTUDE	15
1.9 BUTS DE L'ÉTUDE	16
MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
2.1 ANIMAUX UTILISÉS	17
2.1.1 Lapins	17
2.1.2 Éthique	17
2.2 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	17

	ii
2.2.1 Organe isolé	17
2.2.2 Tissus isolé	18
2.3 PRÉPARATIONS PHARMACOLOGIQUES	18
2.3.1 Rein isolé	18
2.3.2 Poumon isolé	19
2.3.3 Artère carotide	19
2.3.4 Artère pulmonaire	20
2.4 COMPOSÉS UTILISÉS	20
2.4.1 Composés peptidiques	20
2.4.2 Composés non-peptidiques	22
2.5 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX	22
2.5.1 Rein isolé	22
2.5.2 Poumon isolé	24
2.5.3 Essai radio-immunologique	24
2.5.4 Artères carotide et pulmonaire	25
2.6 PARAMÈTRES PHARMACOLOGIQUES	26
2.7 ÉVALUATIONS STATISTIQUES	27
RÉSULTATS	28
3.1 CARACTÉRISATION D'ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES SUR DES PRÉPARATIONS VASCULAIRES MONORÉCEPTORIELLES DE TYPE ET_A OU DE TYPE ET_B	28
3.1.1 Affinités apparentes du BMS 182874, un antagoniste sélectif des	

récepteurs de type ET _A	29
3.1.2 Affinités apparentes du SB 209670, un antagoniste non-sélectif des récepteurs de type ET _A /ET _B	29
3.1.3 Affinités apparentes du BQ-928, un antagoniste non-sélectif des récepteurs de type ET _A /ET _B	32
3.1.4 Affinités apparentes du BQ-238, un antagoniste non-sélectif des récepteurs de type ET _A /ET _B	34
3.2 CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEURS DE TYPE ET _B DANS LA RÉPONSE PRESSIVE RÉNALE ET DANS LA LIBÉRATION DE PROSTACYCLINE PULMONAIRE	34
3.2.1 Étude de la libération de PGI ₂ pulmonaire induite par l'endothéline-1	34
3.2.2 Étude de la libération de PGI ₂ rénale induite par l'endothéline-1	37
3.2.3 Étude de la réponse pressive rénale induite par l'endothéline-1	39
3.3 AFFINITÉS APPARENTES DES ANTAGONISTES DE L'ENDOTHÉLINE CONTRE L'EFFET PRESSEUR RÉNAL DE L'ENDOTHÉLINE-1 ..	43
3.4 ÉTUDE DE LA RÉACTIVITÉ VASCULAIRE RÉNALE À L'ENDOTHÉLINE-1 SUITE AU RETRAIT DES ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES	46

DISCUSSION	51
4.1 CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE D'ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES SUR LES RÉCEPTEURS DE TYPE ET _A OU DE TYPE ET _B	51
4.2 LES RÉCEPTEURS DE TYPE ET _B MÉDIENT UNE LIBÉRATION D'EDRF DANS LA VASCULARISATION RÉNALE DE LAPIN	55
4.3 CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE D'ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES CONTRE L'EFFET PRESSEUR RÉNAL DE L'ENDOTHÉLINE-1	58
4.4 RÉVERSIBILITÉ DE L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS DE TYPE ET _B ENDOTHÉLIAUX	59
CONCLUSION	62
REMERCIEMENTS	65
BIBLIOGRAPHIE	66

LISTE DE PUBLICATIONS

D'ORLEANS-JUSTE P., CLAING A., TELEMAQUE S., MAURICE M.C., YANO M. & GRATTON J.P. (1994) Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A₂ from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ET_B receptor antagonist, BQ-788. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1257-1262.

D'ORLEANS-JUSTE P., YANO M., MAURICE M.C. & GRATTON J.P. (1995) Hyperresponsiveness to ET-1 following treatment with a mixture of ET_A and ET_B receptor antagonists in the rabbit *in vivo* and *in vitro*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26: S369-S372.

GRATTON J.P., MAURICE M.C. & D'ORLEANS-JUSTE P. (1995) Characterization of endothelin receptors and endothelin-converting enzyme activity in the rabbit lung. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26: S88-S90.

MAURICE M.C., GRATTON J.P. & D'ORLEANS-JUSTE P. (1997) Pharmacology of two novel mixed ET_A/ET_B receptor antagonists, BQ-928 and 238, in the carotid and pulmonary arteries and perfused kidney of the rabbit. (Sous presse).

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	Structure primaire des endothélines.	3
FIGURE 2	Biosynthèse des endothélines.	4
FIGURE 3	Courbes concentration-réponse, de l'endothéline-1 sur l'artère carotide de lapin et de l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin, en absence ou en présence de BMS 182874.	30
FIGURE 4	Courbes concentration-réponse, de l'endothéline-1 sur l'artère carotide de lapin et de l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin, en absence ou en présence de SB 209670.	31
FIGURE 5	Courbes concentration-réponse, de l'endothéline-1 sur l'artère carotide de lapin et de l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin, en absence ou en présence de BQ-928.	33
FIGURE 6	Courbes concentration-réponse, de l'endothéline-1 sur l'artère carotide de lapin et de l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin, en absence ou en présence de BQ-238.	35
FIGURE 7	Profil de libération de 6-céto-PGF _{1α} (ng/ml), de l'IRL 1620 et de l'endothéline-1 en absence ou en présence de BQ-123 ou de BQ-788, dans le poumon isolé et perfusé de lapin.	36
FIGURE 8	Profil de libération de 6-céto-PGF _{1α} (ng/ml), de l'endothéline-1 et de l'angiotensine II, en absence ou en présence de BQ-788, dans le rein isolé et perfusé de lapin.	38
FIGURE 9	Variations de la pression de perfusion (mm Hg) de l'endothéline-1 en	

absence ou en présence de BQ-788, de L-NAME ou de BQ-788 co-perfusé avec le L-NAME dans le rein isolé et perfusé de lapin	40
FIGURE 10 Variations de la pression de perfusion (mm Hg), de l'IRL 1620 et de l'angiotensine II, en absence ou en présence de L-NAME ou de l'angiotensine II en absence ou en présence de BQ-788, dans le rein isolé et perfusé de lapin.	42
FIGURE 11 Caractéristiques d'antagonisme concentration-dépendante du BQ-928, du BQ-238, du BMS 182874 et du SB 209670 contre l'effet presseur de l'endothéline-1, dans le rein isolé et perfusé de lapin.	44
FIGURE 12 Variations de la pression de perfusion (mm Hg), de trois perfusions successives d'endothéline-1 ou d'angiotensine II, dans le rein isolé et perfusé de lapin.	47
FIGURE 13 Variations de la pression de perfusion (%) de l'endothéline-1 suite au retrait du BQ-123, du BMS 182874, du BQ-788, du BQ-928, du BQ-238 et du SB 209670, dans le rein isolé et perfusé de lapin.	48
FIGURE 14 Sites essentiels pour les effets de l'endothéline-1 chez l'homme.	63

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs des endothélines.	8
TABLEAU II	Structures et caractéristiques des antagonistes des récepteurs des endothélines.	10
TABLEAU III	Liste des composés peptidiques.	21
TABLEAU IV	Liste des composés non-peptidiques.	23
TABLEAU V	Paramètres pharmacologiques décrivant les activités d'antagonistes aux endothélines sur l'artère carotide, l'artère pulmonaire et dans le rein isolé et perfusé de lapin.	45
TABLEAU VI	Corrélation entre les propriétés anti-ET_B d'antagonistes aux endothélines et l'hyperréactivité de la réponse pressive de l'endothéline-1 suite au retrait de ces antagonistes dans le rein isolé et perfusé de lapin. . .	50

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ang II	Angiotensine II
DAG	Diacyl-glycérol
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium
ET	Endothéline
i.a.	Intra-artérielle
IP ₃	Inositol triphosphate
KDa	Kilo Dalton
6-céto-PGF _{1α}	6-céto-prostaglandine F _{1α}
L-NAME	N _w -Nitro-L-arginine methyl ester
min	minute
PBS	Solution de saline tamponnée avec du phosphate
PGI ₂	Prostacycline
PLC	Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂

CONTRIBUTION DES RÉCEPTEURS DE TYPE ET_B DANS LES EFFETS PHARMACOLOGIQUES DES ENDOTHÉLINES DANS LE POUMON ET LE REIN PERFUSÉS DE LAPIN

par

MARIE-CLAUDE MAURICE

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

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

RÉSUMÉ

L'objectif majeur de la présente étude était de vérifier la contribution modulatrice des récepteurs de type ET_B dans les effets vasoconstricteurs de l'endothéline-1 dans le rein isolé et perfusé de lapin. Dans un premier temps, des antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A (BQ-123, BMS 182874), ET_B (BQ-788) et mixtes ET_A/ET_B (SB 209670, BQ-238 et BQ-928) ont été caractérisés pharmacologiquement dans des préparations vasculaires contenant un seul type de récepteurs à l'endothéline soit l'artère carotide (ET_A) et pulmonaire (ET_B, en utilisant un agoniste sélectif des récepteurs de type ET_B (IRL-1620)) de lapin. Deuxièmement, de façon à déterminer la concentration dite efficace de l'antagoniste ET_B le BQ-788, nous avons évalué la capacité de ce dernier à bloquer la libération de prostacyline stimulée par l'endothéline-1 dans le poumon perfusé de lapin. Nous avons par la suite démontré que le BQ-788 bloquait les propriétés vasodilatatrices de l'EDRF (stimulé par l'endothéline-1) au niveau de la circulation rénale de lapin, phénomène qui est sensible à un inhibiteur de l'oxide nitrique synthase. Ensuite, nous avons montré que dans un système où l'activation des récepteurs de type ET_A est responsable de la vasoconstriction et l'activation des récepteurs de type ET_B de la vasodilatation, les antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A (BQ-123 et BMS 182874) ou mixtes ET_A/ET_B qui possèdent une plus grande affinité pour les récepteurs de type ET_A (SB 209670 et BQ-238) n'induisent pas d'hyperréactivité à l'endothéline-1 dans le rein perfusé de lapin. Au contraire, les antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_B (BQ-788) ou mixtes ET_A/ET_B qui possèdent une plus grande affinité pour les récepteurs de type ET_B (BQ-928) interfèrent efficacement et de façon prolongée avec l'antagonisme physiologique dépendant des récepteurs de type ET_B endothéliaux des effets vasoconstricteurs de l'endothéline-1 chez le lapin. Ces observations supportent l'hypothèse que lors d'une pathologie d'origine vasculaire où il y a hypersécrétion d'endothéline, le blocage des capacités vasodilatatrices endothélium-dépendantes des récepteurs de type ET_B entraînerait une accentuation des propriétés vasoconstrictrices de ce puissant vasoconstricteur peptidique.

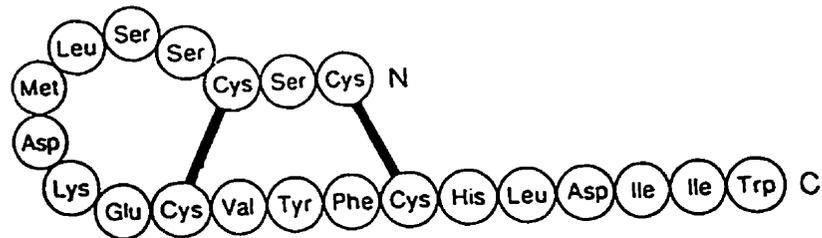
INTRODUCTION

L'endothélium vasculaire, cette monocouche qui tapisse tous les vaisseaux sanguins a été longtemps considéré comme une simple barrière physique. En 1976, MONCADA *et al.* ont été les premiers à rapporter que les cellules endothéliales sécrètent un agent vasodilatateur dérivé de la cascade de l'acide arachidonique, la prostacycline (PGI₂). Quelques années après, FURCHGOTT & ZAWADZKI (1980) ont démontré que cette couche monocellulaire sécrète un second agent vasodilatateur, appelé facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF). En 1985, HICKEY *et al.* ont rapporté un troisième facteur vasoactif qu'ils ont appelé facteur contractile dérivé de l'endothélium. Ces auteurs ont démontré que cet autacoïde est thermolabile, probablement de nature peptidique et qu'il induit un effet constricteur, à lente cinétique d'entrée en action, sur plusieurs types de vaisseaux sanguins isolés. Ces observations préliminaires ont été confirmées en 1988 par le groupe de YANAGISAWA *et al.* qui a isolé un peptide de 21 acides aminés, l'endothéline-1 (ET-1), à partir du surnageant de culture de cellules endothéliales aortiques porcines. Après ces importantes études, l'endothélium vasculaire est maintenant considéré comme une glande paracrine et endocrine qui joue un rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire. De plus, cette monocouche est également considérée comme le site majeur de sécrétion du plus puissant vasoconstricteur connu à ce jour, l'endothéline-1.

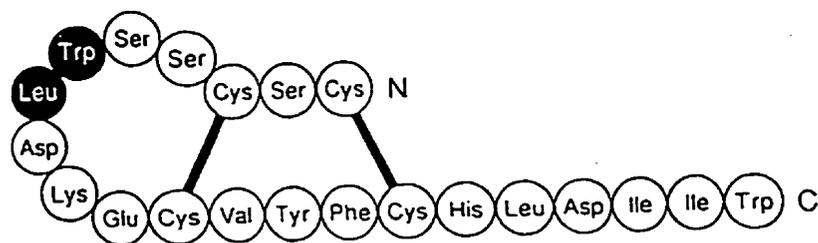
1.1 VOIES DE BIOSYNTHÈSE DES ENDOTHÉLINES

La famille des endothélines est composée de trois peptides (figure 1), l'endothéline-1, l'endothéline-2 et l'endothéline-3 qui sont respectivement contenus dans la structure peptidique de trois précurseurs, les prépro-endothélines-1,2 et 3 qui proviennent de l'expression de trois gènes différents (INOUE *et al.* 1989). La figure 2 illustre les étapes posttraductionnelles de la synthèse intracellulaire de l'endothéline-1, l'isoforme principal libéré de l'endothélium vasculaire, à partir de la prépro-endothéline-1. Lors de la première étape, une endopeptidase de type furine (DENAULT *et al.* 1995) clive la prépro-endothéline-1 (composé de 212 acides aminés chez l'Homme) entre les résidus Arg⁵² et Cys⁵³ et les résidus Arg⁹² et Ala⁹³. Par la suite, une ou des carboxypeptidases clivent les deux autres acides aminés basiques en C-terminal pour générer la big-endothéline-1 (composé de 38 acides aminés chez l'Homme). Ce peptide est transformé en son métabolite actif, l'endothéline-1, suite à l'hydrolyse enzymatique du lien Trp⁷³-Val⁷⁴ par le biais de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE).

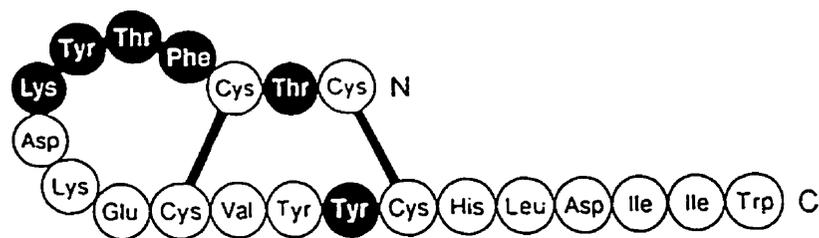
L'ECE a été cloné pour la première fois par SHIMADA *et al.* (1994), à partir de cellules endothéliales, vasculaires et pulmonaires de rat. Cette protéine a un poids moléculaire apparent de 126 KDa sur gel de polyacrylamide en présence d'un détergent, le sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). De plus, cet enzyme possède dix sites potentiels de N-glycosylation, une région transmembranaire unique et une séquence consensus dans sa portion C-terminale pour la chélation du zinc. Récemment, trois isoformes de l'ECE (ECE-1a, ECE-1b et ECE-2) ont été caractérisés et rapportés par XU *et al.* (1994),



1. Endothéline-1 (humaine)



2. Endothéline-2 (humaine)



3. Endothéline-3 (humaine)

Figure 1 Structure primaire des endothélines humaines. Les cercles noirs illustrent les acides aminés différents de ceux présents dans la structure de l'endothéline-1 (tirée de WEBB, 1991)

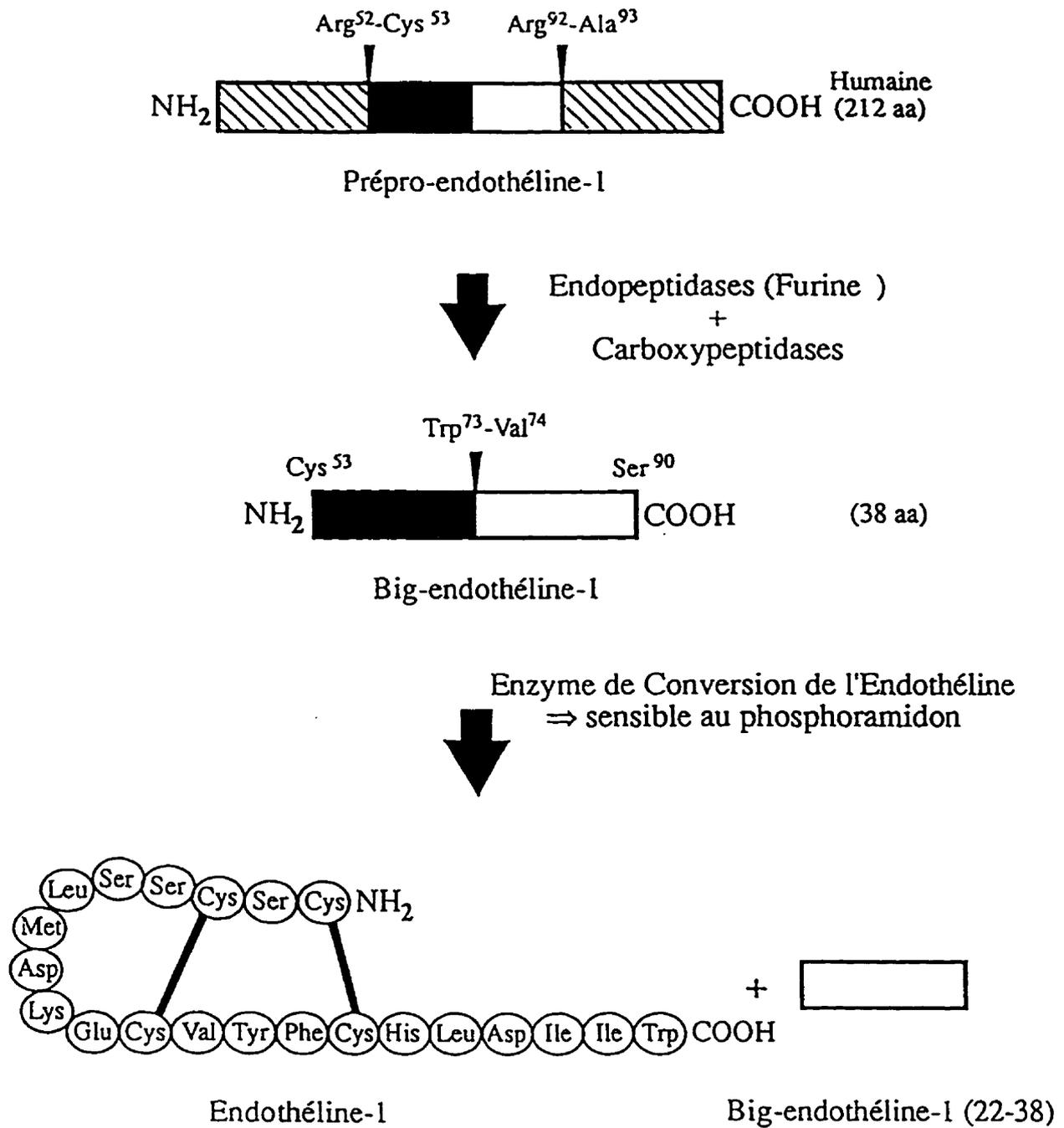


Figure 2 Biosynthèse des endothélines. (tirée de GRATTON, 1995)

EMOTO *et al.* (1995) et TAKAHASHI *et al.* (1995). Le clivage du lien Trp²¹-Val²² de la big-endothéline-1 par cet enzyme sensible au phosphoramidon génère l'endothéline-1 et un fragment C-terminal de la big-endothéline-1, le fragment 22-38, qui est inactif lorsqu'injecté de façon intra-artérielle chez le lapin (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.* 1991).

