

Les endothélines et le poumon

Les endothélines (ET) font partie d'une famille de peptides découverts en 1988. Trois isoformes particulières, les endothélines 1, 2, 3 (ET1, ET2 et ET3), s'avèrent de puissants agents vasopresseurs et vasoconstricteurs. Ils provoquent aussi des bronchospasmes. Les trois gènes codant pour ces trois isoformes sont désormais identifiés. Ils codent en fait pour des précurseurs, les big-endothélines 1, 2 et 3, qui sont transformés en leur produit de maturation par une enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) dont l'activité est présente, notamment, au niveau du poumon. Les effets broncho-pulmonaires produits par l'endothéline 1 sont en partie relayés par les produits des phospholipases (A₂ et C) tels les éicosanoïdes (prostacycline, thromboxane A₂, peptidoleucotriènes), le PAF et les phosphatidyl inositols, ainsi que par l'augmentation du calcium intracellulaire. Ces effets impliquent aussi l'ouverture de divers canaux ioniques. Le développement et l'utilisation récente d'antagonistes, ainsi que l'identification d'inhibiteurs spécifiques de l'ECE, donnent accès à des informations importantes sur la pharmacologie des endothélines, et pourraient, dans l'avenir, avoir des indications thérapeutiques, par exemple, dans les hyper-réactivités bronchiques et l'hypertension pulmonaire.

Bruno Battistini
Pedro D'Orléans-Juste
Pierre Sirois

ADRESSE

B. Battistini : étudiant en doctorat. P. D'Orléans-Juste : docteur ès sciences, professeur-chercheur. P. Sirois : docteur ès sciences, professeur et directeur. Département de pharmacologie, faculté de médecine, université de Sherbrooke, Sherbrooke, PQ, J1H 5N4, Canada.

m/s n° 7, vol. 8, septembre 92

En réponse à divers *stimuli*, l'endothélium des vaisseaux sanguins libère divers agents vaso-actifs qui viennent moduler le tonus vasculaire. Outre la production de substances vaso-dilatatrices tels la prostacycline (PGI₂) et l'oxyde nitrique (NO qu'on identifie à l'EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*), plusieurs *stimuli* physiques ou chimiques provoquent la libération de substances endogènes vaso-constrictrices à partir de l'endothélium vasculaire. Un de ces EDCF (*endothelium-derived contracting factors*) a été récemment purifié et séquencé par Yanagisawa *et al.* [1]. L'endothéline 1 (ET1) qui est synthétisée puis libérée par les cellules endothéliales, s'avère une des plus puissantes substances vaso-constrictrices et hypertensives d'ori-

gine peptidique étudiées à ce jour. Elle est, en particulier, plus active que l'angiotensine II, la vasopressine et le neuropeptide Y [1]. Outre ses activités cardio-vasculaires (hypertension, vasoconstriction, effets inotropes et chronotropes) [1], l'ET1 exerce des effets réno-vasculaires et produit des effets marqués sur le système respiratoire.

Structure et biosynthèse

L'ET1 constitue la première des trois isoformes décrites. Elle fut isolée à partir du surnageant de cellules endothéliales de l'aorte de porc en culture [1]. Son ARNm est désormais retrouvé dans de nombreuses espèces dont l'homme, le porc, le bœuf, le chien, la souris, le rat, etc. [2]. La [Trp⁶, Leu⁷]-ET1 (ou ET2) et la

RÉFÉRENCES

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988 ; 332 : 411-5.
 2. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, *et al.* The human endothelin family : three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 2863-7.
 3. Hemsén A. Biochemical and functional characterization of endothelin peptides with special reference to vascular effects. *Acta Physiol Scand* 1991 ; 142 : 1-61.
 4. D'Orléans-Juste P, Télémaque S, Claing A. Different pharmacological profiles of big-endothelin-3 and big-endothelin-1 *in vivo* and *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1991 ; 104 : 440-4.
 5. Noguchi K, Fukuroda T, Ikeno Y, *et al.* Local formation and degradation of endothelin-1 in guinea-pig airway tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 179 : 830-5.
 6. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Eto T, Tanaka K. Chromatographic characterization of immunoreactive endothelin in rat lung. *Life Sci* 1990 ; 46 : 405-9.
 7. Franco-Cereceda A, Matran R, Lou YP, Lundberg JM. Occurrence and effects of endothelin in guinea-pig cardiopulmonary tissue. *Acta Physiol Scand* 1990 ; 138 : 539-47.
 8. Rozengurt N, Springall DR, Polak JM. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J Pathol* 1990 ; 160 : 5-8.
 9. Naruse M, Naruse K, Kurimoto F, *et al.* RIA for ET and ir-ET in culture medium of bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 160 : 662-8.
 10. Davenport AP, Nunez DJ, Hall JA, Kauman AJ, Brown MJ. Autoradiographical localization of binding sites for endothelin-1 in human, pigs, and rats : functional relevance in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989 ; 13 : S166-70.
 11. Turner NC, Power RF, Polak JM, Bloom SR, Dollery CT. Endothelin-induced contractions of tracheal smooth muscle and identification of specific endothelin binding sites in the trachea of the rat. *Br J Pharmacol* 1989 ; 98 : 361-6.
 12. McKay KO, Black JL, Armour CL. The mechanism of action of endothelin in human lung. *Br J Pharmacol* 1991 ; 102 : 422-8.
- [Thr², Phe⁴, Thr⁵, Tyr⁶, Lys⁷, Tyr¹⁴]-ET1 (ou ET3) font partie de la même famille et sont retrouvées dans toutes les espèces mentionnées ci-dessus [2]. Au niveau du poumon porcine, les ARNm de l'ET1 et de l'ET3 sont présents, l'ET1 étant largement majoritaire. L'ARNm de l'ET2 n'est pas révélé [3]. Les endothélines comportent 21 acides aminés, deux liaisons sulphidryles, ainsi qu'une portion C-terminale hydrophobe portant un résidu tryptophane (figure 1). L'ET1 est dérivée d'une séquence de 203 acides aminés, la pré-proendothéline, qui est coupée par protéolyse entre les résidus 52-53 d'une part et 91-92 d'autre part pour former la big-endothéline 1, un pré-curseur de 39 acides aminés chez le porc et de 38 acides aminés chez l'homme [1, 2] (figure 2, p. 682). C'est par un processus endoprotéolytique inhabituel, et non par une classique réaction exopeptidasique, que s'effectue la transformation de la big-ET1. Le clivage entre les résidus tryptophane et valine, en position 21-22, est catalysé par l'enzyme de conversion de l'endothéline et conduit à la production d'une molécule active de 21 acides aminés (figure 2) [1]. L'ECE, localisée dans le lit vasculaire du poumon de cobaye [4], est inactivée par le phosphoramidon, un inhibiteur des métalloprotéinases neutres. Le phosphoramidon inhibe ainsi la transformation de la big-ET1 en ET1 dans le lit vasculaire [4] et les bronches isolées du poumon de cobaye [5]. La maturation du pré-curseur est indispensable à l'activité biologique du peptide.

Localisation de l'endothéline et de ses récepteurs dans le système pulmonaire

L'endothéline 1 est présente dans le poumon humain, de porc [3] et de rat [6], ainsi que dans l'artère pulmonaire de cobaye [7]. Des études immuno-histochimiques [8, 9] ont montré que l'endothéline est localisée au niveau des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire de bœuf [9] et de l'épithélium bronchiolaire du rat et de la souris, plus précisément au niveau des cellules spécialisées de

type Clara et des cellules à mucus [8]. En autoradiographie [10, 11], des sites de liaison ont été révélés au niveau des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine [12] et de cobaye [13], au niveau du muscle lisse des voies respiratoires du cobaye [10, 14], du rat [10, 11, 14, 15], de la souris [14], du porc [10] et de l'homme [10, 12, 14, 16]. Tout récemment, deux récepteurs associés aux protéines G ont été clonés, puis classés selon leur affinité respective pour les trois isoformes de l'endothéline (*m/s n° 4, vol. 7, p. 391*) : le récepteur ET_A a une plus forte affinité pour ET1 et ET2 que pour ET3, alors que le récepteur ET_B a une affinité équivalente pour les trois endothélines [17] (figure 3, p. 683). Les types ET_A et ET_B constituent respectivement 60 et 40 % des récepteurs présents au niveau du poumon de rat ; leur localisation exacte reste à déterminer [18].

Production et métabolisme

L'endothéline immunoréactive (ET-ir) est relarguée *in vitro* par les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire de bœuf [19]. L'ET-1 est aussi formée puis libérée par d'autres tissus que ceux du système cardiovasculaire. On retrouve de l'ET-ir dans le milieu de culture de cellules épithéliales de la trachée de chien et de porc [20] ainsi que de cellules épithéliales de bronches humaines [16].

Des études *in vivo* et *in vitro* chez le rat et le cobaye montrent que l'endothéline endogène ou exogène est rapidement éliminée par la circulation pulmonaire [21]. L'ET1 subit un sort similaire au contact des voies respiratoires. L'épithélium contient des endopeptidases neutres (NEP) qui seraient responsables de la dégradation de l'ET1 [22]. Les bronches et la trachée isolées de cobaye traitées au phosphoramidon ont une réponse contractile à l'ET1 augmentée [5]. Il en va de même de la réponse broncho-pulmonaire induite par l'administration d'ET1 en aérosol [23]. Le phosphoramidon exerce en fait une double action : il inhibe la formation de l'endothéline en inactivant son enzyme de conversion et il bloque la dégradation du peptide

dans les bronches [5] en agissant au niveau des endopeptidases neutres qui coexistent avec l'ECE dans le tissu pulmonaire.

La présence de l'ECE, de sites de synthèse et de liaison ainsi que d'enzymes de dégradation de l'endothéline tendent à confirmer que ce peptide joue un rôle dans la physiologie du système pulmonaire : produite et dégradée dans le poumon, l'endothéline pourrait moduler le tonus des voies respiratoires.

Activités pharmacologiques in vivo

Administrée en aérosol, l'ET1 induit une augmentation de la résistance pulmonaire dépendante de la dose et une diminution de la compliance, sans affecter significativement la pression sanguine artérielle, chez le cobaye et le rat anesthésiés et ventilés [24, 25]. Cependant, l'injection intraveineuse ou intra-artérielle de l'ET1 *in vivo* et *in vitro*, dans des préparations de poumons isolés et perfusés de cobaye et de rat, entraîne également une élévation de la résistance pulmonaire semblable à celle induite par des doses équivalentes de PAF ou d'histamine [24, 26]. L'administration intraveineuse de la big-ET1 humaine chez le cobaye provoque des effets broncho-pulmonaires et hypertenseurs similaires à ceux induits par l'ET1. Toutefois, contrairement à l'ET1, les effets de la big-ET1 sont abolis par le phosphoramidon [27]. L'effet vaso-presseur observé dans la circulation pulmonaire artérielle est cependant biphasique dans certaines espèces. Ainsi, chez le chat et le rat, cet effet est précédé d'une hypotension transitoire [28-30].

Activités pharmacologiques in vitro

Sur des préparations isolées de voies aériennes tels la trachée, les bronches et le parenchyme pulmonaire, l'ET1 provoque une contraction lente et dépendante de la dose tant chez le cobaye [14, 21, 31, 32], le rat [11, 14], la souris [14], que chez l'homme [12, 14, 33]. De même, l'ET2, l'ET3