1.2 PHARMACOLOGIE DES ENDOTHÉLINES

Près de 8 ans après sa découverte, le puissant peptide vasoactif, l'endothéline-1, se voit conférer un rôle de modulateur endogène du tonus vasculaire dans plusieurs espèces animales et chez l'Homme (HAYNES & WEBB, 1994). Chez ce dernier, un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A, le BQ-123 lorsqu'administré localement induit une augmentation très significative du flot sanguin dans l'artère brachiale de l'avant-bras chez l'homme (HAYNES *et al.*, 1994).

Alors que dans plusieurs dysfonctions du système cardiovasculaire, une augmentation significative du taux circulant d'endothéline avait été rapportée (BATTISTINI *et al.*, 1993), un rôle de l'endothéline-1 dans l'étiologie de plusieurs de ces maladies vasculaires, a dû attendre l'avènement d'antagonistes spécifiques. C'est en 1993, que le groupe de CLOZEL *et al.* a rapporté pour la première fois l'efficacité d'un antagoniste non peptidique de l'endothéline, le RO 46-2005 qui agissait sur les deux types de récepteurs de l'endothéline jusqu'à maintenant reconnus, soit le récepteur de type ET_A (ARAI *et al.*, 1990) et le récepteur de type ET_B (SAKURAI *et al.*, 1990).

Caractéristiquement, lorsqu'administrée par voie intraveineuse, dans

plusieurs espèces animales, l'endothéline induit un effet hypotenseur transitoire suivi d'un effet presseur très prolongé chez le rat, le lapin et chez l'Homme (DENUCCI *et al.*, 1988; ROBERTS-THOMSON *et al.*, 1994; HAYNES *et al.*, 1995). Il avait été initialement suggéré que l'activation de récepteurs de type ET_A de l'endothéline était responsable pour les effets vasoconstricteurs de ces peptides alors que la stimulation des récepteurs de type ET_B (localisés sur l'endothélium) était responsable de ces effets hypotenseurs et vasodilatateurs dus à la libération de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF)(DENUCCI *et al.*, 1988).

Or, les observations subséquentes dans des vaisseaux isolés de rat et de lapin, ont démontré pharmacologiquement la possible contribution des récepteurs de type ET_B responsables de la vasoconstriction des vaisseaux sanguins de faible résistance (veines et artères pulmonaires)(MORELAND *et al.*, 1992; WHITE *et al.*, 1993). La possible participation des deux types de récepteurs de l'endothéline dans les effets vasoconstricteurs de ce peptide, a motivé le développement d'antagonistes mixtes des deux types de récepteurs (CLOZEL *et al.*, 1994). Suite à la publication originale sur le Bosentan (un antagoniste mixte de deux générations de la compagnie Hoffman Laroche) (CLOZEL *et al.*, 1994), plusieurs autres compagnies ont développé des antagonistes agissant sur les deux types de récepteurs, tels que le SB 209670 (OHLSTEIN *et al.*, 1994) et le PD-145065 (DOHERTY *et al.*, 1993).

1.3 RÉCEPTEURS DES ENDOTHÉLINES

Peu de temps après la découverte et la caractérisation pharmacologique des endothélines, WARNER *et al.* (1989) rapportaient une réponse biphasique, vasodilatation transitoire suivie d'une vasoconstriction soutenue, suite à l'administration d'endothéline-1 dans la vascularisation artérielle du lit mésentérique isolé de rat. Dans cette étude, l'endothéline-1 était beaucoup plus puissante que l'endothéline-3 à induire des effets vasoconstricteurs alors que les deux peptides étaient équipotents en terme d'agents vasodilatateurs dans cette préparation. Suite à ces résultats, ANGGARD *et al.* (1990) suggéraient deux types de récepteurs pour l'endothéline, soit le récepteur de type ET_A sur lequel l'endothéline-1 est plus puissante ou équipotente à l'endothéline-2 qui a son tour, est plus puissante que l'endothéline-3 et le récepteur de type ET_B sur lequel les trois endothélines sont équipotentes.

Ces hypothèses ont été confirmées par les publications simultanées de ARAI *et al.* (1990) et de SAKURAI *et al.* (1990) qui ont cloné et séquencé le récepteur de type ET_A et le récepteur de type ET_B, respectivement. Ces deux types de récepteurs, formés chacun d'une chaîne d'environ 420 acides aminés (48 KDa), font partie de la famille de récepteurs qui possèdent sept domaines transmembranaires et qui sont couplés aux protéines G, plus spécifiquement G_{q/11} (KELLY *et al.*, 1990). Ces deux types de récepteurs aux endothélines ont une homologie de structure d'environ 50 % (KARNE *et al.*, 1993). Le tableau I illustre les caractéristiques biochimiques des récepteurs de type ET_A et de type ET_B, leurs ligands naturels et leurs agonistes sélectifs ainsi que les effets

TABLEAU I

**Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des
récepteurs des endothélines**

Récepteurs	ET _A	ET _B
Clonage	Arai, 1990	Sakurai, 1990
Poids moléculaire	48,516 Da	46,901 Da
Acides-aminés	427	415
Effecteurs	G _{q/11}	G _{q/11}
Mécanismes d'action	PLC, PLA ₂ DAG, PKC, IP ₃ , ↑Ca ²⁺	PLC, PLA ₂ DAG, PKC, IP ₃ , ↑Ca ²⁺
Puissances des ETs	ET-1>ET-2>ET-3	ET-1=ET-2=ET-3
Localisation vasculaire	muscle lisse	endothélium muscle lisse
Fonctions	vasoconstriction	vasodilatation vasoconstriction
Agonistes sélectifs		IRL 1620 BQ-3020

pharmacologiques vasculaires modulés par ces deux types de récepteurs.

Lorsque ces récepteurs sont activés par des ligands, leurs protéines G activent la phospholipase C (PLC) ou la phospholipase A₂ (PLA₂). La voie de l'activation de la PLC produit deux second messagers: l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacyl-glycérol (DAG). Les IP₃ mobilisent le calcium cytoplasmique et le DG est responsable de l'activation de la protéine kinase C (PKC). Cette cascade d'évènements intracellulaires induit des mécanismes contractiles (cellules musculaires) ou sécrétoires (cellules endothéliales)(REMBOLD *et al.*, 1991). La voie de l'activation de la PLA₂ mène à la formation de métabolites de l'acide arachidonique.

De façon générale, au niveau vasculaire les effets vasoconstricteurs de l'endothéline-1 sont médiés par les récepteurs de type ET_A situés uniquement sur le muscle lisse alors que la vasodilatation, suite à la libération d'EDRF, est médiée par les récepteurs de type ET_B localisés uniquement sur l'endothélium. Cependant, CLOZEL *et al.* (1992)(*in vivo*) et MORELAND *et al.* (1992)(*in vitro*) ont rapporté que l'activation des récepteurs de type ET_B au niveau du muscle lisse pouvait également induire une vasoconstriction chez le rat.

La caractérisation pharmacologique des deux types de récepteurs des endothélines a été rendue possible grâce au développement d'agonistes et d'antagonistes spécifiques et sélectifs pour chacun des types de récepteurs. En 1992, IHARA *et al.* ont été les premiers à rapporter un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A, le BQ-123 (tableau II). Le BQ-3020 et l'IRL 1620, deux agonistes sélectifs des récepteurs de type ET_B ont été rapportés par SAEKI *et al.* (1991) et TAKAI *et al.* (1992), respectivement. Quelques

TABLEAU II

Structures et caractéristiques des antagonistes des récepteurs
des endothélines

Sélectif ET _A	BQ-123	cyclo(-D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Trp-) peptidique, P.M.:610.40 IHARA <i>et al.</i> , 1992.
	BMS 182874	5-(diméthylamino)-N-(3,4-diméthyl-5-isoxazolyl)-1-naphtalenesulphonamide non-peptidique, P.M.:345.42 STEIN <i>et al.</i> , 1994.
Sélectif ET _B	BQ-788	N-cis-2,6-diméthylpiperidinocarbonyl-L-γ-méthylleucyl-D-1-méthoxycarbonyltryptophanyl-D-norleucine peptidique, P.M.:663.79 ISHIKAWA <i>et al.</i> , 1994.
Non-sélectif	BQ-238	cyclo(L-D-2-bromotryptophanyl-D-aspartyl-L-prolyl-D-2-cyclopentylglycyl-L-2-cyclopropylglycyl-) peptidique, P.M.:721.58 communication personnelle
	BQ-928	N-cis-2,6-diméthylpiperidinocarbonyl-L-2-cyclopropylglycyl-D-2-bromotryptophanyl-D-norleucine peptidique, P.M.:654.58 FUKAMI <i>et al.</i> , 1995.
	SB 209670	[(+)-(1S,2R,3S)-3-(2-carboxyméthoxy-4-méthoxyphényl)-1-(3,4-méthylendioxyphényl)-5-(prop-1-yloxy)indane-2-carboxylique acid] non-peptidique, P.M.:564.50 OHLSTEIN <i>et al.</i> , 1994.

années après, ISHIKAWA *et al.* (1994) ont rapporté un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_B, le BQ-788 (tableau II). Ces différents outils pharmacologiques ont permis la caractérisation des réponses induites par les endothélines tant *in vivo* que *in vitro* (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1992, 1994; WARNER *et al.*, 1994; WHITE *et al.*, 1994)

1.4 SOUS-TYPE DE RÉCEPTEURS DE TYPE ET_B

Les observations de WARNER *et al.* (1993), dans plusieurs préparations vasculaires et non vasculaires isolées, avaient permis à ces auteurs d'émettre l'hypothèse que les endothélines induisaient leurs effets myotropes via l'activation de trois sous-types de récepteurs distincts soient le récepteur de type ET_A, le récepteur de type ET_B-1 (présent sur l'endothélium) et le récepteur de type ET_B-2 (présent sur le muscle lisse vasculaire). Cette identification pharmacologique de deux sous-types de récepteurs de type ET_B avait été rendue possible à l'aide d'antagoniste mixte, le PD-142893 qui possédait une plus faible affinité pour bloquer les propriétés vasoconstrictrices de l'endothéline dans l'estomac de rat qu'à bloquer les propriétés libératrices de l'EDRF par ce même peptide.

Toutefois, cette hypothèse de deux sous-types de récepteur de type ET_B n'a jamais été confirmée biochimiquement ou par biologie moléculaire. En effet, jusqu'à présent un seul type de récepteur ET_B a été rapporté. De plus, CLOZEL *et al.* (1995) ont aussi rapporté qu'il n'y avait pas d'évidence pharmacologique permettant de distinguer deux sous-types de récepteur de type ET_B compte tenu du fait que, leur antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_B et non-peptidique, le RO 46-8443 bloquait avec la même affinité

les effets sélectifs ET_B sur des préparations possédant hypothétiquement les deux sous-types de récepteurs.

1.5 RÉCEPTEURS DE TYPE ET_B ENDOTHÉLIAUX

Suite aux observations initiales de YANAGISAWA *et al.* (1988), le groupe de DENUCCI *et al.* (1988) a démontré que les effets presseurs de l'endothéline-1 chez le rat anesthésié, étaient atténués par une libération concomitante de prostacycline et d'EDRF vasodilatatrice, identifié comme étant l'oxyde nitrique (PALMER *et al.*, 1987). Les résultats de WARNER *et al.* (1989) ont permis d'identifier que le récepteur de type ET_B responsable de la libération d'EDRF possédait une affinité apparente identique pour l'endothéline-1, l'endothéline-2 et l'endothéline-3 par opposition à l'activation des récepteurs de type ET_A musculaires sur lesquels l'endothéline-1 possède une beaucoup plus forte affinité que l'endothéline-3.

Il semble donc que lorsque l'endothéline-1 exogène est administrée par voie intravasculaire chez l'animal anesthésié, l'activation de récepteurs de type ET_B endothéliaux induit un antagonisme physiologique des effets vasoconstricteurs dépendants des récepteurs de type ET_A tant *in vivo* chez le rat anesthésié (ISHIKAWA *et al.*, 1994) qu'*in vitro* dans le rein perfusé de lapin (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1994).

1.6 ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS DES ENDOTHÉLINES

Comme mentionné précédemment, la caractérisation pharmacologique des récepteurs des endothélines a été rendue possible grâce au développement d'antagonistes pour ces récepteurs (tableau II).

Le BQ-123, un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A, développé par IHARA *et al.* (1992) a été le premier outil pharmacologique utilisé en parallèle avec l'ordre de puissance des endothélines naturelles pour caractériser ces récepteurs. Ce composé, hautement spécifique, est un analogue du BE-18257, un antagoniste naturel isolé à partir du produit de fermentation de *Streptomyces misakensis*. Le BQ-123 est un antagoniste peptidique (5 acides aminés)(tableau II) et compétitif. Il inhibe la liaison de l' [¹²⁵I]endothéline-1 au récepteur de type ET_A, des cellules du muscle lisse vasculaire d'aorte de porc, avec un IC₅₀ de 7.3 nM (IHARA *et al.*, 1992). Par contre, ce composé n'a pratiquement aucune affinité pour le récepteur de type ET_B des membranes cérébrales de porc (IC₅₀ de 18 μM)

Ce n'est qu'en 1994 qu'un puissant antagoniste des récepteurs de type ET_B, le BQ-788, a été rapporté par ISHIKAWA *et al.*. Ce composé provient de modifications d'antagonistes tripeptidiques, eux-même dérivés des bases de la relation structure-activité d'antagonistes tel que le BQ-123. Le BQ-788 est un antagoniste peptidique (tableau II), compétitif, spécifique et puissant. Il inhibe la liaison de l' [¹²⁵I]endothéline-1 au récepteur de type ET_B, des membranes cérébrales de porc, avec un IC₅₀ de 0.9 nM. Cet antagoniste possède un IC₅₀ de 280 nM pour les récepteurs de type ET_A du muscle lisse de l'artère

coronaire porcine (ISHIKAWA *et al.*, 1994).

Le BMS 182874, tout comme le BQ-123, est un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A (STEIN *et al.*, 1994). Cependant, sa nature non-peptidique le rend actif oralement et permet son utilisation dans des thérapies de longue durée. Le BMS 182874 provient d'études de structure-activité effectuées sur des ligands benzène-sulfonamide (tableau II). Cet antagoniste compétitif et spécifique inhibe la liaison de l' [¹²⁵I]endothéline-1 au récepteur de type ET_A, des membranes des cellules A10, avec un IC₅₀ de 150 nM (STEIN *et al.*, 1994).

Le SB 209670, est un antagoniste non-sélectif des récepteurs de type (ET_A/ET_B) rapporté par OHLSTEIN *et al.* (1994). Cet antagoniste possède une structure non-peptidique (tableau II) provenant de modèles des conformations de l'endothéline-1. Le SB 209670 inhibe la liaison de l' [¹²⁵I]-endothéline-1 sur le récepteur de type ET_A, humain et cloné avec un Ki de 0.2 nM et sur le récepteur de type ET_B, humain et cloné avec un Ki de 18 nM (OHLSTEIN *et al.*, 1994). Ce composé est spécifique, compétitif et actif oralement.

Tout récemment, FUKAMI *et al.* (1995) ont développé deux antagonistes mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B, le BQ-928 et le BQ-238. Le tableau II illustre la structure peptidique de ces composés qui provient de modifications du BQ-123 et du BQ-788. Le BQ-928 inhibe la liaison de l' [¹²⁵I]endothéline-1 aux récepteurs de type ET_A, des membranes du muscle lisse de l'aorte de porc, avec un IC₅₀ de 3.8 nM et inhibe la liaison de l' [¹²⁵I]endothéline-1 aux récepteurs de type ET_B, des membranes cérébrales de porc, avec un IC₅₀ de 0.81 nM (FUKAMI *et al.*, 1995).

1.7 EFFETS RÉNAUX DE L'ENDOTHÉLINE

Les premières évidences des effets rénaux de l'endothéline ont été rapportées par RAE *et al.* (1989) alors qu'il avait été démontré qu'une infusion de 5 minutes d'endothéline-1 à une concentration de 10 nM induisait une augmentation de la résistance vasculaire dans cet organe et une libération concomitante de prostacycline vasodilatatrice.

Des études ultérieures, chez le chien anesthésié ont démontré que des doses subressives d'endothéline-1 induisaient une réduction importante du flot rénal et de la filtration glomérulaire (CHOU *et al.*, 1990; TSUCHIYA *et al.*, 1990). Les observations de ces deux groupes, ont permis de suggérer que la circulation rénale lorsque comparée aux autres circuits systémiques était excessivement sensible aux effets vasoactifs de l'endothéline exogène.

De même, des études récentes par HEMSEN *et al.* (1995) ont démontré qu'en doublant les concentrations plasmatiques endogènes d'endothéline-1 chez des sujets sains, une réduction de la filtration glomérulaire et du flot rénal pouvait être détectée.

1.8 HYPOTHÈSE UNIFICATRICE DE L'ÉTUDE

Compte tenu de la grande sensibilité de la vascularisation rénale aux effets vasoactifs de l'endothéline-1, nous suggérons comme hypothèse unificatrice que l'endothélium tapissant les vaisseaux sanguins rénaux agit non seulement comme une barrière physique à l'endothéline exogène mais aussi comme barrière physiologique

puisqu'elle sécrète, suite à l'activation de ses propres récepteurs de type ET_B , suffisamment d'EDRF pour agir comme antagoniste physiologique des effets constricteurs du puissant peptide vasoactif.

Si notre hypothèse s'avère vraie, l'utilisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A par rapport aux antagonistes mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B serait thérapeutiquement avantageuse puisqu'ils n'altéreraient pas cette défense anatomophysiologique de la couche endothéliale aux effets constricteurs de l'endothéline.