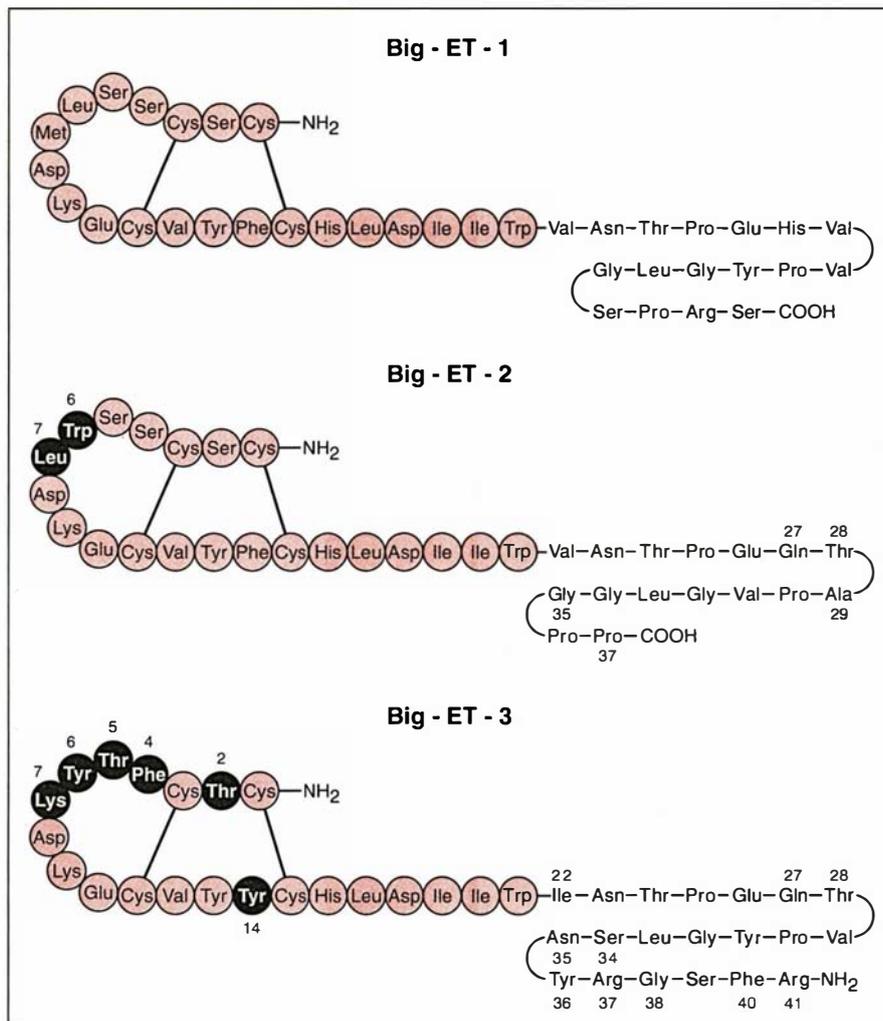


Figure 1. Structures primaires des précurseurs des endothélines 1, 2 et 3 humaines. Les résidus encerclés représentent les formes actives découlant de différents précurseurs après protéolyse. Les acides aminés qui diffèrent de ceux présents dans la big-endothéline 1 humaine de 38 acides aminés sont indiqués par des numéros. (Modifiée à partir de [1] et [2].)

et la big-ET1 humaine produisent une contraction prolongée des bronches et de la trachée de cobaye [5, 32]. Dans des préparations isolées de poumon humain, de cobaye et de rat, la contraction induite par l'ET1 (EC₅₀ : 15-25 nM) s'avère plus importante que celle induite par la neurokinine A, le leucotriène D₄, l'histamine [31], le carbachol ou l'acétylcholine [14, 33]. L'ET1 produit également une contraction dépendante de la dose de préparations isolées d'artères pulmonaires humaines [12] et de rat [34].

En résumé, l'ET1 induit d'importants effets pharmacologiques dont une puissante broncho-constriction lorsqu'elle est administrée soit sous

forme aérosol, soit par voie intravasculaire. Dans le premier cas, la réponse broncho-pulmonaire n'est accompagnée d'aucun effet sur la pression artérielle. Cette observation suggère que les effets broncho-constricteurs et vaso-presseurs induits par l'ET1 dans le poumon sont contrôlés par des mécanismes différents.

Mécanisme d'action de l'endothéline 1 dans la réponse broncho-pulmonaire

Rôle de l'épithélium

L'épithélium, grâce à l'action d'enzymes catalytiques et de divers facteurs, module l'action de l'ET1. Ainsi, en

RÉFÉRENCES

13. Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L. Two functional endothelin receptors in guinea-pig pulmonary arteries. *Neurochem Int* 1991 ; 18 : 571-4.
14. Henry PJ, Rigby PJ, Self GJ, Preuss JM, Goldie RG. Relationship between ET1 binding site densities and constrictor activities in human and animal airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1990 ; 100 : 786-92.
15. Bolger GT, Liard F, Krogsrud R, Thibeault D, Jaramillo J. Tissue specificity of ET binding sites. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990 ; 16 : 367-75.
16. Mattoli S, Mezzetti M, Riva G, Allgra L, Fasoli A. Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1990 ; 3 : 145-51.
17. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharm Sci* 1992 ; 13 : 103-8.
18. D'Orléans-Juste P, Télémaque S, Claing A, Ihara M, Yano M. Human big-ET1 and ET1 release prostacyclin via the activation of ET1 receptors in the rat perfused lung. *Br J Pharmacol* 1992 ; 105 : 773-5.
19. Ohlstein EH, Arleth A, Ezekiel M, et al. Biosynthesis and modulation of endothelin from bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Life Sci* 1990 ; 46 : 181-8.
20. Black PN, Ghatei MA, Takahashi K, et al. Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS Lett* 1989 ; 255 : 129-32.
21. De Nucci G, Thomas R, D'Orléans-Juste P, et al. Pressor effect 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* 1988 ; 85 : 9797-800.
22. Maggi CA, Patacchini R, Giuliani S, Meli A. Potent contractile effect of endothelin in isolated guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* 1989 ; 160 : 179-82.
23. Boichot E, Pons F, Lagente V, Touvay C, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Phosphoramidon potentiates the endothelin-1-induced bronchopulmonary response in guinea-pigs. *Neurochem Int* 1991 ; 4 : 477-9.
24. Pons F, Touvay C, Lagente V, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Comparison of the effects of intra-arterial and aerosol administration of ET1 in the guinea-pig isolated lung. *Br J Pharmacol* 1991 ; 102 : 791-6.

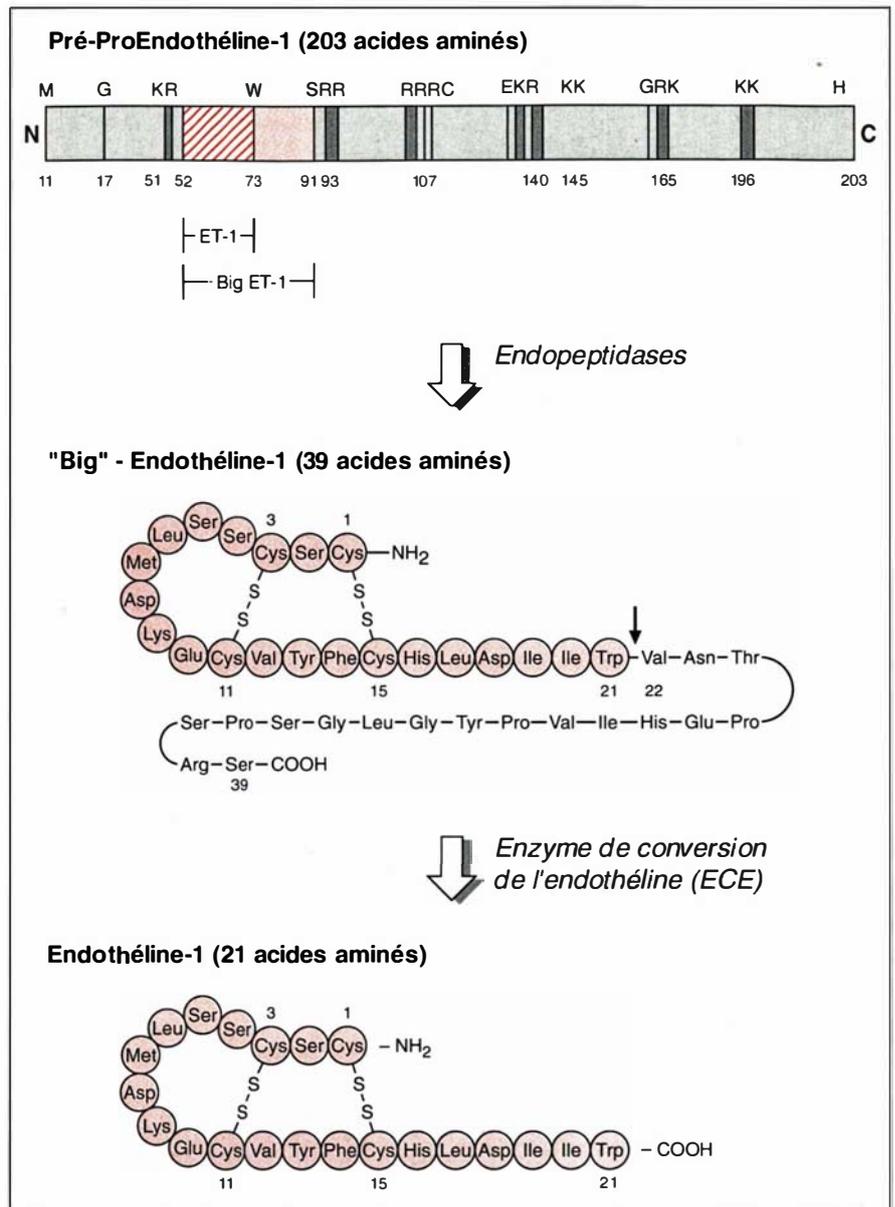


Figure 2. **Voie de formation de l'endothéline 1 dans le porc.** La séquence de la pré-proendothéline 1 est coupée par une endopeptidase entre les positions 52-53 et 91-92, soit les résidus Arg-Cys et Arg-Arg, afin de former la big-endothéline 1. Ce précurseur est ensuite clivé entre les résidus Trp et Val situés en position 21-22 de la chaîne libérant l'ET1 active et le fragment C-terminal de la big-endothéline 1 porcine (séquence 22-39). (Modifiée à partir de [1] et [2].) M : Met ; G : Gly ; K : Lys ; R : Arg ; W : Trp ; S : Ser ; C : Cyst ; H : His.

l'absence d'épithélium ou en présence d'inhibiteurs peptidasiques, tant au niveau de la trachée que des bronches isolées de cobaye, la sensibilité et la réponse constrictrice induite par l'ET1 sur ces muscles lisses se trouvent augmentées [22, 32]. L'épithélium pourrait aussi agir simplement comme une barrière physique empêchant l'agoniste de se lier à son (ou à ses) récepteur(s) situé(s) sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes. Enfin, l'activité constrictrice peut aussi être atténuée par la libération de facteurs relaxants dérivés de l'épithélium (EpDRF) [32]. Dans certaines conditions, l'ET1 induit un effet relaxant dépendant de la dose sur des préparations trachéales intactes, contractées par l'administration de carbachol, et traitées avec un antagoniste du thromboxane A₂ [35]. Cette

relaxation est significativement atténuée par le bleu de méthylène, l'oxyhémoglobine et la NG-monométhyl-L-arginine, suggérant qu'un *epithelium-derived relaxing factor* (EpDRF) est apparenté à l'oxyde nitrique. Sur des trachées non contractées, ou dénuées d'épithélium, ou encore non traitées avec un antagoniste du thromboxane A₂, cette relaxation est inexistante ou fortement atténuée, suggérant que l'ET1 induit une double réponse sur ce type de préparation. Cependant, l'effet relaxant relié à la présence de l'épithélium est masqué par la puissance de l'activité constrictrice.

Rôles des facteurs lipidiques

Plusieurs études montrent le rôle de divers facteurs lipidiques comme médiateurs de la réponse bronchospastique de l'ET1. Ainsi, dans le

poumon perfusé de rat et de cobaye, l'administration intra-artérielle d'ET1 induit la synthèse et la libération de prostanoides tels la prostacycline (PGI₂) et le thromboxane A₂ (TxA₂) [21] (figure 3). La *big*-ET1 humaine induit aussi la libération d'écosanoides *in vivo* et *in vitro* [4]. Dans ce dernier cas, le phosphoramidon inhibe cet effet de la *big*-ET1. L'ET1 stimule aussi la libération de ces médiateurs au niveau du parenchyme pulmonaire isolé de cobaye [31]. L'administration de l'ET1 sous forme aérosol chez le cobaye n'induit cependant aucune libération de TxA₂ dans la circulation pulmonaire [24], ce qui montre que les mécanismes d'action au niveau des voies aériennes du cobaye ne sont pas univoques. Par exemple, l'administration d'indométacine ou de méclofénamate, deux