1.9 BUTS DE L'ÉTUDE

Le but principal de la présente étude est, en premier lieu, d'identifier l'affinité apparente d'antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A , de type ET_B ou mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B sur des préparations vasculaires monoréceptorielles possédant chacune un seul type de récepteur, deuxièmement, de vérifier l'affinité apparente de ces antagonistes contre les effets presseurs de l'endothéline-1 dans le rein isolé et perfusé de lapin, pour enfin vérifier la réactivité vasculaire rénale à l'endothéline-1 suite au retrait des antagonistes des endothélines (études de réversibilité).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 ANIMAUX UTILISÉS

2.1.1 Lapins

Toutes les expériences ont été effectuées sur des lapins albinos de race Nouvelle-Zélande et de sexe mâle ou femelle. Ils proviennent tous de la ferme Brisebois à Fleurimont (Québec) et sont utilisés lorsque leurs poids se situent autour de 1.6 à 2.5 Kg.

2.1.2 Éthique

Les manipulations sur les animaux suivent le guide du Conseil Canadien de Protection des Animaux et sont approuvées par le comité d'éthique sur la recherche animale de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke.

2.2 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

2.2.1 Organe isolé

Une solution de Krebs (117.5 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 1.2 mM de K_2HPO_4 , 2.5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mM de NaHCO_3 , 5.5 mM de glucose) oxygénée (95% O_2 ; 5% CO_2) et à une température de 37°C est perfusée à un débit de 5 ml/min via l'artère du rein ou du poumon isolé de lapin (voir section 2.3). Ce dernier est placé à l'intérieur d'une chambre thermostatée à 37°C. Un transducteur de pression

Statham (modèle P23 AC) et un physiographe Grass (modèle 79) sont utilisés, respectivement, pour détecter et enregistrer les variations de pression de perfusion.

2.2.2 Tissus isolés

Des bains, qui contiennent 10 ml de la solution de Krebs oxygénée (95% O₂ ; 5% CO₂) décrite précédemment à laquelle 1 µM d'indométhacine est ajouté, sont maintenus à une température de 37°C. Les tissus, isolés et plongés dans les bains, sont attachés et reliés à des transducteurs isométriques de force type FT O3C. Les variations de tensions sont enregistrées sur un physiographe Grass (modèle 7-D)

2.3 PRÉPARATIONS PHARMACOLOGIQUES

2.3.1 Rein isolé

Un lapin est sacrifié par sectionnement de l'épine dorsale. L'artère rénale est dégraissée puis cannulée à l'aide d'un cathéter Portex de grosseur 6FG. Le système vasculaire rénal est perfusé avec une solution de Krebs contenant 100 Unité/ml d'héparine. Le rein est dégraissé et installé dans le système décrit dans la section 2.2.1.

Le lit vasculaire rénal est composé de nombreuses ramifications. Essentiellement, le sang atteint le rein par l'artère rénale (haute pression) et se dirige vers le glomérule où les embranchements se complexifient: dans le cortex externe l'artériole efférente provenant du glomérule se divise en réseau de capillaires entourant les tubules avant de rejoindre la veine confluente. Dans le cortex interne, le sang quittant le glomérule peut

emprunter une de ces deux voies: via les capillaires péricubulaires autour de l'anse de Henlé et des tubes collecteurs dans le cortex interne et dans la médulla externe pour rejoindre les veines interlobulaires; ou via la vasa recta descendante pour fournir la médulla interne avant de retourner par la vasa recta ascendante dans la substance médullaire jusqu'à la veine arquée.

2.3.2 Poumon isolé

Après le sacrifice de l'animal, la cage thoracique est ouverte, les ventricules sont sectionnés en deux et l'artère pulmonaire est cannulée avec un cathéter de grosseur 6FG afin de perfuser l'arbre vasculaire pulmonaire avec un Krebs hépariné (100 Unité/ml). Le lobe gauche inférieur est isolé et sa bronche interne est cannulée afin de gonfler le lobe avec de l'air ambiant. L'artère du lobe pulmonaire est cannulée et immédiatement perfusée à l'aide du système mentionné ci-haut.

2.3.3 Artère carotide

Suite au sacrifice du lapin, l'artère carotide est isolée puis dégraissée. Des segments de 3 à 5 mm sont dénudés mécaniquement de l'endothélium et installés sur des crochets de platine. Ces tissus sont rapidement immergés dans des bains (voir section 2.2.2) sous une tension initiale de 2 g.

2.3.4 Artère pulmonaire

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, l'artère pulmonaire est isolée, dégraissée et découpée en bandellettes d'une longueur de 10 à 15 mm et d'une largeur de 3 à 4 mm. Ces dernières sont dénudées mécaniquement de l'endothélium et mises dans le système décrit plus haut (section 2.2.2). Une tention initiale de 1 g est appliquée.

2.4 COMPOSÉS UTILISÉS

2.4.1 Composés peptidiques

Les composés peptidiques utilisés et leurs structures primaires sont énumérés dans le tableau III. L'endothéline-1, l'endothéline-2, l'endothéline-3 ainsi que l'IRL 1620 proviennent d'American Peptide Company (Sunnyvale, CA, USA). Le BQ-123, le BQ-788, le BQ-928 et le BQ-238 sont fournis par Banyu Pharmaceuticals (Tsukuba, Japon). L'angiotensine II est synthétisée dans les laboratoires du Dr D. Regoli (Université de Sherbrooke, Canada). Tous les peptides sont dissous dans une solution saline tamponnée avec du phosphate (BPS; pH 7.4) et 5 % de DMSO est employé pour diluer les antagonistes.

TABLEAU III**Liste des composés peptidiques**

Peptide	Structure primaire
Ang II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
BQ-123	Voir tableau II
BQ-788	Voir tableau II
BQ-928	Voir tableau II
BQ-238	Voir tableau II
ET-1 (humaine)	Voir figure 1
ET-2 (humaine)	Voir figure 1
ET-3 (humaine)	Voir figure 1
IRL 1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile- Trp-COOH

2.4.2 Composés non-peptidiques

Pour avoir la liste des composés non-peptidiques ainsi que leurs provenances, il faut se référer au tableau IV. Le SB 209670 et le BMS 182874 sont dissous dans du PBS (pH 7.4). Un tampon tris (0.2 M de Trizma-base) est utilisé dans la préparation de l'indométhacine.

2.5 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

2.5.1 Rein isolé

Après un temps d'équilibration d'une heure, trois infusions successives de 5 min d'agoniste (50 μ l/min) sont effectuées à intervalle d'une heure. Dans certaines expériences, des antagonistes sont infusés 15 min avant la deuxième infusion de l'agoniste (ou 30 min pour le L-NAME) et maintenus jusqu'à l'obtention du plateau de constriction. Pour déterminer la quantité de prostacycline libérée, des échantillons de 5 ml (1 min) de l'effluent rénal sont effectués deux minutes avant, pendant et 10 minutes après l'infusion de l'agoniste. Un métabolite stable, le 6-céto-PGF_{1 α} , est dosé selon la méthodologie décrite dans la section 2.5.3.

TABLEAU IV**Liste des composés non-peptidiques**

Nom générique	Source
BMS-182874	Bristol-Myers Squibb pharmaceutical Research Institute
Héparine	Organon Teknika
Indométhacine	Sigma Chemicals
[³ H]-6-céto-PGF _{1α}	Amersham
6-céto-PGF _{1α}	Cayman Chemical
6-céto-PGF _{1α} antisérum	Sigma Chemicals
L-NAME	Sigma Chemicals
PBS	Sigma Chemicals
SB 209670	Smithkline Beecham pharmaceuticals
Trizma-base	Sigma Chemicals
Trizma-HCl	Sigma Chemicals

2.5.2 Poumon isolé

Après une période d'équilibration de 90 min, une infusion de 5 min d'agoniste (50 μ l/min) est effectuée. Dans certaines expériences, l'infusion d'un antagoniste débute 15 min avant celle de l'agoniste et se termine suite à l'obtention du plateau de constriction. Des échantillons de 5 ml (1 min) de l'effluent pulmonaire sont récoltés avant (2 min), pendant et après (10 min) l'infusion de l'agoniste. Ces collectes sont utilisées pour doser le 6-céto-PGF_{1 α} tel que décrit dans la section suivante.

2.5.3 Essai radio-immunologique

La méthode de SALMON (1978) est utilisée pour doser, par essai radioimmunologique (RIA), la concentration de 6-céto-PGF_{1 α} des perfusats pulmonaires et rénaux. Les antisérums sont reconstitués dans 10 ml d'une solution tampon tris (50 nM; pH 7.4) qui contient 0.1% de gélatine et 0.1% d'azide de sodium pour donner une solution qui possède une liaison spécifique d'environ 50%. Cet antisérum a une réactivité croisée de 100% avec le 6-céto-PGF_{1 α} , de 4% avec le PGE₂, de 0.6% avec le TxB₂ et nulle avec les peptides utilisés. Une courbe standard est préparée avec 50 μ l des concentrations de 6-céto-PGF_{1 α} de 20, 10, 5, 2, 1 et 0.5 ng/ml diluées dans une solution de tris (50 mM; pH 7.4). 50 μ l des perfusats sont distribués dans des tubes. 50 μ l d'antisérum puis 50 μ l de 6-céto-PGF_{1 α} marqué au tritium (environ 2000 cpm) sont ajoutés aux tubes. Finalement, des tubes indiquant la radioactivité totale, la liaison non-spécifique et la liaison totale sont préparés selon le protocole suivant:

	[³ H] totale	liaison non-spécifique	liaison totale	standards	échantillon
tampon tris	250 µl	150 µl	100 µl	50 µl	50 µl
standard				50 µl	
échantillon					50 µl
antisérum			50 µl	50 µl	50 µl
[³ H]6-céto-PGF _{1α}	250 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Chaque tube est agité, fermé et incubé à 4°C pour un temps d'équilibration de 10 à 16 heures. 100 µl d'une solution de tampon tris contenant 2% de charbon activé et 0.4% de dextran est utilisée pour séparer le ligand non-lié à son anticorps du ligand lié. Après une incubation de 10 min à 4°C, les tubes sont centrifugés (Beckman TJ-6) à 1500 g pour une durée de 12 min et à une température de 4°C. La radioactivité du surnageant, dilué dans 4 ml de liquide à scintillation, est comptée (Wallac, 1409). La concentration de 6-céto-PGF_{1α} de chacun des échantillons est évaluée à l'aide de la courbe standard.

2.5.4 Artères carotide et pulmonaire

Le milieu d'incubation des artères carotide ou pulmonaire est changé aux 15 min durant une période d'équilibration d'une heure. Avant chaque expérience, l'absence d'endothélium est confirmée par l'incapacité du tissu précontracté avec l'angiotensine II (10 nM) à relaxer en réponse à l'acétylcholine (1 µM). Suite à un dernier lavage, une courbe concentration-contraction est effectuée pour des concentrations cumulatives de 0.01 nM à 0.25 µM d'endothéline-1 et de 0.025 nM à 0.1 µM d'IRL 1620. L'endothéline-1 est utilisé comme agoniste sur le muscle lisse de l'artère carotide de lapin pour obtenir une

préparation monoréceptorielle de type ET_A alors que l'utilisation de l'IRL 1620 sur le muscle de l'artère pulmonaire de lapin permet d'obtenir une préparation monoréceptorielle de type ET_B (CALO *et al.*, 1996). Dans certaines expériences, l'antagoniste est injecté 15 min avant l'agoniste dans le but de déplacer la courbe concentration-réponse vers la droite.

2.6 PARAMÈTRES PHARMACOLOGIQUES

L'affinité apparente (IC_{50}) des antagonistes dans le rein isolé et perfusé de lapin se définit comme la concentration molaire d'antagoniste nécessaire pour réduire de 50% la réponse pressive de l'endothéline-1 (10 nM). L'affinité apparente théorique (IC_{50}) est obtenue par une régression linéaire qui relie la concentration de l'antagoniste avec le % d'inhibition.

Pour les expériences sur les tissus isolés, des courbes concentration-contraction de l'agoniste en cumulatif sont effectuées. L'affinité apparente de l'agoniste pour son récepteur peut se définir en terme de EC_{50} qui est la concentration de l'agoniste produisant 50% de la contraction maximale ou, en terme de pD_2 , qui est le logarithme négatif de cette concentration. D'autres courbes concentration-réponse de l'agoniste sont faites en présence de concentrations croissantes d'antagonistes afin de déplacer la courbe contrôle vers la droite. L'affinité apparente (pA_2) des antagonistes sur des préparations monoréceptorielles est le logarithme négatif de la concentration molaire requise pour réduire l'effet d'une concentration double d'agoniste à celui d'une concentration simple.

Le pA_2 des antagonistes est déterminé par une régression complète de Schild (SCHILD, 1949). L'ordonnée de cette régression se définit comme le logarithme [(EC_{50} de l'agoniste en présence de concentrations croissantes d'antagoniste/ EC_{50} de l'agoniste en absence d'antagoniste)-1] alors que l'abscisse représente le logarithme négatif des concentrations croissantes d'antagoniste. Une pente égale à 1 indique que l'antagoniste est compétitif et le pA_2 est extrapolé à l'abscisse.

2.7 ÉVALUATION STATISTIQUE

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm l'écart-type pour un nombre n d'expériences données. Les comparaisons statistiques entre les groupes sont faites avec le test T de Student, en données pairées ou non-pairées. Les résultats sont trouvés significativement différents lorsque la probabilité P est égale ou inférieure à 0.05.

RÉSULTATS

3.1 CARACTÉRISATION D'ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES SUR DES PRÉPARATIONS VASCULAIRES MONORÉCEPTORIELLES DE TYPE ET_A OU DE TYPE ET_B

Les affinités apparentes (pA_2) du BQ-928, du BQ-238, du SB 209670 et du BMS 182874 sont déterminées d'abord sur le muscle lisse de l'artère carotide de lapin, une préparation monoréceptorielle de type ET_A (CALO *et al.*, 1996), contre l'effet induit par l'endothéline-1. Ensuite, les affinités apparentes (pA_2) de ces composés sont trouvées sur le muscle lisse de l'artère pulmonaire de lapin. Cette préparation, qui contient une plus grande proportion de récepteurs de type ET_B (80 %) que de récepteurs de type ET_A (20 %), est une préparation monoréceptorielle de type ET_B lorsque l'agoniste utilisé est l'IRL 1620 (agoniste sélectif des récepteurs de type ET_B)(CALO *et al.*, 1996). L'endothéline-1 à des concentrations cumulatives de 0.01 nM à 0.25 µM induit des contractions concentration-dépendantes de l'artère carotide de lapin avec un pD_2 de 9.36 ± 0.14 développant une tension maximale de 2.2 ± 0.12 g (n=21). L'IRL 1620, à des concentrations cumulatives de 0.025 nM à 0.1 µM, induit des contractions concentration-dépendantes de l'artère pulmonaire de lapin avec un pD_2 de 8.82 ± 0.10 qui développe une tension maximale de 1.15 ± 0.10 g (n=21).

3.1.1 Affinités apparentes du BMS 182874, un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A

La figure 3 illustre l'effet d'un traitement de l'artère carotide de lapin (A) ou de l'artère pulmonaire de lapin (B) avec un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A, le BMS 182874. Cet antagoniste, incubé 15 min avant d'effectuer la courbe concentration-réponse à l'endothéline-1, réduit la contraction de l'artère carotide induite par le peptide de façon concentration-dépendante. Des concentrations croissantes (0.1 μM, 0.5 μM et 1 μM) de BMS 182874 déplacent vers la droite la courbe concentration-réponse de l'endothéline-1 sans affecter de façon significative la réponse maximale de celle-ci. L'analyse de Schild, tel que démontré dans la fenêtre de la figure 3A, donne une affinité apparente (pA_2) de 6.20 ± 0.21 et une pente non significativement différente de l'unité de 1.22 ± 0.22 . Cependant, le BMS 182874 n'a pas déplacé vers la droite la courbe contrôle cumulative d'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire, même à la très forte concentration de 10 μM (figure 3B).

3.1.2 Affinités apparentes du SB 209670, un antagoniste non-sélectif des récepteurs de type ET_A/ET_B

L'effet d'un traitement de l'artère carotide de lapin (A) ou de l'artère pulmonaire de lapin (B) avec, un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B, le SB 209670 est illustré à la figure 4. Cet antagoniste déplace de façon concentration-dépendante la courbe concentration-réponse induite par l'endothéline-1 sur l'artère carotide. Une affinité apparente (pA_2) de 9.22 ± 0.21 et une pente de 1.11 ± 0.15 sont trouvées à partir d'une

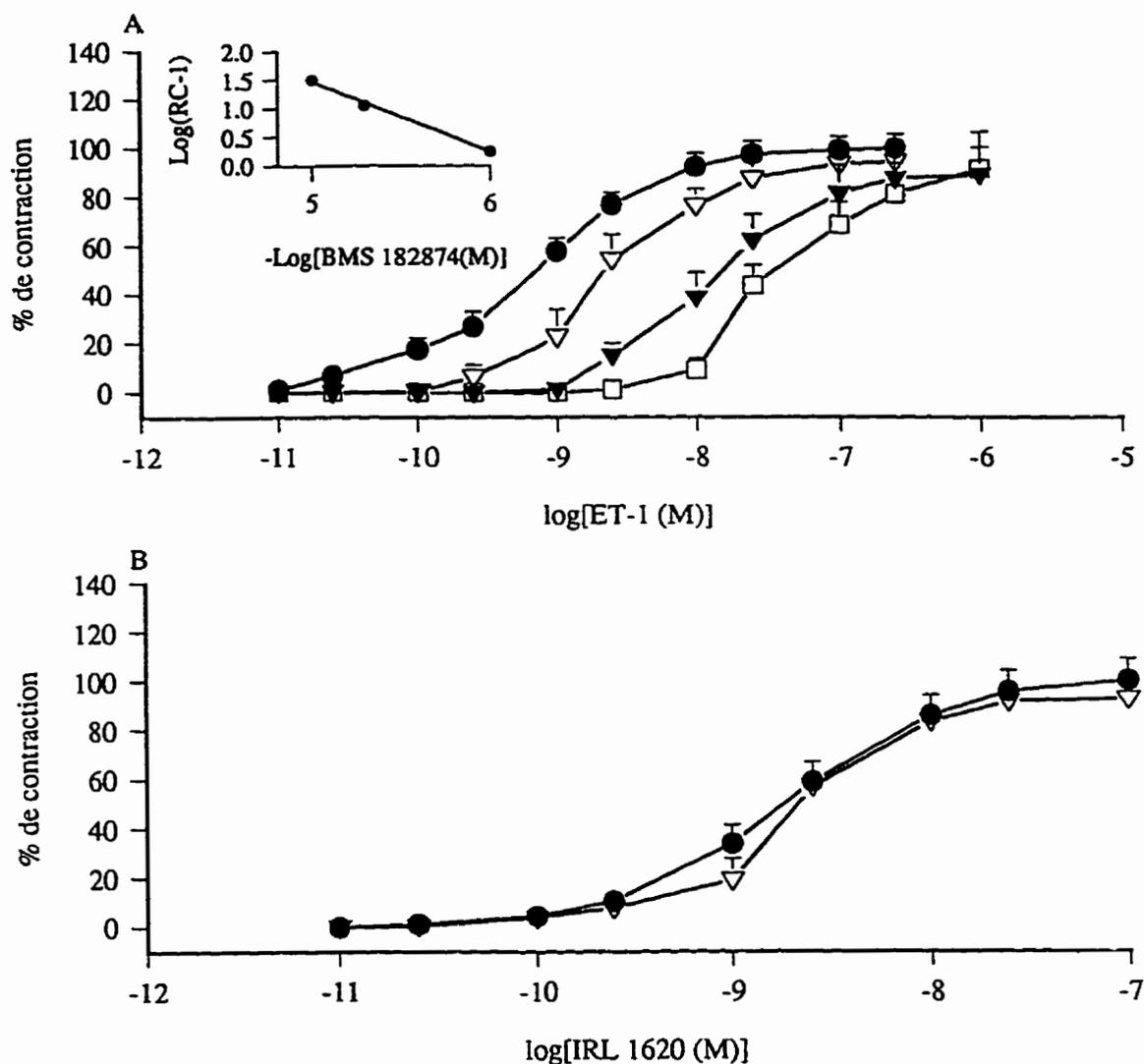


Figure 3 (A) Courbes concentration-réponse induites par l'ET-1 (●) en absence ou en présence de BMS 182874 (▽: 1 μM, ▼: 5 μM, □: 10 μM) sur l'artère carotide de lapin. Fenêtre: régression de Schild. PA_2 : 6.20 ± 0.21 , pente: 1.22 ± 0.22 , $r = 0.99$. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type d'au moins 5 expériences. (B) Courbes concentration-réponse cumulative induites par l'IRL 1620 (●) en absence ou en présence de BMS 182874 (▽: 10 μM) sur l'artère pulmonaire de lapin. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type d'au moins 5 expériences.