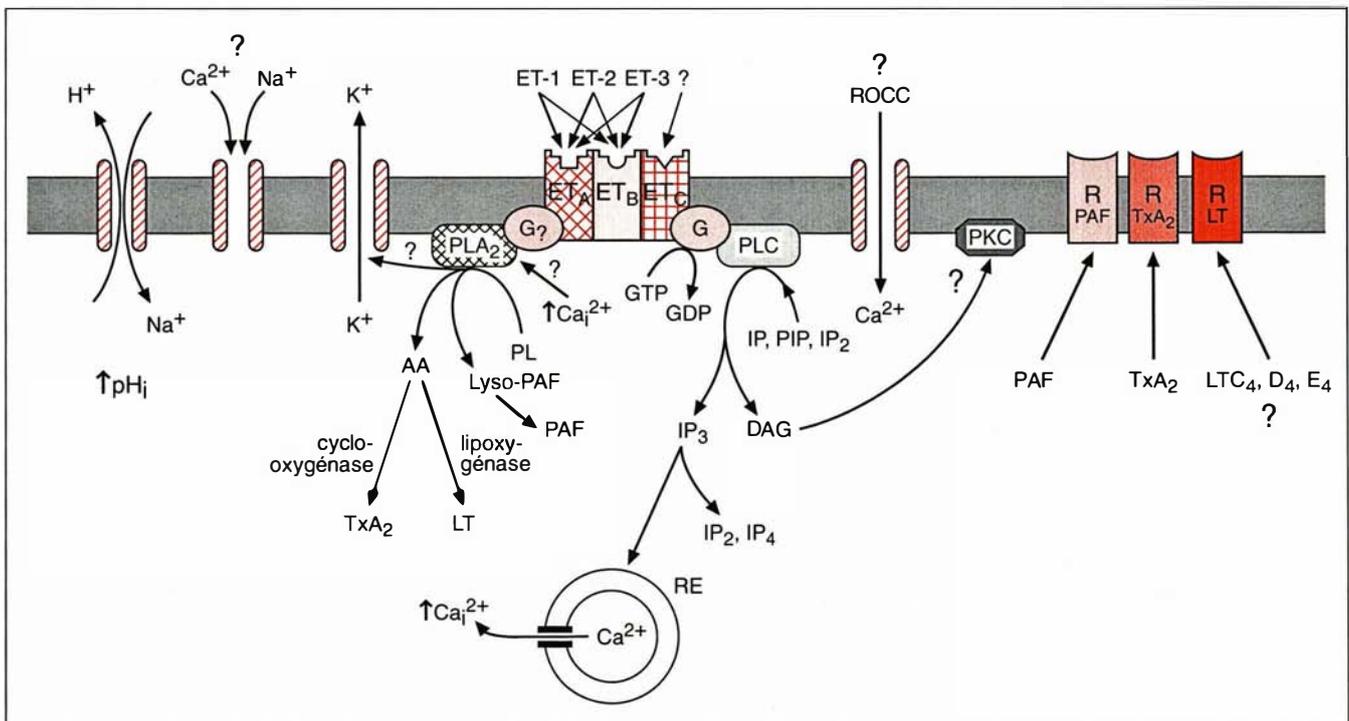


Figure 3. **Mécanismes d'action et signaux intracellulaires des endothélines au niveau du muscle lisse vasculaire et/ou respiratoire.** La réponse bronchopulmonaire induite par l'ET1 et relayée par plusieurs mécanismes. ET1, 2, 3 : endothéline 1, 2, 3 ; PAF : platelet activating factor ; TxA₂ thromboxane A₂ ; LT, LTC₄, LTD₄, LTE₄ : leucotriènes ; AA : acide arachidonique ; PL : phospholipides ; RE : réticulum endoplasmique ; R : récepteur, vraisemblablement de la famille des récepteurs couplés aux protéines G à segments intramembranaires. ETA : récepteur ayant une affinité supérieure pour ET1 et 2 que pour ET3. ETB : récepteur ayant une affinité équivalente pour les ET1, 2 et 3. ETC : ? ; G : protéine G ; PLC : phospholipase C ; PLA₂ : phospholipase A₂ ; PKC : protéine kinase C ; IP₂, IP₃, IP₄ : inositols phosphates ; DAG : diacylglycérol ; ROCC : receptor-operated calcium channel. Ca_i²⁺ et pH_i : calcium et pH intracellulaires.

RÉFÉRENCES

25. DiMaria GU, Bellofiore S, Malatino LS, Maggi CA, Torrisi A, Mistretta A. Aerosolized endothelin-1, but not its C-terminal hexapeptide causes airway narrowing in the rat. *Eur Resp J* 1991; 4: 528-31.
26. Matsuse T, Fukuchi Y, Suruda T, Nagase T, Ouchi Y, Orimo H. Effect of ET1 on pulmonary resistance in rats. *J Appl Physiol* 1990; 68: 2391-3.
27. Fukuroda F, Noguchi K, Tsuchida S, et al. Inhibition of biological actions of big-ET1 by phosphoramidon. *Biochem Biophys Commun* 1990; 172: 390-5.
28. Hasunuma K, Rodman DM, O'Brien RF, McMurtry IF. ET1 causes pulmonary vasodilation in rats. *Am J Physiol* 1990; 259: H48-54.
29. Minkes RK, Bellan JA, Saroyan RM, et al. Analysis of cardiovascular and pulmonary responses to ET1 and ET3 in the anesthetized cat. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 118-25.
30. Raffestin B, Adnot S, Eddahibi S, Macquin-Mavier I, Braquet P, Chabrier PE. Pulmonary vascular response to endothelin in rats. *J Appl Physiol* 1991; 70: 567-74.
31. Filep JG, Battistini B, Sirois P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea-pig isolated airways and thromboxane release. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1633-40.
32. Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Santicoli P, Giachetti A, Meli A. Further studies on the response of the guinea-pig isolated bronchus to endothelins and sarafotoxin S6b. *Eur J Pharmacol* 1990; 176: 1-9.
33. Advenier C, Sarria B, Naline E, Puybasset L, Lagente V. Contractile activity of three endothelins (ET1, ET2 and ET3) on the human isolated bronchus. *Br J Pharmacol* 1990; 100: 168-72.
34. Rodman DM, McMurtry IF, Peach JL, O'Brien RF. Comparative pharmacology of rat and porcine ET in rat aorta and pulmonary artery. *Eur J Pharmacol* 1989; 165: 297-300.
35. Battistini B, Filep JG, Sirois P. ET1 induces epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. *FASEB J* 1992; 6: A946.
36. Schumacher WA, Steinbacher TE, Allen GT, Ogletree ML. Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins* 1990; 40: 71-9.

inhibiteurs de la cyclo-oxygénase, inhibent la broncho-contraction induite par l'injection intravasculaire et/ou l'inhalation de l'ET1 chez le cobaye [24]. L'injection d'indométacine ou de BW 755C bloque la libération de PGI₂ et de TxA₂ induite par l'administration d'ET1 dans le poumon perfusé de cobaye [24]. L'indométacine inhibiteur abolit aussi la libération de TxA₂ du parenchyme de cobaye *in vitro* et atténue l'action contractile de l'ET1 sur la trachée, les bronches et le parenchyme [31]. Deux antagonistes des récepteurs du TxA₂, le BM 13 505 ou le BM 13 177 (sulotroban), inhibent l'action contractile de l'ET1 [31]. La réponse broncho-spastique causée par l'injection intraveineuse d'ET1 chez le cobaye anesthésié est bloquée (> 90 %) par le SQ 30 741 IV*, un antagoniste sélectif du récepteur du TxA₂/PGH₂ [36]. Ces observations confirment le rôle modulateur de cet autacoïde au niveau des muscles lisses non vasculaires du poumon de cobaye.

Les produits de la 5-lipoxygénase seraient peut-être impliqués dans les effets broncho-pulmonaires de l'ET1. En présence d'antagonistes des peptidoleutriènes (LTC₄, D₄, E₄), tels le FPL 55 712 et le YM 16 638, l'action myotrope de l'ET1 sur des préparations isolées de cobaye est significativement atténuée, alors qu'un prétraitement des tissus avec le composé U 75 302, un antagoniste sélectif du récepteur au LTB₄, ne modifie pas la réponse observée [31]. Le FPL 55 712 diminue significativement la libération de TxA₂ induite par l'ET1 dans le parenchyme isolé de cobaye [31]. Cependant, l'administration intra-artérielle d'ET1 dans le poumon perfusé de cobaye n'induirait pas la libération des peptidoleucotriènes comme c'est le cas avec la libération d'écicosanoïdes [24] (*figure 3*). De même, le FPL 55 712 IV ne semble pas affecter l'augmentation de la résistance broncho-pulmonaire induite par l'administration intra-artérielle ou aérosol d'ET1 dans le poumon isolé de cobaye [24]. Le facteur d'agrégation plaquettaire

(PAF) est impliqué dans le mécanisme d'action de l'ET1 au niveau des voies respiratoires de cobaye puisqu'il a été observé que des antagonistes du PAF inhibent en partie sa réponse. En effet, le BN 52 021 (ginkgolide B) IV atténue l'augmentation de la pression d'inflation pulmonaire provoquée par l'inhalation d'ET1 *in vivo* [37]. Le BN 52 021 ainsi que le WEB 2086 (3-[4-(2-chlorophényl)-9-méthyl-6H-thiényl] [1, 2, 4] triazololo-[4, 3a] [1, 4]-diazépine-2-yl]-1-(4-morpholinyl)-1-propanon), un antagoniste du PAF présentant une structure différente de celle du BN 52 021, inhibent la contraction des voies aériennes de cobaye ainsi que la libération du thromboxane A₂ induite par l'ET1 [31]. L'action de ces antagonistes suggère ainsi que l'ET1 induit la libération du PAF (*figure 3*). Chez le cobaye, les effets broncho-pulmonaires induits par le PAF sont aussi reliés à la libération d'écicosanoïdes provenant de la voie de la cyclo-oxygénase.

En résumé, la liaison de l'endothéline aux récepteurs ET_A et/ou ET_B active les phospholipases A₂ et C, déclenchant respectivement la libération d'acide arachidonique et l'augmentation de calcium intracellulaire (*figure 3*). Ainsi, l'effet de l'ET1 sur les voies respiratoires de cobaye résulte en partie de la formation d'écicosanoïdes (*figure 3*).

Les échanges ioniques

La réponse contractile des voies aériennes à l'ET1 dépend en partie de l'échange d'ions calciques. Les premières observations révélèrent un effet relayé par les canaux calciques de type L dépendant du voltage (VOC, *voltage-operated channel*), sensibles à la dihydropyridine. En outre, la nifédipine et la nifédipine, deux bloqueurs de ce type de canaux, inhibaient partiellement la contraction de l'ET1 sur la trachée isolée de cobaye [32]. Ces résultats corroboraient ainsi les observations recueillies au niveau vasculaire, qui tendaient à démontrer que les effets de l'ET1 étaient relayés par l'activation de canaux calciques de type L [1]. Néanmoins, la nifédipine et le vérapamil, à des doses semblables à celles utilisées dans les préparations de trachée de cobaye, n'ont pas ou très peu d'effets sur la

* IV : intraveineuse.

réponse de l'ET1 dans la trachée de rat [11]. Chez le cobaye, le vérapamil IV, le diltiazem, la nifédipine IP* et la nicardipine IV n'affectent pas la réponse broncho-pulmonaire à l'ET1 inhalée [37], ou injectée par voie intraveineuse chez ces animaux anesthésiés et ventilés [38] ou encore sur des préparations isolées [39]. Le traitement avec ces quatre antagonistes des canaux calciques ne produit aucun effet sur la liaison de ¹²⁵I-ET [15]. Les observations de Maggi *et al.* [22] indiquent de plus que les canaux calciques de types T ou N ne sont pas impliqués dans la contraction induite par l'ET1. Toutefois, l'absence de calcium dans le milieu d'incubation, et/ou la présence d'EGTA, abolit et/ou atténue fortement la réponse contractile de ce peptide chez le cobaye [22, 39] ou le rat [11].

En somme, l'augmentation du calcium intracellulaire joue un rôle de médiateur important dans la réponse à l'ET1. Les canaux de type L dépendants du voltage (VOC), sensibles à la dihydropyridine, apparaissent cependant peu impliqués dans le mécanisme de l'ET1 au niveau des voies aériennes (*figure 3*). Puisque l'absence de calcium extracellulaire inhibe la réponse, d'autres canaux calciques tels que ceux mis en jeu *via* des récepteurs spécifiques à l'endothéline (ROC, *receptor-operated channel*), indépendants du voltage, seraient probablement nécessaires au développement de la contraction induite par l'ET1 (*figure 3*). Comme nous l'avons déjà évoqué, l'ET1 serait aussi en mesure d'augmenter le calcium intracellulaire *via* l'activation de la phospholipase C en catalysant l'hydrolyse des phosphatidyl inositols en inositol 1,4-5-triphosphate qui provoque la mobilisation, la libération puis l'utilisation des sources intracellulaires de calcium [33] (*figure 3*).

Les canaux potassiques sont aussi importants dans le contrôle de l'excitabilité membranaire et l'activité contractile des cellules musculaires lisses des voies aériennes. Le BRL 34 915 et le pinacidil produisent une inhibition dépendante de la dose de la contraction induite par l'ET1 sur la tra-

chée de rat [40] et de cobaye [41]. Ces composés causent la relaxation du muscle lisse *via* l'ouverture spécifique de canaux potassiques, l'entrée du potassium entraînant une hyperpolarisation membranaire et l'inhibition de la contraction relayée par le calcium (*figure 3*). Cette hyperpolarisation s'oppose à l'ouverture des canaux calciques. Ainsi, l'action inhibitrice de ce composé vis-à-vis de l'ET1 pourrait être relayée par une diminution de l'entrée du calcium.

Deux inhibiteurs spécifiques de l'échangeur Na⁺/H⁺, dérivé de l'amiloride, le EIPA (5 - [N-éthyl-N-isopropyl] amiloride) et le HMA (5 - [N, N-hexam-éthylène] amiloride), inhibent la réponse de la trachée et des bronches supérieures de cobaye à l'ET1 [42]. La sortie des protons entraîne l'entrée de sodium ainsi qu'une alcalinisation intracellulaire qui activerait la phospholipase A₂ et la transformation de phospholipides membranaires en acide arachidonique (*figure 3*) [42]. Ce dernier résultat constitue un élément supplémentaire permettant de confirmer le rôle des éicosanoïdes dans l'action bronchocontractile de l'ET1 chez le cobaye. En résumé, les échanges transmembranaires de calcium, de potassium et de sodium jouent un rôle dans la réponse contractile de l'ET1 sur les voies aériennes (*figure 3*). Ces ions amènent des changements de potentiel membranaire qui affectent le tonus des muscles non vasculaires des voies respiratoires.

Effets de composés affectant le tonus des voies respiratoires

Le pré-traitement de cobayes anesthésiés et ventilés avec la mépyramine IV ou le propranolol IV n'affecte pas la réponse broncho-pulmonaire induite par l'inhalation d'ET1 [37]. Cependant, la broncho-constriction induite par l'administration intraveineuse d'ET1 chez le même animal, prétraité au propranolol IV ou à l'hexaméthonium IV, est augmentée, alors que la pression sanguine artérielle chute [38]. Cette disparité entre l'effet systémique du propranolol sur l'ET1 et ses effets directs sur les voies respiratoires restent à explorer, mais on ne peut exclure un mécanisme de

régulation par le système nerveux autonome.

Sur des trachées isolées de cobaye, la mépyramine et la diphenhydramine ne modifient pas la contraction induite par l'ET1 [31]. De plus, comme l'administration intra-artérielle d'ET1 n'induit aucune libération d'histamine à partir du poumon perfusé de cobaye, il est suggéré que l'histamine n'est pas impliquée dans la réponse pulmonaire à l'ET1 [24]. Le méthysergide, le propranolol, la phentolamine et l'atropine ne modifient aucunement la réponse observée sur des préparations de voies aériennes isolées [31]. En revanche, l'isoprénaline et le fénotérol, deux agonistes β-adrénergiques, ainsi que le nitroprusside, un activateur de la guanylate cyclase, et la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, inhibent et/ou renversent totalement la contraction induite par l'ET1 dans la trachée de cobaye [43]. De même, ces substances s'opposent aux effets contractiles de l'ET1 sur l'artère pulmonaire de rat [34].