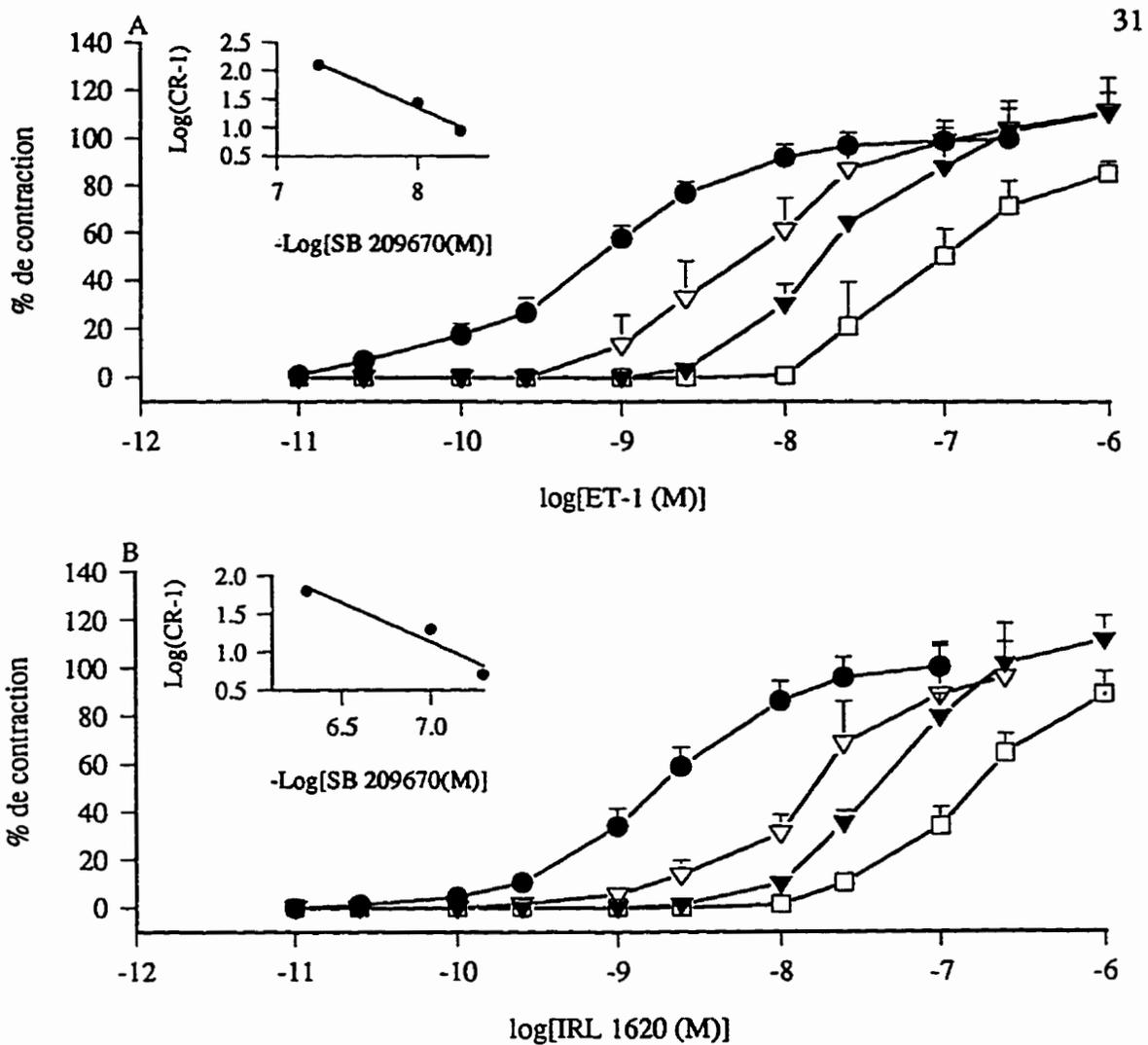


Figure 4 (A) Courbes concentration-réponse induites par l'ET-1 (●) en absence ou en présence de SB 209670 (▽:5 nM, ▼:10 nM, □:50 nM) sur l'artère carotide de lapin. Fenêtre: régression de Schild. PA_2 : 9.22 ± 0.21 , pente: 1.11 ± 0.15 , $r = 0.98$. (B) Courbes concentration-réponse cumulative induites par l'IRL 1620 (●) en absence ou en présence de SB 209670 (▽:50 nM, ▼:100 nM, □:500 nM) sur l'artère pulmonaire de lapin. Fenêtre: régression de Schild. PA_2 : 8.09 ± 0.37 , pente: 1.04 ± 0.29 , $r = 0.93$. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type d'au moins 5 expériences.

régression de Schild qui exprime trois concentrations différentes de SB 209670: 5 nM, 10 nM et 50 nM (fenêtre de la figure 4A). L'analyse des courbes concentration-réponse de la figure 4B démontre que le SB 209670 possède une affinité apparente (pA_2) de 8.09 ± 0.37 et une pente de 1.04 ± 0.29 sur l'artère pulmonaire (SB 209670: 50 nM, 100 nM et 500 nM).

3.1.3 Affinités apparentes du BQ-928, un antagoniste non-sélectif des récepteurs de type ET_A/ET_B

La figure 5 présente l'effet d'un traitement de l'artère carotide de lapin (A) ou de l'artère pulmonaire de lapin (B) avec un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B , le BQ-928. Ce dernier réduit la contraction de l'artère carotide induite par l'endothéline-1 de façon concentration-dépendante. En analysant la régression de Schild de la fenêtre de la figure 5A (BQ-928: 0.1 μ M, 0.5 μ M et 1 μ M), on trouve une affinité apparente (pA_2) de 7.22 ± 0.21 et une pente de 1.19 ± 0.19 . Le BQ-928 déplace également la courbe concentration-réponse de l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire. Une affinité apparente théorique (pA_2) de 8.43 ± 0.04 et une pente de 1.07 ± 0.08 sont déterminées à l'aide de trois concentrations différentes de BQ-928: 10 nM, 50 nM et 100 nM (fenêtre de la figure 5B).

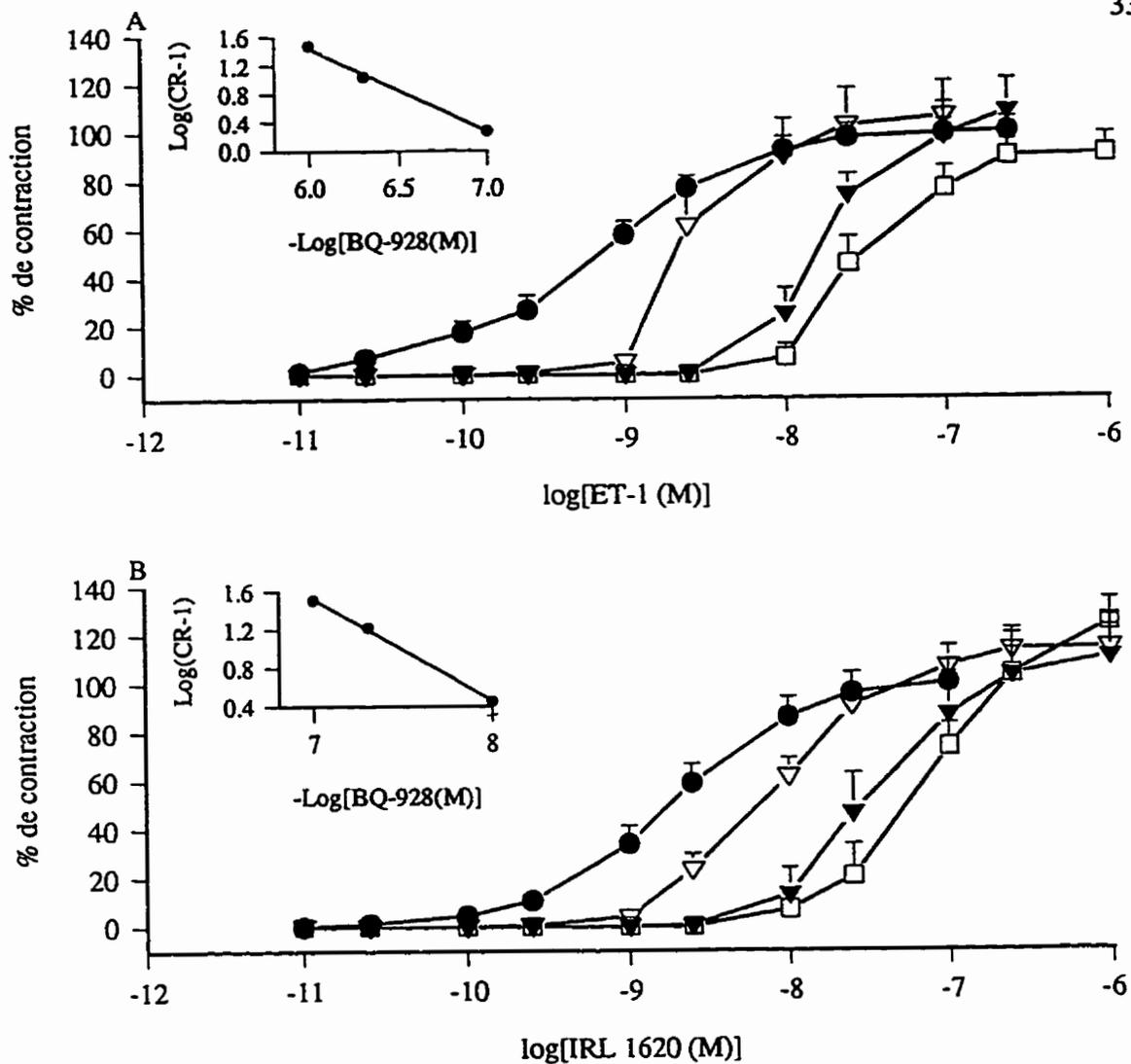


Figure 5 (A) Courbes concentration-réponse induites par l'ET-1 (●) en absence ou en présence de BQ-928 (▽:0.1 μM, ▼:0.5 μM, □:1 μM) sur l'artère carotide de lapin. Fenêtre: régression de Schild. PA_2 : 7.22 ± 0.18 , pente: 1.19 ± 0.19 , $r = 0.99$. (B) Courbes concentration-réponse cumulative induites par l'IRL 1620 (●) en absence ou en présence de BQ-928 (▽:10 nM, ▼:50 nM, □:100 nM) sur l'artère pulmonaire de lapin. Fenêtre: régression de Schild. PA_2 : 8.43 ± 0.04 , pente: 1.07 ± 0.08 , $r = 0.99$. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type d'au moins 5 expériences.

3.1.4 Affinités apparentes du BQ-238, un antagoniste non-sélectif des récepteurs de type ET_A/ET_B

L'effet d'un traitement d'un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B le BQ-238 sur l'artère carotide de lapin (A) ou sur l'artère pulmonaire de lapin (B) est présenté dans la figure 6. Cet antagoniste réduit la contraction de l'artère carotide à l'endothéline-1 et celle de l'artère pulmonaire à L'IRL 1620. Une affinité apparente (pA_2) de 7.42 ± 0.22 et une pente de 0.93 ± 0.22 sont trouvées sur l'artère carotide (BQ-238: 0.1 μ M, 0.5 μ M et 1 μ M)(fenêtre de la figure 6A) et un pA_2 de 7.05 ± 0.14 et une pente de 1.22 ± 0.22 sont calculés sur l'artère pulmonaire (BQ-238: 0.1 μ M, 0.5 μ M et 1 μ M)(fenêtre de la figure 6B).

3.2 CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEURS DE TYPE ET_B DANS LA RÉPONSE PRESSIVE RÉNALE ET DANS LA LIBÉRATION DE PROSTACYCLINE PULMONAIRE

3.2.1 Étude de la libération de PGI₂ pulmonaire induite par l'endothéline-1

La figure 7 illustre le profil de la libération de 6-céto-PGF_{1 α} induit par l'infusion intra-artérielle d'IRL 1620 ou d'endothéline-1 en absence ou en présence de BQ-123 ou de BQ-788, à travers le poumon perfusé de lapin. L'endothéline-1 (50 nM) et l'IRL 1620 (500 nM), induisent la libération significative de 6-céto-PGF_{1 α} lorsqu'ils sont infusés pendant 5 min dans la circulation pulmonaire (6-céto-PGF_{1 α} : de 0.25 ± 0.09 ng/ml à 3.27 ± 1.10 ng/ml, $n=7$, $P<0.05$ pour l'endothéline-1 et 6-céto-PGF_{1 α} : de 0.44 ± 0.04 ng/ml à

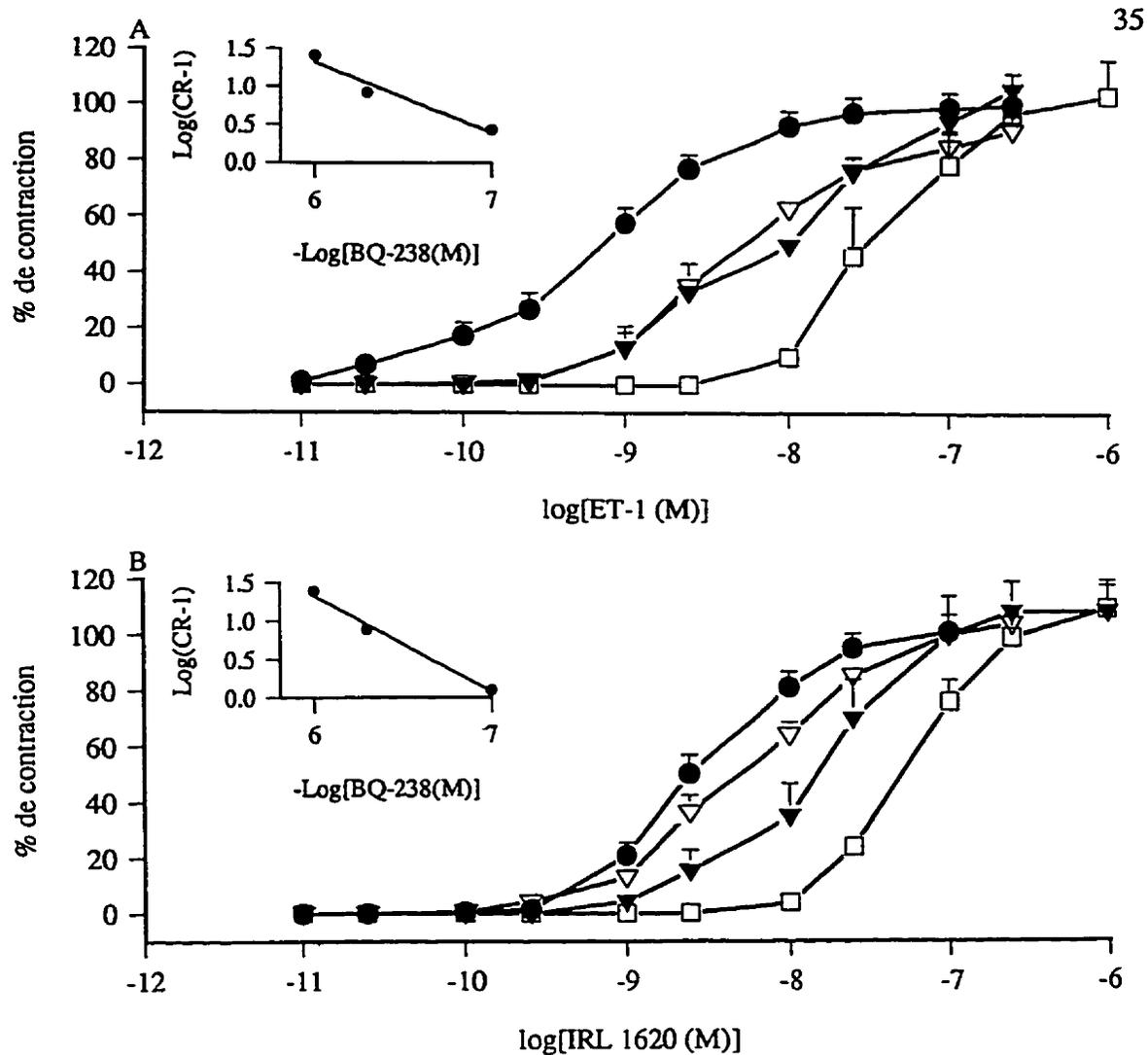


Figure 6 (A) Courbes concentration-réponse induites par l'ET-1 (●) en absence ou en présence de BQ-238 (▽:0.1 μM, ▼:0.5 μM, □:1 μM) sur l'artère carotide de lapin. Fenêtre: régression de Schild. PA_2 : 7.42 ± 0.22 , pente: 0.93 ± 0.22 , $r = 0.95$. (B) Courbes concentration-réponse cumulative induites par l'IRL 1620 (●) en absence ou en présence de BQ-238 (▽:0.1 μM, ▼:0.5 μM, □:1 μM) sur l'artère pulmonaire de lapin. Fenêtre: régression de Schild. PA_2 : 7.05 ± 0.14 , pente: 1.22 ± 0.22 , $r = 0.97$. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type d'au moins 5 expériences.