L'absence d'effets antagonistes de composés tels la mépyramine, la diphenhydramine, le méthysergide, le propranolol, la phentolamine et l'atropine sur la réponse contractile de l'ET1 suggèrent que l'histamine, la 5-hydroxytryptamine et les neurotransmetteurs cholinergiques et adrénergiques ne constituent pas des médiateurs et/ou des modulateurs de la réponse à l'ET1 sur les voies respiratoires. Les quelques substances pharmacologiques capables de prévenir ou de renverser la réponse à l'ET1 agissent directement sur la concentration de calcium libre intracellulaire.

Mécanisme d'action de l'ET1 dans la circulation pulmonaire

L'une des propriétés pharmacologiques de l'ET1 administrée par voie intraveineuse, et qui accompagne la réponse observée sur le tonus des voies respiratoires, est l'augmentation soudaine et prolongée de la pression artérielle découlant d'une vasoconstriction. Cette réponse est aussi observée dans la circulation pulmonaire du cobaye [21], du rat [28, 30]

* IP : intrapéritonéale.

RÉFÉRENCES

37. Lagente V, Chabrier PE, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Pharmacological modulation of the bronchopulmonary action of the vasoactive peptide, endothelin, administered by aerosol in the guinea-pig. *Biochem Biophys Res Comm* 1989 ; 158 : 625-32.
38. Macquin-Mavier I, Levame M, Istin N, Harf A. Mechanisms of endothelin-mediated broncho-constriction in the guinea-pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1989 ; 250 : 740-5.
39. Sarria B, Naline E, Morcillo E, Cortijo J., Esplugues J, Advenier C. Calcium dependence of the contraction produced by endothelin (ET1) in isolated guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol* 1990 ; 187 : 445-53.
40. Turner NC, Dollery CT, Williams AJ. Endothelin-1-induced contractions of vascular and tracheal smooth muscle : effects of nicardipine and BRL 34915. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989 ; 13 : S180-2.
41. O'Donnel SR, Wanstall JC, Zeng XP. Pinacidil antagonism of endothelin-induced contractions of smooth muscle in the lungs : differences between tracheal and pulmonary artery preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 1990 ; 252 : 1318-23.
42. Battistini B, Filep JG, Cragoe EJ, Fournier A, Sirois P. A role for Na^+/H^+ exchange in contraction of guinea-pig airways by endothelin *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 175 : 583-8.
43. Maggi CA, Giuliani S, Patachini R, Rovero P, Giachetti A, Meli A. The activity of peptides of the endothelin family in various mammalian smooth muscle preparation. *Eur J Pharmacol* 1989 ; 174 : 23-31.
44. Nomura A, Uchida Y, Kameyama M, Saotome M, Oki K, Hasegawa S. Endothelin and bronchial asthma. *Lancet* 1989 ; ii : 747-8.
45. Mattoli S, Soloperto M, Marini M, Fasoli A. Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. *J All Clin Immunol* 1991 ; 88 : 376-84.
46. Levin ER. Atrial natriuretic peptide and endothelin : interactions in the central nervous system and the periphery. *Mol Cell Neurosci* 1991 ; 2 : 189-201.
47. Page C, Minshall E. Pharmacology of asthma. *Trends Pharmacol Sci* 1992 ; 13 : centerfold.
48. Lagente B, Boichot E, Mencia-Huerta J, Braquet P. Failure of aerosolized (ET1) to induce bronchial hyperreactivity in the guinea-pig. *Fundam Clin Pharmacol* 1990 ; 4 : 275-80.

et du chat [29], *in vitro* comme *in vivo*. Dans plusieurs cas, l'hypertension est précédée d'une hypotension transitoire. Cet effet peut être inhibé par le maintien du débit sanguin à un niveau constant, sans affecter l'activité hypertensive [21, 29]. Chez le cobaye, la vaso-constriction pulmonaire est inhibée par l'indométacine, un inhibiteur de la cyclo-oxygénase [21]. En revanche, l'augmentation et la diminution de la pression artérielle pulmonaire (PaP) induites par l'ET1 chez le rat ne sont pas modifiées par le méclofénamate [28, 30]. Néanmoins, l'augmentation de la PaP est potentialisée par des inhibiteurs de l'EDRF tels le bleu de méthylène, le pyrogallol et le NG-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) [30], alors que l'hypotension n'est affectée par aucun de ces composés ni par l'oxyhémoglobine [28]. Le WEB 2086 et la chlorphéniramine n'ont aucun effet sur la réponse hypotensive transitoire [28]. Cependant, la vaso-dilatation observée chez le rat est réduite de moitié par des bloqueurs de canaux potassiques, tels le tétraéthylammonium et le glybenclamide, ainsi que par un inhibiteur de la pompe Na^+/K^+ , l'ouabaine [28]. Chez le chat, le méclofénamate et le propranolol n'influencent pas l'effet biphasique de l'ET1 sur la résistance vasculaire du poumon [29]. Sur des vaisseaux isolés précontractés au KCl ou à la phényléphrine, l'ET1 ne cause aucune vaso-dilatation [28], et la force de contraction est augmentée en absence d'endothélium [34].

En résumé, la réponse biphasique induite par l'ET1 dans la circulation pulmonaire est fort complexe et dépend de l'espèce étudiée. L'effet vasopresseur, au niveau de la circulation pulmonaire, est dépendant de la libération de thromboxane A_2 chez le cobaye et le rat, et est modulé par la libération d'EDRF. Les prostaglandines ne semblent pas impliquées dans la réponse hypotensive, alors que le rôle de l'EDRF reste à élucider. Chez ces espèces, l'effet hypotenseur n'est pas dépendant de réflexes autonomes, ni de l'activation de récepteurs bêta-adrénergiques ou de la formation de PAF. Chez le rat, le mécanisme vasodilatateur pourrait impliquer l'activation de canaux potassiques ainsi qu'une hyperpolarisation membranaire.