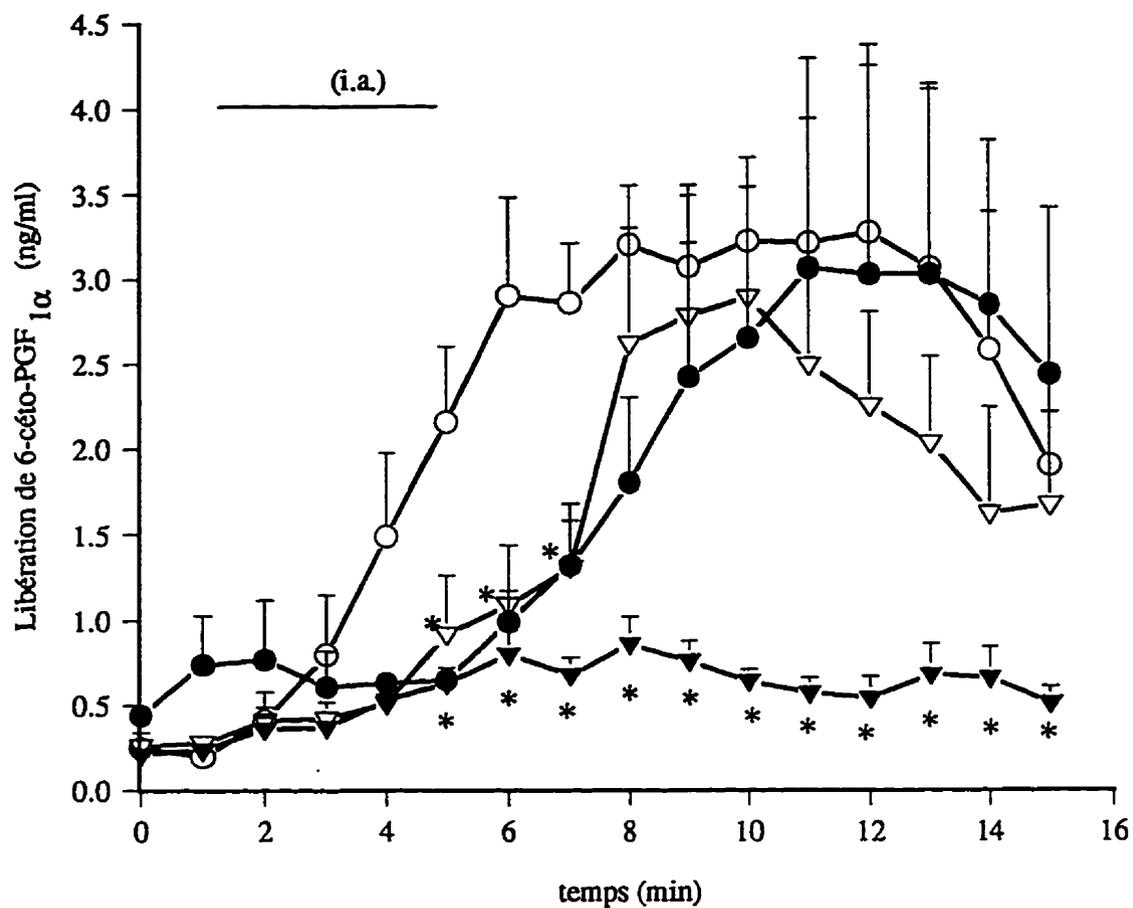


Figure 7 Profil de libération de 6-céto-PGF_{1α} (ng/ml) suite à l'administration (i.a.; 5 min) d'IRL 1620 (●:500 nM) et d'ET-1 (○:50 nM) en absence ou en présence de BQ-123 (▽:1 μM) ou de BQ-788 (▼:10 nM), dans le lobe pulmonaire inférieur gauche isolé et perfusé de lapin. Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de 5-7 expériences.

*P<0.05

3.06 ± 1.23 ng/ml, n=5, P<0.05 pour l'IRL 1620). La libération de 6-céto-PGF_{1α} étant maximale, 6 à 15 min et 9 à 15 min après le début de l'administration de l'endothéline-1 et de l'IRL 1620, respectivement. Un prétraitement de 15 min au BQ-788 (10 nM) abolie la relâche de prostacycline induite par l'endothéline-1 (50 nM)(6-céto-PGF_{1α}: 0.21 ± 0.03 ng/ml à 0.86 ± 0.16 ng/ml, n=7, P<0.05). Une infusion préalable de 15 min de BQ-123 (1 μM) ne diminue pas la libération de prostacycline causée par une infusion de 5 min d'endothéline-1 (10 nM) sauf en trois points (5-7 min)(6-céto-PGF_{1α}: 0.26 ± 0.05 ng/ml à 2.89 ± 0.65 ng/ml, n=7, P<0.05), superposant ainsi la courbe de libération obtenue par l'IRL 1620 (500 nM) (figure 7).

3.2.2 Étude de la libération de PGI₂ rénale induite par l'endothéline-1

La figure 8 représente le profil de libération de prostacycline rénale induit par l'infusion intra-artérielle de 5 min d'endothéline-1 (10 nM) en absence ou en présence de BQ-788 (A) ou d'angiotensine II (1 μM) en absence ou en présence de BQ-788 (B). L'endothéline-1 induit la libération significative de 6-céto-PGF_{1α}, un métabolite de la prostacycline lorsqu'elle est infusée pendant 5 min dans la circulation rénale (6-céto-PGF_{1α}: 0.35 ± 0.18 ng/ml à 3.19 ± 0.50 ng/ml, n=8, P<0.05). La libération de 6-céto-PGF_{1α} étant maximale de 5 à 7 min après le début de l'administration de l'endothéline-1. Le prétraitement de 15 min au BQ-788 (10 nM) n'affecte pas la libération de 6-céto-PGF_{1α} induite par l'endothéline-1 (10 nM)(6-céto-PGF_{1α}: 0.27 ± 0.09 ng/ml à 2.71 ± 0.35 ng/ml, n=8). La relâche de prostacycline induite par l'endothéline-1 (10 nM) est toutefois potentiée significativement par le BQ-788 (10 nM) au trois derniers points (13-15

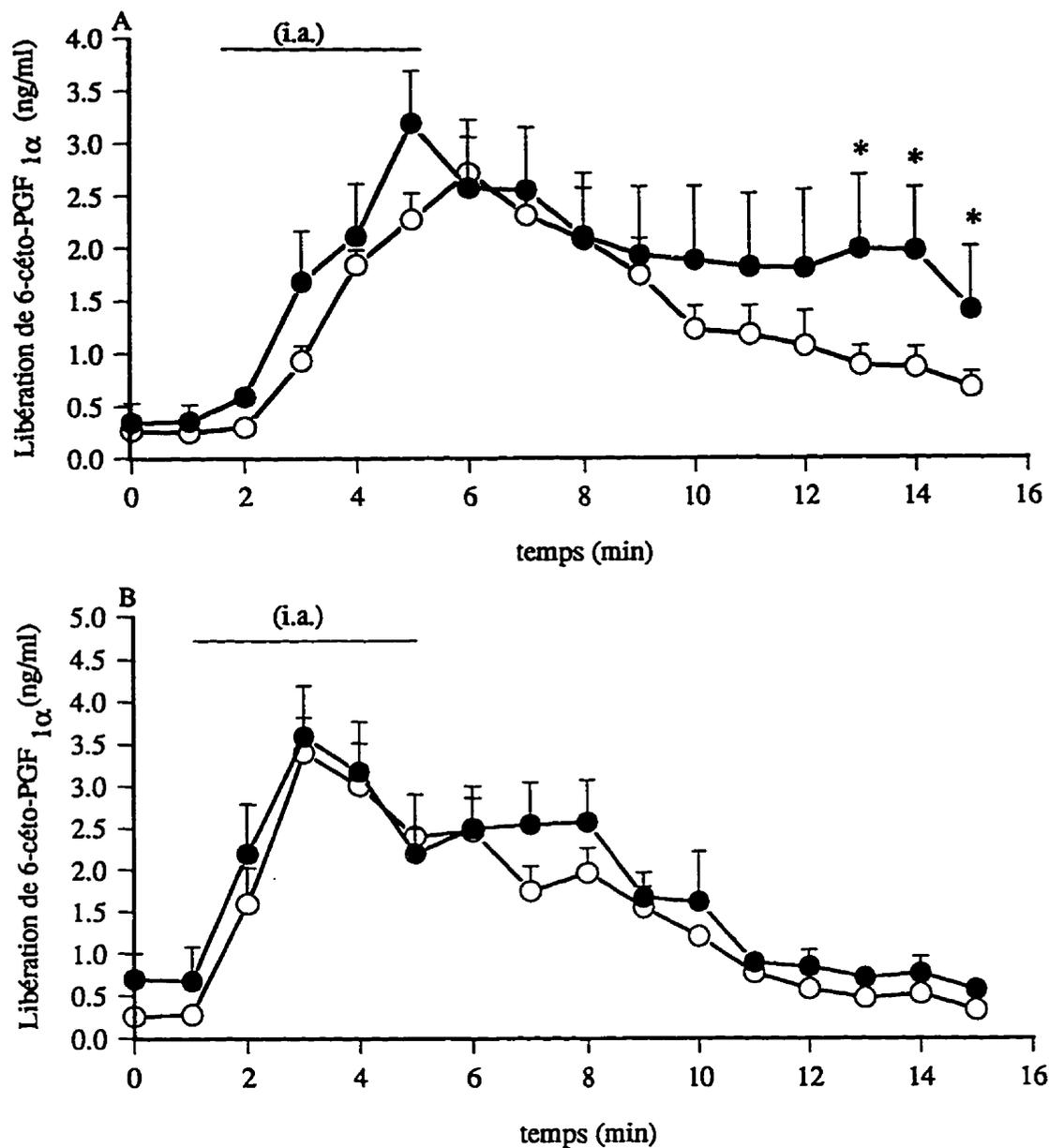


Figure 8 Profil de libération de 6-céto-PGF_{1α} (ng/ml) induite par l'infusion (i.a.; 5 min) (A) d'ET-1 (○:10 nM) en absence ou en présence de BQ-788 (●:10 nM) ou (B) d'Ang II (○:1 μM) en absence ou en présence de BQ-788 (●:10 nM), dans le rein isolé et perfusé de lapin. Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de 6-8 expériences.

*P<0.05

min)($P < 0.05$). L'Angiotensine II induit également la libération significative de 6-céto-PGF_{1 α} lorsqu'elle est infusée pendant 5 min dans la vascularisation rénale (6-céto-PGF_{1 α} : 0.70 ± 0.30 ng/ml à 3.59 ± 0.60 ng/ml, $n=6$, $P < 0.05$). La libération de 6-céto-PGF_{1 α} étant maximale de 3 à 4 min après le début de l'administration d'angiotensine II. De plus, le prétraitement de 15 min au BQ-788 (10 nM) n'affecte pas la libération de 6-céto-PGF_{1 α} induite par l'angiotensine II (1 μ M)(6-céto-PGF_{1 α} : 0.26 ± 0.05 ng/ml à 3.40 ± 0.42 ng/ml, $n=6$).

3.2.3 Étude de la réponse pressive rénale induite par l'endothéline-1

Les effets vasopresseurs de l'endothéline-1 lorsqu'elle est infusée 5 min dans la vascularisation rénale de lapin sont présentés à la figure 9. L'effet du BQ-788, du L-NAME et du BQ-788 co-perfusé avec le L-NAME sur ces réponses pressives sont également illustrés dans cette figure. La pression de perfusion basale dans le rein isolé et perfusé était de 40.2 ± 1.9 mmHg ($n=51$), avant l'administration des peptides (figures 7-13). Une série d'expériences contrôles montre que deux infusions successives (à intervalle de 60 min) d'endothéline-1 (10 nM) induisent une augmentation de pression de perfusion similaire (53 ± 2.5 mm Hg pour la première et 57 ± 3.0 mm Hg pour la deuxième, $n=3$). L'effet presseur de l'endothéline-1 (10 nM) est observé jusqu'à 10 min après l'arrêt de son infusion. L'augmentation concentration-dépendante de la pression de perfusion induite par l'endothéline-1 (0.5 nM, 1 nM et 10 nM) est illustrée à la figure 9. Le BQ-788 (10 nM) infusé 15 min avant la seconde infusion d'endothéline-1 augmente significativement (≈ 90 %) la réponse pressive aux trois concentrations d'agoniste.

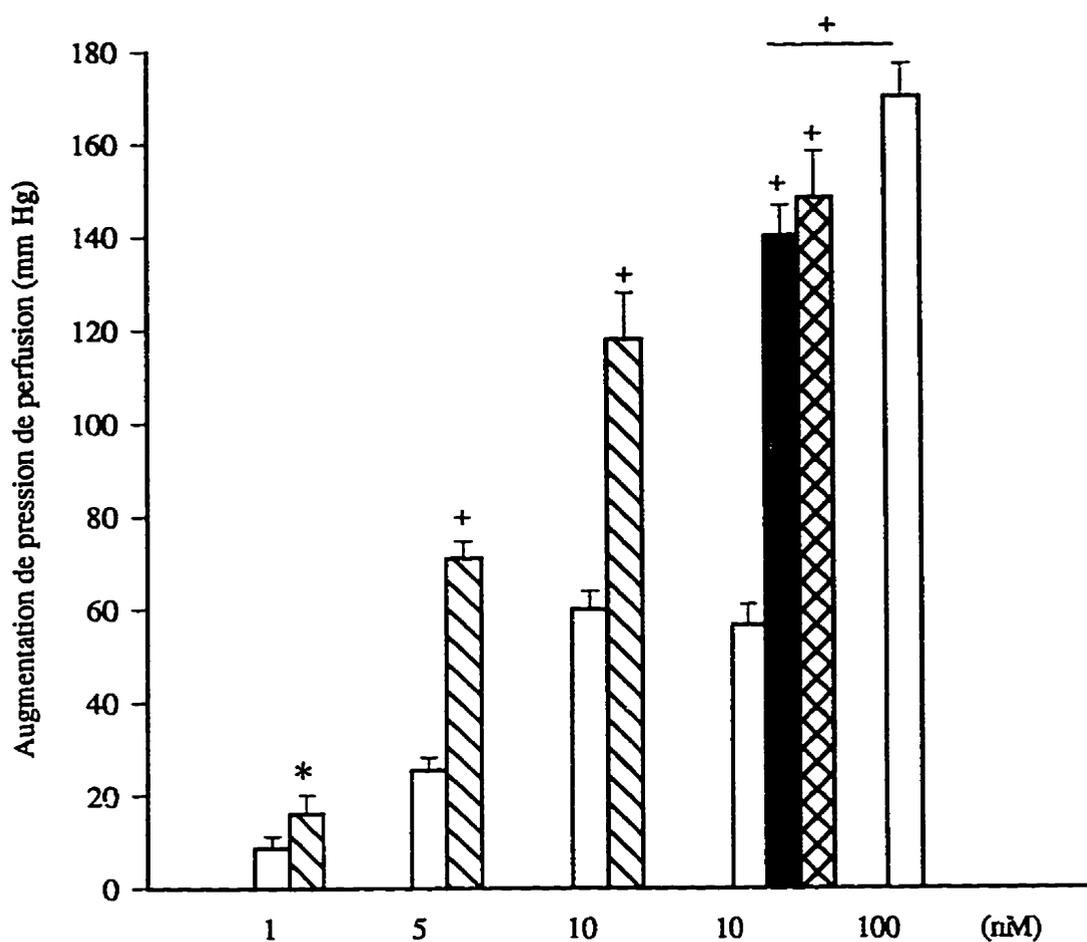


Figure 9 Variations de la pression de perfusion (mm Hg) induite par l'infusion (i.a.; 5 min) d'ET-1 (□:1 nM, 5 nM, 10 nM et 100 nM) en absence ou en présence de BQ-788 (▨:10 nM), de L-Name (■:100 μM) ou de BQ-788 (10 nM) co-infusé avec le L-Name (100 μM; ▩), dans le rein isolé et perfusé de lapin. Chaque colonne représente la moyenne ± l'écart-type de 3-6 expériences. *P<0.05; +P<0.01

De plus, la figure 9 montre qu'une infusion préalable de 30 min du L-NAME (100 μ M) potentialise significativement la réponse pressive induite par l'endothéline-1 (10 nM) (53.5 ± 6.7 mm Hg pour le contrôle; 133.4 ± 7.9 mm Hg en présence de L-NAME; $n=6$, $P<0.01$). Dans les reins prétraités avec 100 μ M de L-NAME, l'endothéline-1 (10 nM) induit un effet presseur potentialisé qui n'est pas significativement augmenté par le BQ-788 (10 nM) (148.6 ± 10.1 mm Hg en présence de BQ-788 co-perfusé avec le L-NAME, $n=5$). Afin de s'assurer que la capacité vasoconstrictive n'est pas atteinte avec l'endothéline-1 (10 nM) dans les reins prétraités au L-NAME, une infusion contrôle de l'agoniste (100 nM) est effectuée (170 ± 7 mm Hg; $n=3$, $P<0.01$ lorsque comparé avec l'endothéline-1 (10 nM) en présence de L-NAME).

La figure 10 illustre les effets vasopresseurs de l'IRL 1620 et de l'angiotensine II lorsqu'ils sont infusés 5 min dans la vascularisation artérielle du rein de lapin. L'effet du L-NAME sur les réponses pressives induites par l'IRL 1620 et l'effet du L-NAME et du BQ-788 sur les réponses pressives induites par l'angiotensine II sont également représentés dans la figure 8. Une infusion intra-artérielle d'IRL 1620 (0.1 μ M) n'induit pas d'augmentation de pression de perfusion rénale en absence ou en présence de L-NAME (100 μ M) (1.25 ± 0.90 mm Hg en absence et 2.25 ± 0.90 mm Hg en présence de L-NAME). De plus, l'augmentation de pression de perfusion induite par l'angiotensine II (1 μ M) n'est pas affectée par le BQ-788 (10 nM) (29.0 ± 4.25 mm Hg en absence et 23.7 ± 4.18 mm Hg en présence de BQ-788). Par contre, la pression de perfusion induite par l'angiotensine II (1 μ M) est significativement potentialisée par le L-NAME (100 μ M) (22.0 ± 1.6 mm Hg en absence et 50.0 ± 11.0 mm Hg en présence de L-NAME).