Perspectives chez l'homme

Études *in vitro*

Le mécanisme d'action des endothélines sur le poumon humain n'est pas clairement défini. Sur des préparations isolées de bronches humaines, la réponse aux faibles doses (1 pM-1nM) d'ET1 est potentialisée par le Bay K 8644, réduite par la nicardipine, et totalement inhibée en absence de calcium dans le milieu. D'autres mécanismes seraient cependant impliqués dans la réponse pulmonaire aux fortes doses d'ET1 (10-300 nM) puisque le Bay K 8644, la nicardipine, le vérapamil et l'indométacine n'ont aucun effet [12, 33]. L'action de l'ET1 dans ces tissus n'apparaît donc pas totalement dépendante du calcium, ni de la relâche d'écicosanoïdes, mais implique probablement des récepteurs spécifiques localisés au niveau du muscle lisse [12]. Les mécanismes en cause dans l'initiation de la contraction du muscle lisse seraient différents de ceux impliqués dans son maintien. Les activités pharmacologiques de l'ET2 et de l'ET3 sont qualitativement similaires à celles de l'ET1 bien que moins puissantes [12, 33]. La nature de la contraction induite par l'ET1 étant semblable à celle qui suit l'administration de leucotriènes sur des préparations de bronches humaines, il n'est pas exclu que l'action de l'ET1 soit, chez l'homme, relayée par les leucotriènes [12].

Implications physiologiques et pathologiques de l'endothéline

Les propriétés pharmacologiques de l'ET1 au niveau du poumon, sa libération *in situ* ainsi que la présence de récepteurs, suggèrent que ce peptide pourrait jouer un rôle physiopathologique important dans l'hyperreactivité bronchique, l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire et l'hypertension, ainsi que dans plusieurs autres conditions reliées aux affections pulmonaires, tels l'hypoxie, les chocs endotoxiques et anaphylactiques, etc. A ce jour, deux études révèlent des augmentations, des niveaux d'endothéline immunoréac-

tive allant de 400 à 600 %, atteignant 0,1 pM dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de patients asthmatiques [44, 45]. Cette concentration d'endothéline est susceptible d'induire la contraction des voies aériennes chez l'homme [33]. Il est probable que l'endothéline relâchée localement [16, 20] ou à proximité de la couche musculaire lisse induise la broncho-constriction et qu'une faible quantité soit récupérée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire [45]. L'implication des facteurs lipidiques agissant comme médiateurs secondaires dans la réponse induite par l'endothéline conforte l'hypothèse selon laquelle l'endothéline agit comme médiateur dans l'activité contractile de la couche musculaire sous-jacente. Certains effets de l'endothéline dans la circulation pulmonaire sont susceptibles d'être modulés par l'activité d'autres peptides dont l'ANP (*atrial natriuretic peptide*), compte tenu de l'existence d'un système ANP endogène dans le poumon et des effets opposés de ces deux peptides. A ce jour, l'interaction entre ces peptides, telle qu'on peut l'observer dans divers systèmes à l'exclusion du poumon, laisse entrevoir un mécanisme d'interdépendance [46]. D'autres peptides vaso-actifs qui exercent des effets dans le poumon et les voies respiratoires pourraient ainsi moduler l'action broncho-contractile de l'endothéline. Un tableau résumant les médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'asthme peut être trouvé dans la référence [47].

Malgré son potentiel broncho-constricteur, l'ET1, administrée sous forme aérosol sur de courtes ou de longues périodes, ne parviendrait cependant pas à induire une hyper-réactivité bronchique à l'acétylcholine administrée sous forme aérosol chez le cobaye [48]. L'implication des endothélines comme médiateurs de l'inflammation et de l'hypersensibilité pulmonaire reste à confirmer. L'implication de l'endothélium vasculaire du système respiratoire dans les maladies pulmonaires est encore à l'étude. Le développement et l'utilisation d'antagonistes sélectifs, ainsi que l'identification d'inhibiteurs spécifiques de l'enzyme de conversion de l'endothéline sont en cours et permettront d'identifier les rôles physiologi-

ques et les différentes implications pathologiques de cette nouvelle famille de peptides ■

* **GLOSSAIRE** *

Atropine : antagoniste des récepteurs muscariniques M2

Autocoides : substances de courte demi-vie agissant à proximité de leurs lieux de synthèse

Bay K 8644 : agoniste des canaux calciques sensibles à la dihydropyridine

Bleu de méthylène : inhibiteur de la guanylate cyclase soluble

Canaux calciques voltage-sensibles : trois sous-types divisés selon leur sensibilité au voltage et leur potentiel de conductance

- **type L** : activé à un potentiel > -10 mV peu d'inactivation pendant les 200 ms de dépolarisation

- **type N** : activé à un potentiel > 20 mV ; inactivé de façon constante entre 50-110 ms

- **type T** : activé à un potentiel > -70 mV ; inactivé rapidement et complètement en maintenant une dépolarisation pendant 20-50 ms

Chlorphéniramine : antagoniste des récepteurs H1 de l'histamine

EGTA : agent chélateur du Ca²⁺ en présence de Mg²⁺

Eicosanoïdes : acides gras polyinsaturés dérivés de l'acide arachidonique comprenant les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes, etc.

Diphénhydramine : antagoniste des récepteurs H1 de l'histamine

Hexaméthonium : antagoniste sélectif des récepteurs nicotiniens des ganglions autonomes

Mépyramine : antagoniste des récepteurs H1 de l'histamine

Méthysergide : antagoniste des récepteurs de type 5-HT₂ de la 5-hydroxytryptamine

NG-monométhyl-L-arginine : inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase

Oxyhémoglobine : capteur de l'oxyde nitrique (l'EDRF)

Phentolamine : antagoniste des récepteurs α1 et α2 - adrénergique

Propranolol : antagoniste des récepteurs β1,2 - adrénergique

Prostanoïdes : acides gras polyinsaturés comprenant les prostaglandines (PGI₂, PGE₂, PGH₂, PGF₂ α, etc.)

Summary

Endothelins and the lung

The endothelins (ETs) are members of a family of peptides discovered in 1988. The three isopeptides (ET1, ET2, ET3) are potent pressor agents and possess marked vasoconstrictor and bronchospastic effects. The three genes encoding the three isoforms have been identified. ET1, as well as ET2 and ET3, are derived from precursors named big endothelins (big ET1, 2 or 3), which are probably cleaved by an endothelin-converting enzyme (ECE), an enzyme activity recently described in the airways. Administration of ET1 either intravascularly or directly in intact airways by aerosol administration, induced a marked bronchoconstriction. In addition, endothelin-1 has been shown to contract isolated tissues of bronchial or tracheal origin. In some experimental models, endothelins induces biphasic responses in blood pressure which are dependent on the route and type of administration. The bronchospastic effects of ET1 are partly mediated by products of phospholipases (A₂ and C) such as the eicosanoids (prostacyclin, thromboxane A₂), platelet-activating factor, peptidoleukotrienes and phosphatidyl inositols as well as increases in intracellular calcium. These effects involve also the opening of various ionic channels. The roles of endothelins in bronchial hyperreactivity and pulmonary hypertension are presently investigated in many laboratories. The recent development and use of receptor antagonists as well as the identification of ECE inhibitors are now providing some important informations on the pharmacology of the endothelins.

TIRÉS A PART

P. Sirois.