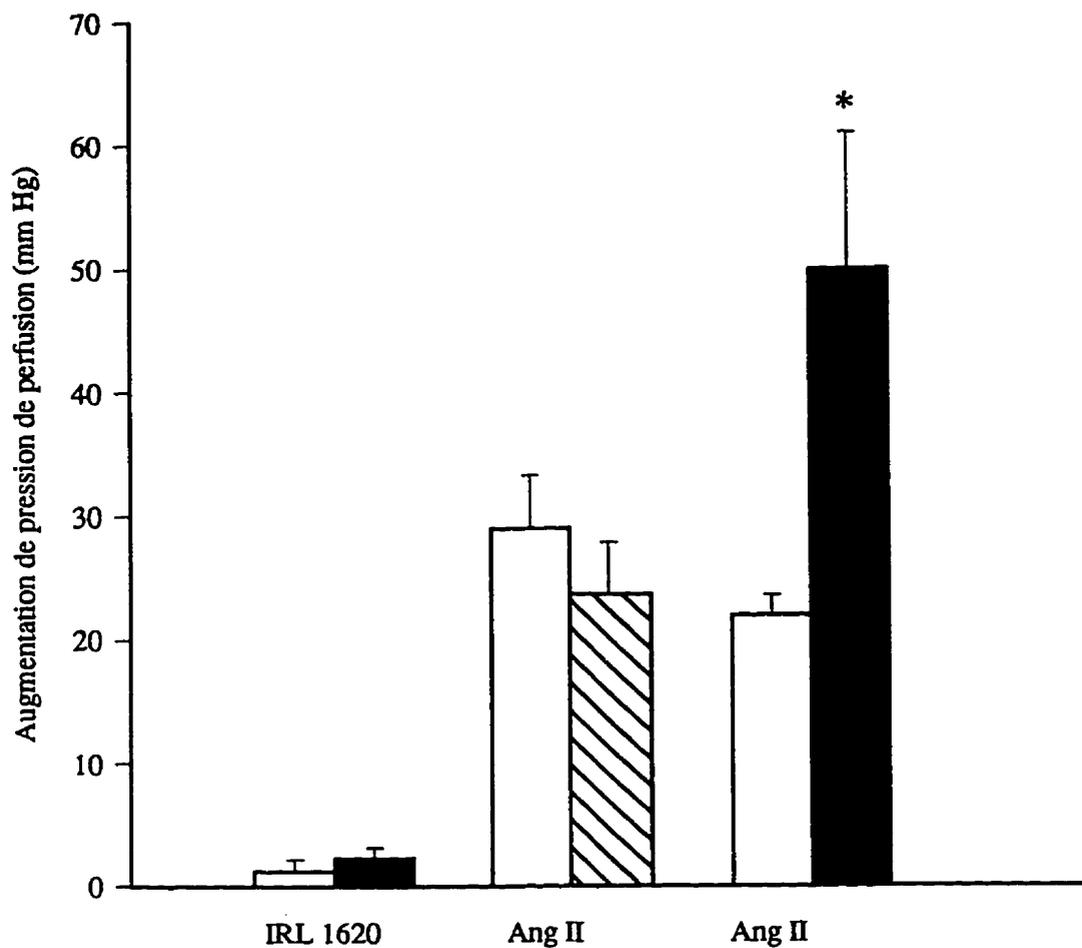


Figure 10 Variations de la pression de perfusion (mm Hg) induite par l'infusion (i.a.; 5 min) d'IRL 1620 (0.1 μ M) ou d'Ang II (1 μ M) en absence ou en présence de L-Name (■:100 μ M) ou induite par l'Ang II (1 μ M) en absence ou en présence de BQ-788 (▨:10 nM), dans le rein isolé et perfusé de lapin. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'écart-type de 4-6 expériences. *P<0.05

3.3 AFFINITÉS APPARENTES DES ANTAGONISTES DE L'ENDOTHÉLINE CONTRE L'EFFET PRESSEUR RÉNAL DE L'ENDOTHÉLINE-1

Tel que démontré à la figure 11, un prétraitement de 15 min du rein au BQ-928 (100 nM, 500 nM et 1000 nM) au BQ-238 (10 nM, 50 nM, 100 nM et 500 nM) au SB 209670 (1 nM, 5 nM, 50 nM et 100 nM) ou au BMS 182874 (0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M) cause une réduction concentration-dépendante de la pression de perfusion induite par la seconde infusion d'endothéline-1 (10 nM) par rapport à la première infusion contrôle. Un IC_{50} de 0.4 μ M pour le BQ-928, de 0.09 μ M pour le BQ-238, de 0.01 μ M pour le SB 209670, de 0.4 μ M pour le BQ-123 et de 2 μ M pour le BMS 182874 sont calculés à partir d'une régression linéaire (tableau V). Dans une autre série d'expériences, la réponse pressive rénale à l'infusion intra-artérielle de 5 min d'angiotensine II (1 μ M) n'est pas affectée par le prétraitement de 15 min de chacun des antagonistes utilisés dans cette étude (tableau V).

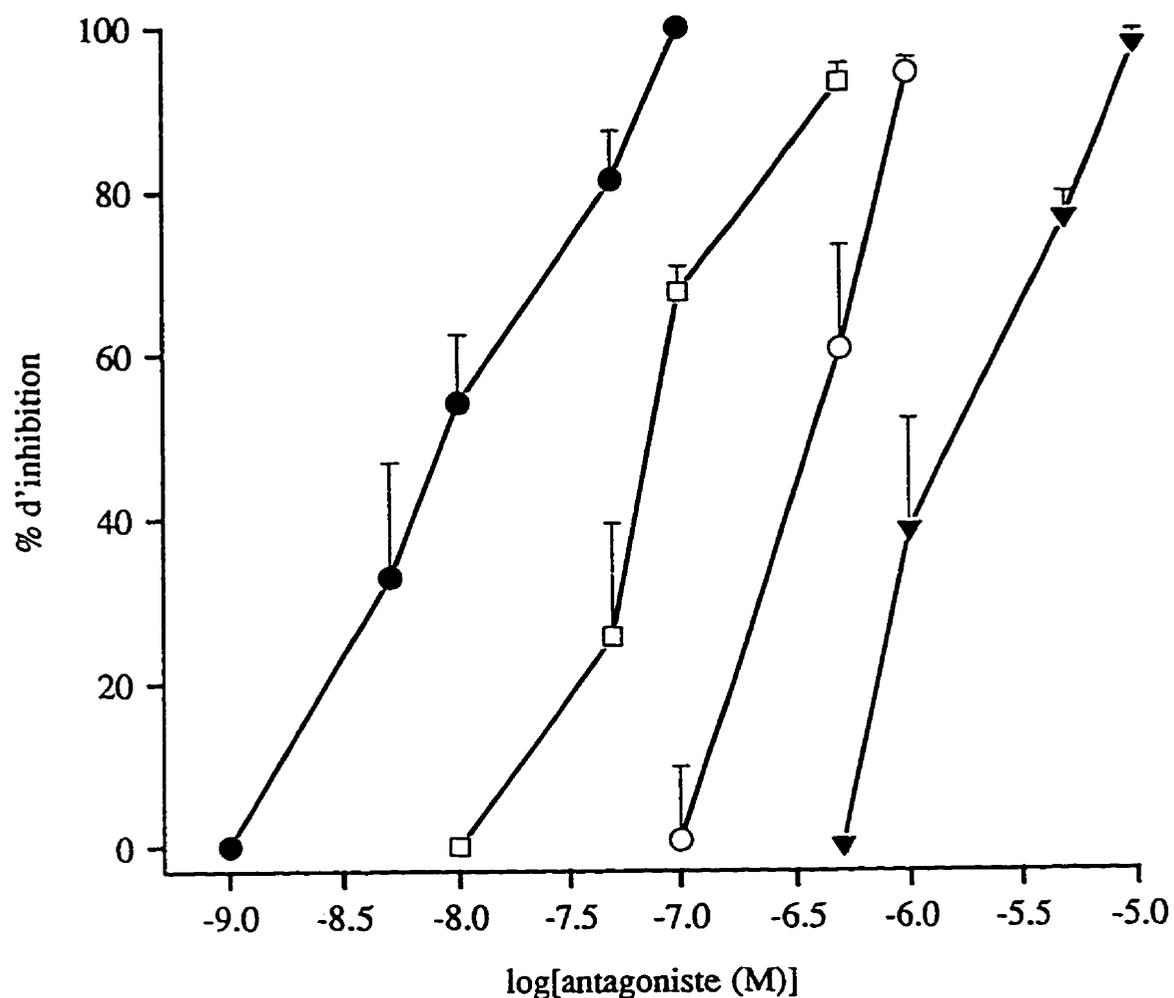


Figure 11 Caractéristiques d'antagonisme (% d'inhibition), concentration-dépendante, du BQ-928 (○:100 nM, 500 nM et 1000 nM), du BQ-238 (□:10 nM, 50 nM, 100 nM et 500 nM), du BMS 182874 (▼:1000 nM, 5000 nM et 10 000 nM) et du SB 209670 (●:1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM et 100 nM) contre l'effet presseur de l'ET-1 (10 nM)(i.a.; 5 min), dans le rein isolé et perfusé de lapin. Chaque point représente la moyenne de 4-10 expériences.

TABLEAU V

Paramètres pharmacologiques décrivant les activités d'antagonistes aux endothélines sur l'artère carotide, l'artère pulmonaire et dans le rein isolé et perfusé de lapin

Antagoniste	BQ-123	BMS-182874	BQ-788	BQ-928	BQ-238	SB 209670
pA_2						
ACL	6.41+	6.21	Inactif	7.22	7.42	9.22
APL	Inactif	Inactif	9.01+	8.43	7.06	8.09
IC_{50}						
RL (Ang II)	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif
RL (ET-1)	0.4 μ M *	2 μ M	Inactif	0.4 μ M	0.09 μ M	0.01 μ M

ACL: Artère carotide de lapin (agoniste:ET-1); préparation de type ET_A

APL: Artère pulmonaire de lapin (agoniste:IRL 1620); préparation de type ET_B

IC_{50} : Concentration molaire d'antagoniste nécessaire pour réduire de 50 % la réponse pressive de l'ET-1 (10 nM)

pA_2 : Logarithme négatif de la concentration molaire d'antagoniste requise pour réduire l'effet d'une concentration double d'agoniste à celui d'une dose simple

RL: Rein isolé et perfusé de lapin

(): Agoniste utilisé

*: Tiré de TÉLÉMAQUE *et al.* (1993)

+: Tiré de CALO *et al.* (1996)

3.4 ÉTUDE DE LA RÉACTIVITÉ VASCULAIRE RÉNALE A L'ENDOTHÉLINE-1 SUITE AU RETRAIT DES ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES

La figure 12A illustre trois infusions successives de 5 min d'endothéline-1 (10 nM) effectuées à intervalle d'une heure dans le lit vasculaire rénal de lapin. La deuxième infusion de l'agoniste induit une augmentation de la pression de perfusion similaire à la première (86 ± 5.6 mm Hg pour la première et 99.7 ± 9.6 mm Hg pour la seconde, $n=10$). Enfin, la dernière administration du peptide produit une élévation significative (39.1 ± 7.8 %) de la pression de perfusion par rapport à la première (86 ± 5.6 mm Hg pour la première et 117 ± 5.3 mm Hg pour la dernière, $P<0.05$, $n=10$).

Une autre série d'expériences contrôles (figure 12B) montre que trois infusions intra-artérielle successives de 5 min d'angiotensine II (1 μ M) induisent une augmentation de pression de perfusion rénale similaire (27.2 ± 3.0 mm Hg pour la première, 23 ± 3.3 mm Hg pour la seconde et 25.7 ± 5.2 mm Hg pour la dernière, $n=6$).

La pression de perfusion de l'endothéline-1 (10 nM) est réduite d'au moins 60 % par le prétraitement du rein au BQ-928 (0.5 μ M), SB 209670 (0.05 μ M), BQ-238 (0.1 μ M) ou BMS 182874 (5 μ M) alors qu'elle est potentiée par le BQ-788 (0.01 μ M)(Figure 13A).

La figure 13B illustre la réponse pressive du rein de lapin à la troisième infusion intra-artérielle de 5 min d'endothéline-1 (10 nM), 60 min après la fin du traitement de 15 min au BQ-123, BMS 182874, BQ-788, BQ-928, BQ-238 ou SB 209670. Pour les reins

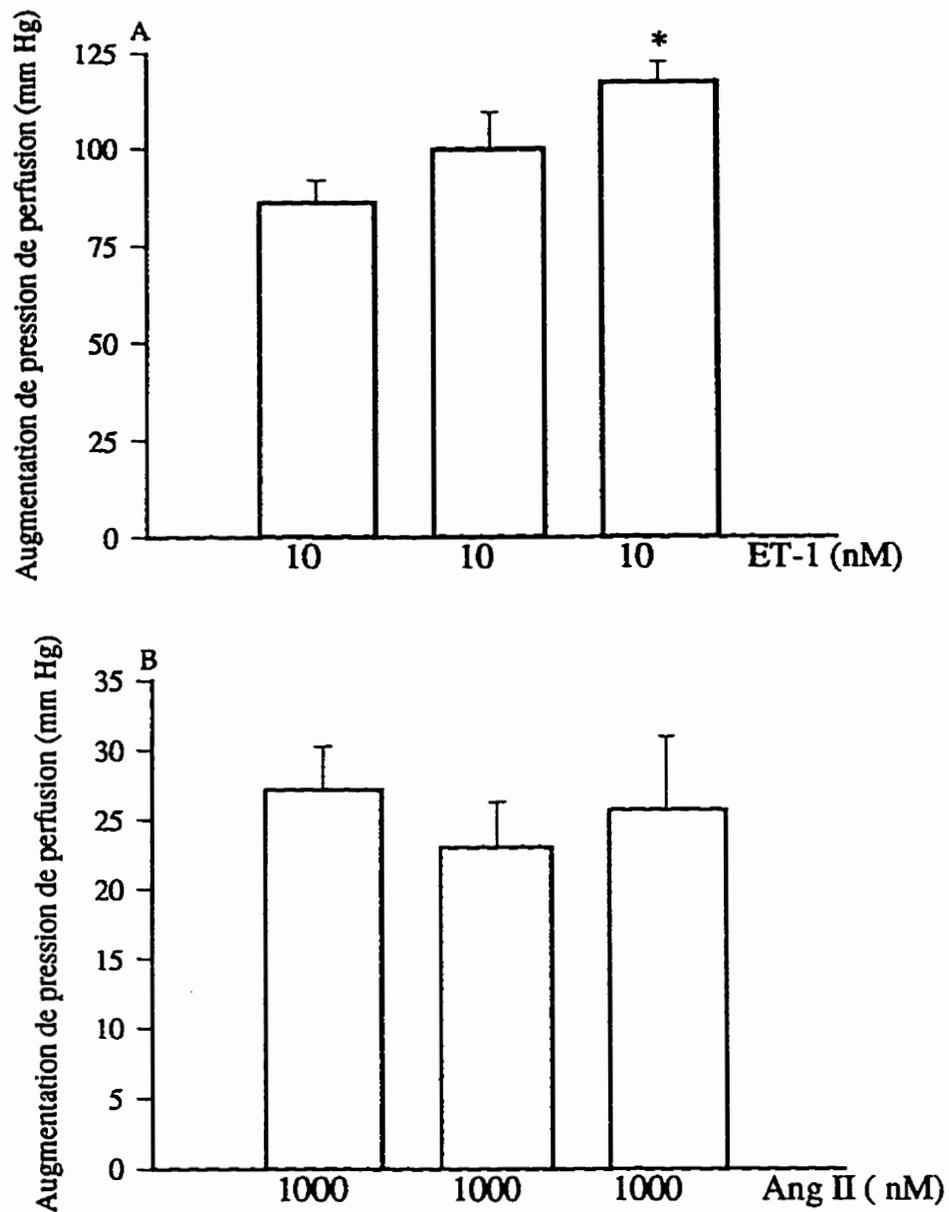


Figure 12 Variations de la pression de perfusion (mm Hg) induite par trois infusions (i.a.; 5 min) successives d'ET-1 (10 nM)(A) et d'Ang II (1000 nM)(B), dans le rein isolé et perfusé de lapin. Chaque colonne représente la moyenne \pm l'écart-type de 6-10 expériences. *P<0.05

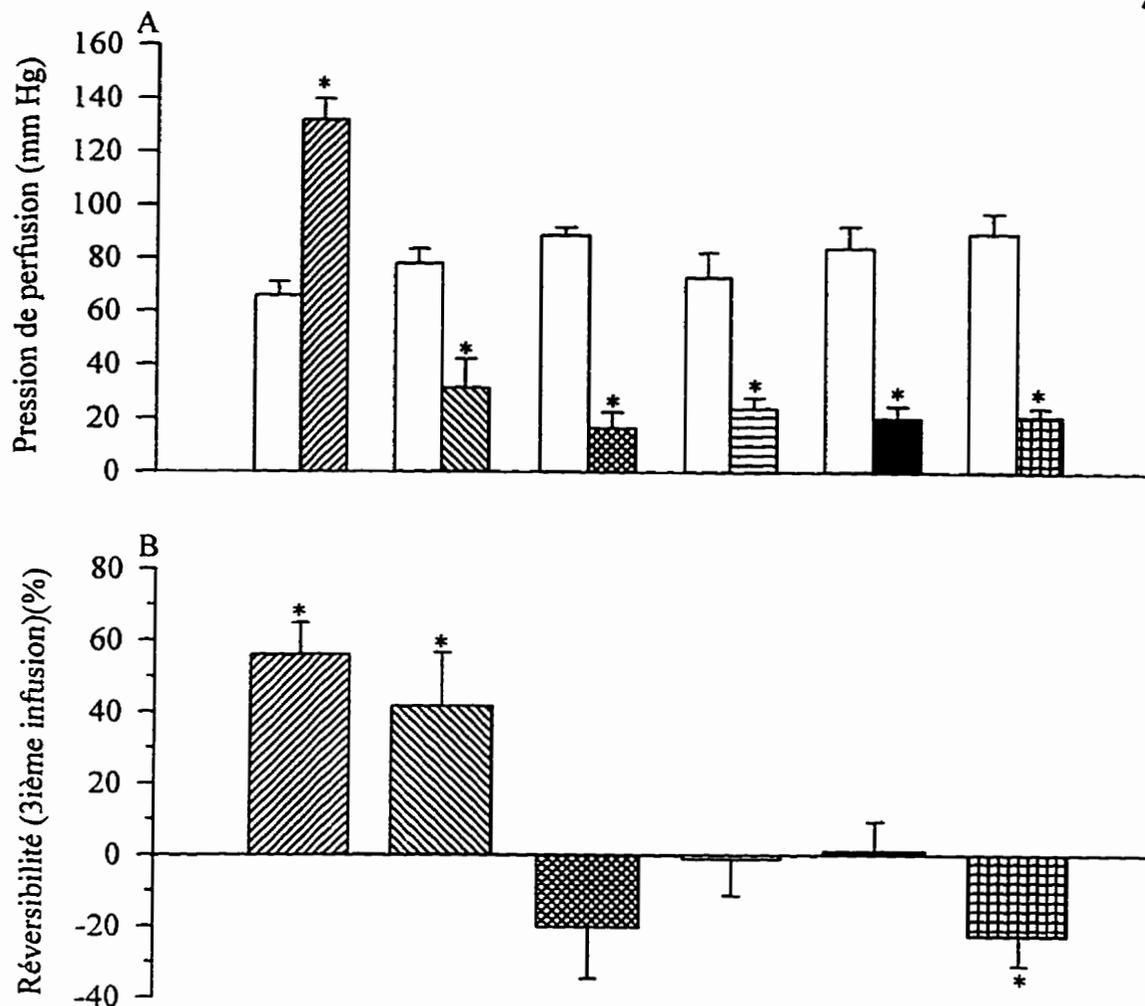


Figure 13 (A) Variations de la pression de perfusion (mm Hg) de l'ET-1 (10 nM)(i.a.; 5 min) en absence (□) ou en présence de BQ-788 (▨:0.01 μM), BQ-928 (▩:0.5 μM), SB 209670 (▣:0.05 μM), BQ-238 (▧:0.1 μM), BQ-123 (▦:1 μM) ou BMS 182874 (▩:5 μM) dans le rein isolé et perfusé de lapin. *P<0.05 comparé au témoin. (B) Réponse (%) du rein de lapin à la troisième administration d'ET-1 (10 nM), 60 min après le traitement au BQ-788 (▨), BQ-928 (▩), SB 209670 (▣), BQ-238 (▧), BQ-123 (▦) ou BMS 182874 (▩). *P<0.05 comparé à la troisième infusion témoin d'ET-1 (10 nM). Chaque colonne représente la moyenne ± l'écart-type de 5-8 expériences.

traités au BQ-788 (10 nM), BQ-928 (500 nM) ou BQ-123 (1 μ M) co-perfusé avec le BQ-788 (10 nM)(Tableau VI) lors de la deuxième infusion d'endothéline-1 (10 nM), la troisième administration du peptide produit une augmentation significative de la réponse pressive par rapport au contrôle de trois infusions successives d'endothéline-1 (10 nM)(reins traités au BQ-788: 56 ± 9.0 %, $n=8$, $P<0.05$, reins traités au BQ-928: 41.6 ± 15 %, $n=6$, $P<0.05$ et reins traités au BQ-123 co-perfusé avec le BQ-788: 34.2 ± 10.6 %, $n=4$, $P<0.05$). Les reins traités au BQ-238 (100 nM), BQ-123 (1 μ M) ou SB 209670 (50 nM) lors de la seconde infusion d'endothéline-1 (10 nM), ont une réponse à l'endothéline-1 à la troisième infusion qui n'est pas significativement différente du contrôle de trois infusions successives d'endothéline-1 (10 nM)(reins traités au BQ-238: -1.1 ± 10.3 %, $n=5$, reins traités au BQ-123: 1 ± 8.4 %, $n=6$ et reins traités au SB 209670: -20.4 ± 14.3 %, $n=7$). La réponse pressive induite par l'endothéline-1 suite au retrait du BMS 182874 (5 μ M) est réduite significativement par rapport aux reins non-traités (reins traités au BMS 182874: -22.7 ± 8.3 %, $n=7$, $P<0.05$). Les variations de la réponse pressive de la troisième infusion d'endothéline-1 (10 nM) des reins traités aux différents antagonistes sont comparées, dans le tableau VI, en fonction des affinités apparentes (pA_2) de ces composés sur les récepteurs de type ET_A et de type ET_B tel que déterminé sur l'artère carotide et pulmonaire de lapin.

TABLEAU VI

Corrélation entre les propriétés anti-ET_B d'antagonistes aux endothélines et l'hyperréactivité de la réponse pressive de l'endothéline-1 (ET-1) suite au retrait de ces antagonistes dans le rein isolé et perfusé de lapin

Antagoniste	pA ₂ (ACL)	pA ₂ (APL)	Réponse pressive de la troisième infusion d'ET-1 (10 nM) (%) (RL)
BQ-788	-	9.01*	56
BQ-123 + BQ-788	6.41*	9.01*	34.2
BQ-928	7.22	8.43	41.6
SB 209670	9.22	8.09	-20.4
BQ-238	7.42	7.05	-1.1
BQ-123	6.41*	-	1
BMS 182874	6.20	-	-22.7

ACL: Artère carotide de lapin (agoniste:ET-1); préparation de type ET_A

APL: Artère pulmonaire de lapin (agoniste:IRL 1620); préparation de type ET_B

pA₂: Logarithme négatif de la concentration molaire d'antagoniste requise pour réduire l'effet d'une concentration double d'agoniste à celui d'une dose simple

RL: Rein isolé et perfusé de lapin

*: Tiré de CALO *et al.* (1996)

DISCUSSION

L'endothéline agit par le biais de récepteurs qui lui sont spécifiques pour induire différents effets vasculaires comme une vasoconstriction ou une vasodilatation. Il a également été établi que l'activation des récepteurs des endothélines peut promouvoir la libération de substances endogènes vasomodulatrices tel le facteur relaxant d'origine endothéliale. Les récepteurs de type ET_B situés sur l'endothélium vasculaire médient une libération d'oxide nitrique (EDRF). Les résultats présentés dans cette étude montrent la pharmacologie cardiovasculaire des récepteurs de type ET_B endothéliaux et rénaux chez le lapin.

4.1 CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE D'ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES SUR LES RÉCEPTEURS DE TYPE ET_A OU DE TYPE ET_B

Tel que mentionné dans l'introduction, il existe maintenant de nombreux outils pharmacologiques pour caractériser les récepteurs aux endothélines. Dans cette étude, nous avons caractérisé certains antagonistes aux endothélines sur des préparations vasculaires et isolées afin de les utiliser pour la caractérisation des récepteurs de type ET_B rénaux responsable de la libération d'EDRF.

Sur l'artère carotide de lapin, une préparation monoréceptorielle de type ET_A, l'antagoniste non-peptidique et sélectif des récepteurs de type ET_A, le BMS 182874

(STEIN *et al.*, 1994) inhibe de façon concentration dépendante et compétitive les contractions induites par l'endothéline-1. L'affinité apparente (pA_2 : 6.20) de cet antagoniste, que nous avons évaluée à l'aide de l'artère carotide de lapin, correspond à celle rapportée par STEIN *et al.* (1994) pour ce composé sur cette même préparation (pA_2 : 6.28). De plus, le BMS 182874 possède sur le récepteur de type ET_A de l'artère carotide de lapin une affinité apparente très proche de celle rapporté par CALO *et al.* (1996) sur cette même préparation pour un antagoniste peptidique et sélectif des récepteurs de type ET_A , le BQ-123 (pA_2 : 6.41). Le BMS 182874 à forte concentration n'a pas affecté les contractions induites par l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin. Nos résultats démontrent donc que le BMS 182874 est un antagoniste compétitif et sélectif des récepteurs de type ET_A .

Sur l'artère carotide de lapin, une préparation monoréceptorielle de type ET_A , l'antagoniste non-peptidique et mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B , le SB 209670 (OHLSTEIN *et al.*, 1994) inhibe de façon concentration-dépendante et compétitive les contractions induites par l'endothéline-1. L'affinité apparente (pA_2 : 9.22) de cet antagoniste, que nous avons déterminée sur les récepteurs de type ET_A de l'artère carotide de lapin, correspond à celle rapportée par OHLSTEIN *et al.* (1994) pour ce composé sur une autre préparation monoréceptorielle de type ET_A ; l'aorte de rat (pA_2 : 9.39). Le SB 209670 inhibe également de façon concentration-dépendante et compétitive les contractions induites par l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin; une préparation monoréceptorielle de type ET_B . L'affinité apparente de cet antagoniste (pA_2 : 8.09), que nous avons calculée sur les récepteurs de type ET_B de l'artère pulmonaire de lapin, ne

correspond pas exactement à celle rapportée par OHLSTEIN *et al.* (1994) pour ce composé sur cette même préparation (pA_2 : 7.26). Cette différence s'explique par le fait que l'agoniste utilisé par ce groupe est un composé non-sélectif des récepteurs de type ET_A/ET_B , l'endothéline-1. D'après CALO *et al.* (1996), l'artère pulmonaire de lapin est une préparation qui contient 80 % de récepteurs de type ET_B et 20 % de récepteurs de type ET_A . Nos résultats démontrent que le SB 209670 est un antagoniste non-peptidique et compétitif possédant une plus forte affinité pour les récepteurs de type ET_A que pour les récepteurs de type ET_B .

Sur l'artère carotide de lapin, une préparation monoréceptorielle de type ET_A , l'antagoniste peptidique et mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B , le BQ-928 (FUKAMI *et al.*, 1995) inhibe de façon concentration-dépendante et compétitive les contractions de l'endothéline-1. L'affinité apparente (pA_2) de cet antagoniste, que nous avons calculée sur les récepteurs de type ET_A de l'artère carotide de lapin est de 7.22. Le BQ-928 inhibe également de façon concentration-dépendante et compétitive les contractions induites par l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin; une préparation monoréceptorielle de type ET_B . L'affinité apparente (pA_2) de cet antagoniste, que nous avons déterminée sur les récepteurs de type ET_B de l'artère pulmonaire de lapin est de 8.43. Nos résultats démontrent qu'à l'inverse du SB 209670, le BQ-928 est un antagoniste qui possède une plus forte affinité pour les récepteurs de type ET_B que pour les récepteurs de type ET_A . Ces résultats confirment ceux obtenus par FUKAMI *et al.* (1995) qui ont rapporté que le BQ-928 inhibe la liaison de l' $[^{125}I]$ endothéline-1 au récepteur de type ET_A , des membranes du muscle lisse de l'aorte de porc, avec un IC_{50} de 3.8 nM et qu'il inhibe la liaison de

l' [¹²⁵I]endothéline-1 au récepteur de type ET_B, des membranes cérébrales de porc, avec un IC₅₀ de 0.81 nM, démontrant ainsi que le BQ-928 possède une plus grande affinité pour les récepteurs de type ET_B que pour ceux de type ET_A.

Le BQ-238, un antagoniste peptidique et non-sélectif des récepteurs de type ET_A/ET_B inhibe de façon concentration-dépendante et compétitive les contractions induites par l'endothéline-1 sur l'artère carotide de lapin, une préparation monoréceptorielle de type ET_A. L'affinité apparente (pA₂) de cet antagoniste que nous avons déterminée sur les récepteurs de type ET_A de l'artère carotide de lapin est de 7.42. Le BQ-238 inhibe également de façon concentration-dépendante et compétitive les contractions de l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin; une préparation monoréceptorielle de type ET_B. Nous avons calculé, pour ce composé, une affinité apparente (pA₂) de 7.05 sur les récepteurs de type ET_B de l'artère pulmonaire de lapin. Nos résultats démontrent qu'à l'inverse du BQ-928, le BQ-238 est un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B qui possède une plus grande affinité pour le récepteur de type ET_A que pour le récepteur de type ET_B.

Donc sur des modèles de tissus isolés *in vitro*, où seulement un type de récepteur des endothélines est sollicité à produire un effet (préparation monoréceptorielle), nous avons déterminé que le BMS 182874 est un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A alors que le SB 209670 et le BQ-238, à l'inverse du BQ-928, sont deux antagonistes mixtes possédant une plus grande affinité pour les récepteurs de type ET_A que pour ceux de type ET_B.

Tous ces antagonistes sont inactifs contre la réponse de l'angiotensine II

démontrant ainsi leur spécificité.

Des tissus provenant d'une même espèce sont utilisés pour éviter les différences inter-espèces de puissance des antagonistes sur les récepteurs de type ET_B (WARNER *et al.*, 1993).

4.2 LES RÉCEPTEURS DE TYPE ET_B MÉDIENT UNE LIBÉRATION D'EDRF DANS LA VASCULARISATION RÉNALE DE LAPIN

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé, avec l'aide d'agonistes et d'antagonistes sélectifs, les récepteurs de type ET_B responsables de la libération d'EDRF à partir du rein isolé et perfusé de lapin.

Dans le poumon isolé et perfusé de lapin nos résultats supportent les observations de MC MURDO *et al.* (1993) qui ont suggéré que la propriété d'inhibition de l'aggrégation des plaquettes de l'endothéline-1, *in vivo* chez le lapin, est principalement dû à la libération de prostacycline suivant l'activation des récepteurs de type ET_B. En effet, nous avons observé que l'IRL 1620, un agoniste sélectif des récepteurs de type ET_B induit une libération de prostacycline pulmonaire chez le lapin. De plus, le BQ-123 réduit de façon très modérée la libération de prostacycline pulmonaire induite par l'endothéline-1 alors qu'un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_B, le BQ-788 inhibe à 75 % la libération de prostacycline pulmonaire induite par l'endothéline-1. Ces résultats démontrent qu'il y a une contribution prédominante des récepteurs de type ET_B dans la libération de prostacycline à partir du poumon isolé et perfusé de lapin. On ne peut

cependant pas exclure une participation, bien que mineure, des récepteurs de type ET_A dans ce phénomène, étant donné l'effet significatif de l'antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A (seulement à la cinquième, sixième et septième minutes).

Donc, sur un modèle d'organe isolé, nous avons déterminé que le BQ-788, un antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_B utilisé à une concentration de 10 nM, est capable d'inhiber la libération de prostacycline pulmonaire induite par une infusion de 5 min d'endothéline-1 (50 nM). Cet outil est donc acceptable pour caractériser de façon exhaustive les récepteurs de type ET_B dans un système vasculaire et complexe tel le poumon de lapin.

Il en va tout autrement dans la vascularisation rénale de lapin où nos résultats montrent que le BQ-788 (10 nM) n'altère pas la propriété de libération de prostacycline de l'endothéline-1 (10 nM). Nos observations sont en accord avec celles rapportées par TÉLÉMAQUE et al. (1993) qui ont démontré que la relâche de prostacycline induite par l'infusion d'endothéline-1 dans le rein de lapin est médié par les récepteurs de type ET_A. La localisation exacte des récepteurs de type ET_A, responsable de cette libération de prostacycline, n'est pas encore identifiée. TÉLÉMAQUE *et al.* (1993) suggèrent toutefois que ces récepteurs sont situés principalement sur le muscle lisse vasculaire rénal. La potentiation de la relâche de prostacycline par le BQ-788 peut s'expliquer par le déplacement de l'endothéline-1 sur le récepteur de type ET_A, toutefois cette hypothèse doit être vérifiée. Nous avons également démontré la spécificité du BQ-788 puisque ce dernier est resté inactif contre la propriété de libération de prostacycline rénale de l'angiotensine II.

Les propriétés pharmacologiques du BQ-788 nous permettent de détecter la présence de récepteurs de type ET_B fonctionnels dans la vascularisation rénale de lapin. Le blocage des récepteurs de type ET_B augmente la réponse pressive à l'endothéline-1, via un mécanisme sensible à un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase constitutive, le L-NAME. Ce résultat suggère que la réponse pressive induite par l'endothéline-1 dans le rein isolé de lapin est modulée par la libération d'oxyde nitrique, via l'activation des récepteurs de type ET_B , comme il a été initialement proposé par WARNER *et al.* (1989). L'activation des récepteurs de type ET_A et de type ET_B par l'administration d'endothéline-1 exogène peut donc mener à un antagonisme physiologique des propriétés vasoactives du peptide, dans la vascularisation rénale de lapin. Le blocage des récepteurs de type ET_B , responsable de la libération d'oxyde nitrique, peut augmenter la sensibilité de la vascularisation rénale à ce puissant agent vasoconstricteur. De plus, l'utilisation d'antagonistes, interférant avec les activités médiés par les récepteurs de type ET_B , peut être néfaste pour l'homéostasie rénale en potentialisant la vasoconstriction médiée par les récepteurs de type ET_A de cet organe. Le fait que le BQ-788 soit incapable de réduire la réponse pressive à l'endothéline-1 dans les reins traités avec le L-NAME suggère que seulement les récepteurs de type ET_A sont impliqués dans les propriétés vasoconstrictives rénales du peptide.

Cette suggestion est également supportée par le fait que l'IRL 1620, un agoniste des récepteurs de type ET_B , reste inactif comme agent presseur dans les reins non-traités ou traités avec le L-NAME. Comme le L-NAME potentie la réponse pressive rénale à l'endothéline-1 et à l'angiotensine II, nous pouvons supposer qu'une libération d'oxyde

nitrique peut également être induite par une variation du flot. Par contre, la propriété vasoconstrictrice de l'angiotensine II n'est pas affectée par le BQ-788, illustrant ainsi la caractéristique de spécificité de cet antagoniste des récepteurs de type ET_B.

4.3 CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE D'ANTAGONISTES AUX ENDOTHÉLINES CONTRE L'EFFET PRESSEUR RÉNAL DE L'ENDOTHÉLINE-1

Dans la troisième partie de cette étude, nous avons caractérisé les antagonistes aux endothélines dans une préparation qui possède une résistance dépendante des récepteurs de type ET_A, le rein de lapin.

Nos résultats démontrent que dans la vascularisation rénale de lapin, les effets presseurs induits par l'endothéline-1 sont fortement inhibés, de façon concentration-dépendante, par les antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A et non-sélectifs des récepteurs de type ET_A/ET_B. Par contre, les réponses pressives induites par l'angiotensine II n'étaient pas modifiées en présence de ces antagonistes, suggérant ainsi la spécificité de tous ces composés. En terme de puissance, les antagonistes sont classés de la façon suivante:

SB 209670 > BQ-238 > BQ-928 = BQ-123 > BMS 182874 >>>BQ-788.

4.4 RÉVERSIBILITÉ DE L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS DE TYPE ET_B ENDOTHÉLIAUX

Pour terminer cette étude, nous avons observé les propriétés de réversibilité des récepteurs de type ET_B endothéliaux rénaux suite au retrait des antagonistes aux endothélines.

La potentiation, de l'effet presseur de l'endothéline-1 à la troisième infusion contrôle de ce peptide par rapport à la première infusion, n'est pas observée à la troisième infusion contrôle d'angiotensine II. Ce résultat nous suggère une tachyphylaxie des récepteurs de type ET_B, suite à l'exposition prolongée de l'endothéline-1. Une diminution de l'activité vasodilatatrice de ces récepteurs suite à l'exposition répétée d'un agoniste a été rapporté par LE MONNIER DE GOUVILLE *et al.* (1990).

Soixante minutes après l'exposition à un mélange de BQ-123 et BQ-788, la réponse pressive à l'endothéline-1 est significativement augmentée, comparé à la réponse obtenue après un traitement au BQ-123 seul. Ces expériences confirment que dans un système où la réponse pressive à l'endothéline-1 est médiée via l'activation des récepteurs de type ET_A comme la vascularisation rénale de lapin, le blocage des récepteurs de type ET_B est moins réversible que le blocage des récepteurs de type ET_A.

Dans la présente étude, nous avons également démontré que la réduction d'une concentration plasmatique effective minimale d'un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B peut amener une constriction exagérée à l'endothéline-1 à cause du blocage non-réversible de la relâche d'EDRF dépendante des récepteurs de type ET_B qui est

efficacement contrée par le BQ-788 et par le BQ-928. Par contre, ce type d'augmentation de la réponse pressive rénale n'est pas observé suite à l'interruption de l'infusion du SB 209670, du BQ-238 et du BMS 182874. Nous suggérons que cette absence de potentiation de l'effet presseur de l'endothéline-1 suivant le traitement avec ces composés est dû au fait que ces antagonistes possèdent tous une plus grande affinité pour le récepteur de type ET_A que pour le récepteur de type ET_B .

Il est important de noter qu'il a été impossible d'étudier un profil dynamique complet de ce système à cause des propriétés hautement tachyphylactiques des mécanismes des récepteurs de type ET_B endothéliaux (LE MONNIER DE GOUVILLE *et al.*, 1990). Toutefois, il a été établi que les récepteurs de type ET_B situés sur l'endothélium vasculaire sont indistinguables pharmacologiquement et biochimiquement des récepteurs de type ET_B situés sur le muscle lisse vasculaire (CLOZEL & GRAY, 1995). Ainsi, nos résultats obtenus sur les récepteurs de type ET_B contractiles de l'artère pulmonaire de lapin sont représentatifs de la fonction des récepteurs de type ET_B de l'endothélium vasculaire du rein de lapin. Nous suggérons donc que ces propriétés de blocage des récepteurs de type ET_B des antagonistes mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B favorisent l'utilisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A dans des pathologies vasculaires dans lesquelles l'endothéline est impliquée.

Ce concept est également supporté par les observations d'ALLCOCK *et al.* (1995), qui ont rapporté que chez le rat anesthésié un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B tel le PD-145065 est incapable, contrairement au BQ-123, de renverser la réduction du flot sanguin induite par l'endothéline-1 dans différents tissus à cause du

blocage des propriétés de libération d'EDRF des récepteurs de type ET_B . Tout comme le BQ-928, le PD-145065 (DOHERTY *et al.*, 1993) possède une plus grande affinité pour le récepteur de type ET_B que pour le récepteur de type ET_A . Il serait intéressant de comparer les réponses du PD-145065 obtenues chez le rat anesthésié avec celles d'un antagoniste mixte qui possède une plus grande affinité pour le récepteur de type ET_A que pour le récepteur de type ET_B , tel le SB 209670.

Bien que le BQ-238 et le BQ-928 sont des antagonistes presque équipotents sur l'artère carotide de lapin, ce dernier est beaucoup plus puissant pour bloquer les contractions induites par l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin. Ces différences d'affinité pour ces deux types de récepteurs peuvent expliquer la plus faible puissance du BQ-928, comparé au BQ-238, à bloquer la constriction rénale à l'endothéline-1 et l'hyperréactivité observée dans le rein de lapin suivant l'arrêt d'un traitement au BQ-928.

De plus, la présente étude démontre qu'un antagoniste non-peptidique et sélectif des récepteurs de type ET_A , le BMS 182874 est significativement moins réversible comme bloqueur de la contraction rénale de l'endothéline-1, que le BQ-123 ou les antagonistes mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B . Il est intéressant de noter que bien que le SB 209670 et le BMS 182874 sont des composés métaboliquement stables, seul l'antagoniste sélectif des récepteurs de type ET_A possède un effet bloquant significatif plus de 60 min après son interruption.

CONCLUSION

L'utilisation d'un antagoniste spécifique et sélectif des récepteurs de type ET_B , le BQ-788 nous a permis d'étudier la contribution des récepteurs de type ET_B dans la réponse vasoactive de la vascularisation rénale de lapin. Il est important de souligner qu'il a été démontré qu'un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B , le RO-46-2005, contrairement au BQ-123, augmente le taux plasmatique circulant d'endothéline-1 chez le rat, suggérant ainsi que l'activation des récepteurs de type ET_B supprime la relâche d'endothéline-1 immunoréactive dérivé de l'endothélium (LÖFFLER *et al.*, 1993). Compte tenu de ces observations et considérant la grande sensibilité de la vascularisation rénale à l'endothéline (KING *et al.*, 1989; DENTON & ANDERSON, 1990), le blocage sélectif des récepteurs de type ET_B peut être particulièrement nocif pour les reins car il peut entraîner une augmentation du taux plasmatique d'endothéline-1 et réduire la relaxation médiée par les récepteurs de type ET_B . De plus, le blocage des récepteurs de type ET_B , procuré par les antagonistes mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B , peut miner leurs propriétés bénéfiques dans des conditions dans lesquelles l'endothéline-1 endogène peut influencer la résistance vasculaire systémique. La figure 14 illustre les sites réceptoriels prédominants dans les effets vasculaires des endothélines chez l'homme.

Notre étude illustre les avantages de l'utilisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A contrairement aux antagonistes mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B . Une étude récente de HAYNES *et al.* (1996) a montré qu'un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B , le TAK-044 augmente le flot sanguin de 22 %,

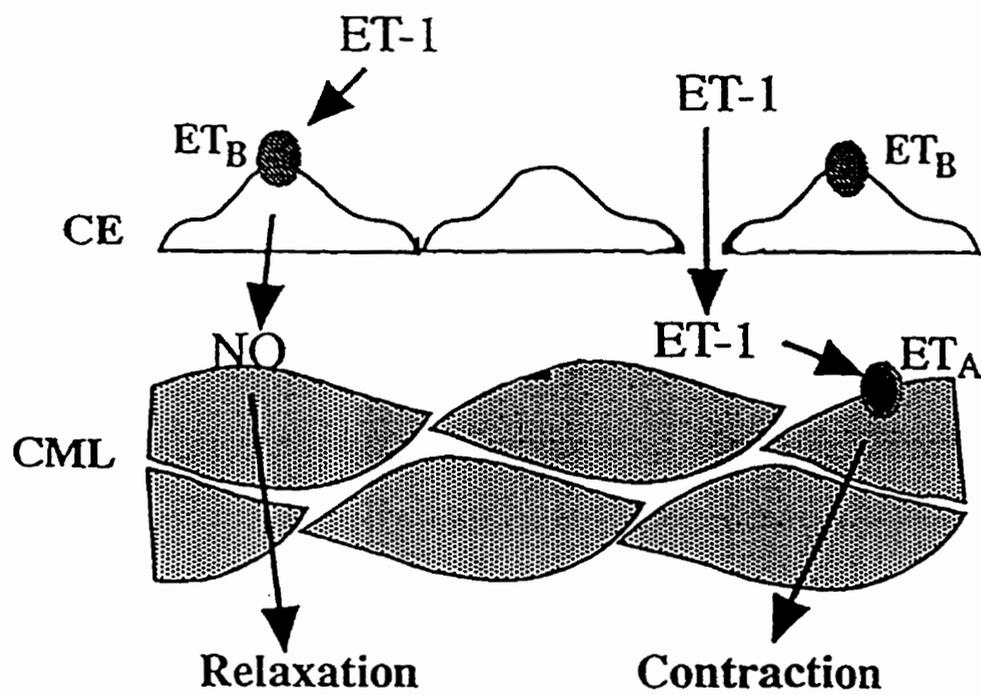


Figure 14 Sites essentiels pour les effets de l'endothéline-1 chez l'homme. CE: cellules endothéliales; CML: cellule musculaire lisse; NO: oxyde nitrique. (tirée de D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1996)

contrairement au BQ-123 (75 %)(HAYNES & WEBB, 1994), dans l'artère de l'avant-bras humain. Il est suggéré que cette faible efficacité du TAK-044 pour augmenter le flot sanguin de l'avant-bras humain est causée par son abilité à interférer avec la propriété vasodilatatrice dépendante des récepteurs de type ET_B de l'endothéline-1 endogène.

Finalement, nos résultats montrent qu'un antagoniste mixte des récepteurs de type ET_A/ET_B qui possède une plus grande affinité pour les récepteurs de type ET_B que pour les récepteurs de type ET_A induit une potentiation de la réponse pressive à l'endothéline suite à l'interruption du traitement avec ce composé dans des organes possédant une résistance dépendante des récepteurs de type ET_A , tel le rein de lapin (TÉLÉMAQUE *et al.*, 1993). Pour éviter cet effet délétère, qui peut dépendre des caractéristiques pharmacocinétiques *in vivo* de ces composés, nous devons prôner l'utilisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A ou d'antagonistes mixtes des récepteurs de type ET_A/ET_B qui possède une plus grande affinité pour les récepteurs de type ET_A que ceux de type ET_B .

Suite à ces études *in vitro*, nous devons comparer les propriétés d'antagonistes des endothélines sur les effets presseurs et sur le flot rénal cortical (par Laser Doppler) de l'endothéline-1 chez le lapin anesthésié. Ces études devraient confirmer la pertinence d'utiliser des antagonistes sélectifs des récepteurs de type ET_A dans des pathologies vasculaires dans lesquelles l'endothéline-1 pourrait être impliqués, puisque les antagonistes mixtes interfèrent avec les propriétés d'antagonisme physiologique dépendantes des récepteurs de type ET_B (libération d'EDRF).

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Pedro D'Orléans-Juste pour m'avoir offert un milieu d'apprentissage stimulant, de précieux conseils et une excellente supervision durant ma formation de maîtrise.

Je remercie sincèrement Jean-Philippe Gratton, Audrey Claing et Nathalie Berthiaume pour leur soutien, leurs nombreux conseils et leur patience.

Je tiens à remercier tous les gens que je côtoie et qui mon supporté moralement.

Finalement, je remercie tous les membres du jury: les Drs Gérard E. Plante, Tewfik Nawar et Pedro D'Orléans-Juste pour avoir accepté de réviser ce mémoire de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLCOCK G.H., WARNER T.D. & VANE J.R. (1995) Roles of endothelin receptors in the regional and systemic vascular responses to ET-1 in the anaesthetized ganglion-blocked rat: use of selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 2482-2486.
- ANGGARD E.E., BOTTING R.M. & VANE J.R. (1990) Endothelins. *Blood vessels.* **27**: 269-281.
- ARAI H., HORI S., ARAMORI I., OHKUBO H. & NAKANISHI S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**: 730-732.
- BATTISTINI B., D'ORLÉANS-JUSTE P. & SIROIS P. (1993) Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.* **68**: 600-628.
- CALO G., GRATTON J.P., TELEMAQUE S., D'ORLEANS-JUSTE P & REGOLI D. (1996) Pharmacology of endothelins: vascular preparations of studying ET_A and ET_B receptors. *Mol. and Cell. Biochem.* **154**: 31-37.
- CHOU S.Y., DAHHAN A. & PORUSH J.G. (1990) Renal actions of endothelin: interaction with prostacyclin. *Am. J. Physiol.* **259**: F645-F652.

- CLOZEL M., GRAY G.A., BREU V., LOFFLER B.M., OSTERWALDER R. (1992) The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 867-873.
- CLOZEL M., BREU V., BURRI K., CASSAL J.M., FISCHLI W., GRAY G.A., HIRTH G., LOFFLER B.M., MÜLLER M., NEIDHART W. & RAMUZ H. (1993) Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* **365**: 759-761.
- CLOZEL M., BREU V., GRAY G.A., KALINA B., LOFFLER B.M., BURRI K., CASSAL J.M., HIRTH G., MÜLLER M., NEIDHART W. & RAMUZ H. (1994) Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 228-235.
- CLOZEL M. & GRAY G.A.. (1995) Are there different ET_B receptors mediating constriction and relaxation? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: S262-S264.
- DENAULT J.B., CLAING A., D'ORLÉANS-JUSTE P., SAWAMURA T., KIDO T., MASAKI T & LEDUC R. (1995) Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Letters* **362**: 276-280.

DENTON K.M. & ANDERSON W.P. (1990) Vascular actions of endothelin in the rabbit kidney. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **17**: 861-872.

DENUCCI G., THOMAS R., D'ORLEANS-JUSTE P., ANTUNES E., WALDER C., WARNER T.D. & VANE J.R. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9797-9800.

DOHERTY A.M., CODY W.L., HE J.X., DEPUE P.L., CHENG X.-M., WELCH K.M., FLYNN M.A., REYNOLDS E.E., LADOUCEUR D.M., DAVIS L.S., KEISER J.A. & HALEEN S.J. (1993) *In vitro* and *in vivo* studies with a series of hexapeptide endothelin antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**: S98-S102.

D'ORLEANS-JUSTE P., LIDBURY P.S., TELEMAQUE S., WARNER T.D. & VANE J.R. (1991) Human big endothelin releases prostacyclin *in vivo* and *in vitro* through a phosphoramidon-sensitive conversion to endothelin-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**: S251-S255.

D'ORLÉANS-JUSTE P., TÉLÉMAQUE S., CLAING A., IHARA M & YANO M. (1992) Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET1 receptors in rat perfused lung. *Br. J. Pharmacol.* **105**: 773-775.

D'ORLEANS-JUSTE P., CLAING A., TELEMAQUE S., MAURICE M.C., YANO M & GRATTON J.P. (1994) Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A₂ from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ET_B receptor antagonist, BQ-788. *Br. J. Pharmacol.* **113**: 1257-1262.

D'ORLEANS-JUSTE P., YANO M., MAURICE M.C. & GRATTON J.P. (1995) Hyperresponsiveness to ET-1 after treatment with a mixture of ET_A and ET_B receptor antagonists in the rabbit in vivo and in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: S369-S372.

D'ORLEANS-JUSTE P., GRATTON J.P., BKAILY G. & CLAING A. (1996) L'endothéline: pharmacologie cardiovasculaire et considérations physiopathologiques. *Médecine Sciences* **12**: 563-574.

EMOTO N. & YANAGISAWA M. (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* **270**: 15262-15268.

FUKAMI T., YAMAKAWA T., KOJIMA H., AMANO Y., IHARA M., YANO M. & ISHIKAWA K. (1995) Synthesis of 2-substituted D-tryptophan-containing peptide derivatives with endothelin receptor antagonist activity. *Bioorg. & Medic. Chem. Lett.* **5**: 1483-1488.

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

GRATTON J.P. (1995) Pharmacologie cardiovasculaire des enzymes de conversion de l'endothéline systémique et pulmonaire chez le rat et le cobaye. Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke.

HAYNES W.G. & WEBB D.J. (1994) Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* **344**: 852-854.

HAYNES W.G., STRACHAN F.E., GRAY G.A. & WEBB D.J. (1995) Forearm vasoconstriction to endothelin-1 is mediated by ET_A and ET_B receptors *in vivo* in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: S40-S43.

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

HEMSEN A., AHLBORG G., OTTOSSON R.J. & LUNDBERG J.M. (1995) Metabolism of big-endothelin-1 (1-38) and (22-38) in the human circulation in relation to production of endothelin-1 (1-21). *Regul. Pept.* **55**: 287-297.

HICKEY K.A., RUBANYI G., PAUL R.J. & HIGHSMITH R.F. (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **248**: C550-C556.

IHARA M., ISHIKAWA K., FUKURODA T., SAEKI T., FUNABASHI K., SUDA H. & YANO M. (1992) In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ET_A receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**: S11-S14.

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

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

- KARNE S., JAYAWICKREME C.K. & 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.
- KELLY R.A., EID H., KRAMER B.K., O'NEILL M., LIANG B.T., REERS M. & SMITH T.W. (1990) Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *J. Clin. Invest.* **86**: 1164-1171.
- KING A.J., BRENNER B.M. & ANDERSON S. (1989) Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am. J. Physiol.* **256**: 1051-1058.
- LE MONNIER DE GOUVILLE A.C., LIPPTON H., COHEN G., CAVERO I. & HYMAN A. (1990) Vasodilator activity of endothelin-1 and endothelin-3: rapid development of cross-tachyphylaxis and dependence on the rate of endothelin administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**: 1024-1028.
- LÖFFLER B.M., BREU V. & CLOZEL M. (1993) Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist, RO 46-2005, on endothelin levels in rat plasma. *FEBS Lett.* **333**: 108-110.

MCMURDO L., CORDER R., THIEMERMANN C. & VANE J.R. (1993) Incomplete inhibition of the pressor effects of endothelin-1 and related peptides in the anaesthetized rat with BQ-123 provides evidence for more than one vasoconstrictor receptor. *Br. J. Pharmacol.* **108**: 557-561.

MONCADA S., GRYGLEWSKI R., BUNTING S. & VANE J.R. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665.

MORELAND S., MCMULLEN D.M., DELANEY C.L., LEE V.G. & HUNT J. (1992) Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET_B-like receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 100-106.

OHLSTEIN E.H., NAMBI P., DOUGLAS S.A., EDWARDS R.M., GELLAI M., LAGO A., LEBER J.D., COUSINS R.D., GAO A., FRAZEE J.S. PEISHOFF C.E., BEAN J.W., EGGLESTON D.S., ELSHOURBAGY N.A., KUMAR C., LEE J.A., YUE T.L., LOUDEN C., BROOKS D.P., WEINSTOCK J., FEUERSTEIN G., POSTE G., RUFFOLO R.R., GLEASON J.G. & ELLIOTT J.D. (1994) SB 209670, a rationally designed potent nonpeptide endothelin receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8052-8056.

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

RAE G.A., TRYBULEC M., DE NUCCI G. & VANE J.R. (1989) Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**: S89-S92.

REMBOLD C.M. (1991) Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, **18**: III169-III174.

ROBERTS-THOMSON P., MCRITCHIE R.J., CAIN M.D. & CHALMERS J.P. (1994) Proceedings of the HBPRCA. Effects of endothelin-1 on arterial pressure: a comparison of intravenous and intra-arterial administration in conscious rabbits. *Clinic. and Exp. Pharmacol. and physiol.* **21**: 323-327.

SAEKI T., IHARA M., FUKURODA T., YAMAGIWA M. & YANO M. (1991) [Ala^{1,3,11,15}]Endothelin-1 analogs with ET_B agonistic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 286-292.

- SAKURAI T., YANAGISAWA M., TAKUWA Y., MIYAZAKI H., KIMURA S., GOTO K & MASAKI T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**: 732-735.
- SALMON J.A. (1978) A radioimmunoassay for a 6-keto-prostaglandin F_{1 α} . *Prostaglandins* **15**(4): 383-396.
- SCHILD H.O. (1949) pA_x and competitive drug antagonism. *Br. J. Pharmacol.* **4**: 277-280.
- SHIMADA K., TAKAHASHI M & TANZAWA K. (1994) Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 18275-18278.
- STEIN P.D., HUNT J.T., FLOYD D.M., MORELAND S., DICKINSON K.E.J., MITCHELL C., LIU E.C.K., WEBB M.L., MURUGESAN N., DICKEY J., MCMULLEN D., ZHANG R., LEE V.G., SERAFINO R., DELANEY C., SCHAEFFER T.R. & KOZLOWSKI M. (1994) The discovery of sulfonamide endothelin antagonists and the development of the orally active ET_A antagonist 5-(dimethylamino)-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1-naphthalenesulfonamide. *J. Med. Chem.* **37**: 329-331.

TAKAHASHI M., FUKUDA K., SHIMADA K., BARNES K., TURNER A.J., IKEDA M., KOIKE H., YAMAMOTO Y & TANZAWA K. (1995) Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells. *Biochem. J.* **311**: 657-665.

TAKAI M., UMEMURA I., YAMASAKI K., WATAKABE T., FUJITANI Y., ODA K., URADE Y., INUI T., YAMAMURA T & OKADA T. (1992) A potent and specific agonist, suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 953-959.

TELEMAQUE S., GRATTON J.P., CLAING A. & D'ORLEANS-JUSTE P. (1993) Endothelin-1 induces vasoconstriction and prostacyclin release via the activation of ET_A receptors in the perfused rabbit kidney. *Eur. J. Pharmacol.* **237**: 275-281.

TSUCHIYA K., NARUSE M., SANAKA T., NARUSE K., ZENG Z.P., NITTA K., DEMURA H., SHIZUME K. & SUGINO N. (1990) Renal and hemodynamic effects of endothelin in anesthetized dogs. *Am. J. Hypert.* **3**: 792-795.

WARNER T.D., MITCHELL J.A., DE NUCCI G & VANE J.R. (1989) Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**: S85-S88.

WARNER T.D., ALLCOCK G.H., CORDER R & VANE J.R. (1993) Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br. J. Pharmacol.* **110**: 777-78.

WARNER T.D., ALLCOCK G.H. & VANE J.R. (1994) Reversal of established responses to endothelin-1 *in vivo* and *in vitro* by the endothelin receptor antagonists, BQ-123 and PD 145065. *Br. J. Pharmacol.* **112**: 207-213.

WEEB D.J. (1991) Endothelin receptors cloned, endothelin converting enzyme characterized and pathophysiological roles for endothelin proposed. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 43-46.

WHITE D.G., CANNON T.R., GARRATT H., MUNDIN J.W., SUMNER M.J. & WATTS I.S. (1993) Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth-muscle contraction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**: S144-S148.

WHITE D.G., GARRATT H., MUNDIN J.W., SUMNER M.J., VALLANCE P.J. & WATTS I.S. (1994) Human saphenous vein contains both endothelin ET_A and ET_B contractile receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **257**: 307-310.

XU D., EMOTO N., GIAID A., SLAUGHTER C., KAM S., DEWIT D. & YANAGISAWA M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyses the proteolytic activation of big-endothelin-1. *Cell* **78**: 473-485.

YANAGISAWA M., KURIHARA H., KIMURA S., TOMOBE Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., YAZAKI Y., GOTO K & MASAKI T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415.