

**Université de Montréal**

**Le niveau réduit d'AMPc dans la surexpression des protéines G $\alpha$ i et la  
prolifération accrue des cellules du muscle lisse vasculaire des rats  
spontanément hypertendus**

**Par**

**Svetlana Gusan**

**Département de physiologie**

**Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures**

**en vue d'obtention du grade de**

**Maîtrise en Sciences (M.Sc.)**

**avril 2012**

**© Svetlana Gusan, 2012 Université de Montréal**

**Université de Montréal**  
**Faculté des Études Supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**

**Le niveau réduit d'AMPc dans la surexpression des protéines G $\alpha$ i et la prolifération  
accrue des cellules du muscle lisse vasculaire des rats spontanément hypertendus**

**Présenté par**

**Svetlana Gusan**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Dr Rémy Sauvé (président-rapporteur)**

**Dr Madhu B. Anand-Srivastava (directrice de recherche)**

**Dr Michèle Brochu (membre du jury)**

## RÉSUMÉ

Nous avons précédemment montré que les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) des rats spontanément hypertendus (SHR) présentent une expression augmentée des protéines G inhibitrices (Gi) et une prolifération cellulaire accrue par rapport aux CMLV des rats Wistar-Kyoto (WKY). Le niveau d'AMPc s'est également avéré plus faible dans les CMLV de SHR. La présente étude a donc été entreprise afin d'examiner la contribution de la diminution du niveau intracellulaire d'AMPc à l'augmentation de l'expression des protéines Gi et à la prolifération accrue des CMLV de SHR et de continuer à explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents responsables de cette réponse. Les CMLV de SHR ont montré par rapport aux CMLV des WKY une expression accrue de  $G_{i\alpha-2}$  et  $G_{i\alpha-3}$  qui a été diminué d'une manière dépendante de concentration par le dbcAMP, un analogue d'AMPc perméable à la membrane cellulaire. En outre, les fonctions augmentées des protéines Gi comme démontrées par l'amplification de l'inhibition de l'adénylate cyclase par les hormones inhibitrices et l'activité forskoline (FSK)-stimulée de l'adénylate cyclase par une faible concentration de  $GTP\gamma S$  dans les CMLV de SHR ont également été restaurées aux niveaux de WKY par le dbcAMP. La prolifération accrue des CMLV de SHR a également été atténuée par le dbcAMP et la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase. De plus, dbcAMP a restauré la production augmentée d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), l'activité de la NAD(P)H oxydase et l'expression accrue des protéines Nox 4 et  $p47^{phox}$  observée dans les CMLV de SHR jusqu'au niveau contrôle. Par ailleurs, la phosphorylation accrue des PDGF-R, EGF-R, c-Src et ERK1/2 énoncée par les CMLV de SHR a également été diminuée par le dbcAMP d'une manière dépendante de concentration. Ces résultats suggèrent que le niveau réduit d'AMPc intracellulaire montré par les CMLV de SHR contribue à l'expression accrue des protéines Gi et à l'hyperprolifération cellulaire à travers l'augmentation du stress oxydatif, la transactivation des EGF-R, PDGF-R et la voie de signalisation des MAP kinases.

**Mots clés:** protéines Gi, prolifération cellulaire; AMPc; stress oxydatif; récepteurs des facteurs de croissance; ERK1/2; cellules musculaires vasculaires lisses; rats SHR.

## ABSTRACT

We have previously shown that vascular smooth muscle cells (VSMC) from spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit enhanced expression of inhibitory G proteins (Gi) and enhanced cell proliferation as compared to VSMC from Wistar-Kyoto rats (WKY). The levels of cAMP were shown to be decreased in VSMC from SHR. The present study was therefore undertaken to examine the contribution of the decreased intracellular level of cAMP in the enhanced expression of Gi proteins and increased proliferation of VSMC from SHR and to further explore the underlying molecular mechanisms responsible for this response. VSMC from SHR showed an enhanced expression of  $G_{i\alpha-2}$  and  $G_{i\alpha-3}$  as compared to VSMC from WKY which was decreased in a dose-dependent manner by dbcAMP, a cell-permeable cAMP analog. In addition, the enhanced functions of Gi proteins as demonstrated by enhanced inhibition of adenylyl cyclase by inhibitory hormones and forskolin (FSK)-stimulated adenylyl cyclase activity by low concentration of  $GTP\gamma S$  in VSMC from SHR were also restored to the WKY levels by dbcAMP. The enhanced proliferation of VSMC exhibited by SHR was also attenuated by dbcAMP and forskolin, an activator of adenylyl cyclase. In addition, dbcAMP also restored the increased production of superoxide anion ( $O_2^-$ ), NAD(P)H oxidase activity and enhanced expression of Nox 4 and p47<sup>phox</sup> proteins observed in VSMC from SHR to control levels. Furthermore, the increased phosphorylation of PDGF-R, EGF-R, c-Src and ERK1/2 exhibited by VSMC from SHR were also decreased by dbcAMP in a dose-dependent manner. These results suggest that decreased levels of intracellular cAMP exhibited by VSMC from SHR contributes to the enhanced expression of Gi proteins and hyperproliferation through increasing oxidative stress and transactivation of EGF-R, PDGF-R and MAP kinase signaling pathway.

**Key words:** Gi proteins; cell proliferation; cAMP; oxidative stress; growth factor receptors; ERK1/2; vascular smooth muscle cells; SHR.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv
<b>Chapitre 1–Introduction et revue de la littérature.....</b>	<b>1</b>
1. Le système circulatoire.....	2
1.1. Le cœur.....	2
1.2. Les vaisseaux sanguins.....	3
1.2.1. Les artères.....	3
1.2.1.1. Les artères de conductance.....	4
1.2.1.2. Les artères de résistance.....	4
1.2.2. Les veines.....	4
1.2.3. La microcirculation.....	5

1.3. Régulation de la pression artérielle.....	5
1.3.1. Mécanismes de régulation à court terme.....	6
1.3.1.1. Les barorécepteurs.....	7
1.3.1.2. Les chémorécepteurs.....	7
1.3.2. Mécanismes de régulation à long terme.....	8
1.3.2.1. Contrôle de la tonicité vasomotrice des artères et des veines.....	8
1.3.2.2. Les mécanismes intracellulaires de régulation du tonus du muscle lisse vasculaire .....	10
1.3.2.3. Contrôle du volume circulant efficace.....	13
2. L'hypertension artérielle.....	14
2.1. La pathophysiologie de l'hypertension.....	15
2.2. Un modèle animal d'hypertension primaire : le rat spontanément hypertendu (SHR).....	17
3. Les mécanismes de signalisation cellulaire impliqués dans le développement de l'hypertension.....	18
3.1. Le système de l'adénylate cyclase/AMPC.....	18
3.1.1. Généralités.....	18
3.1.2. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	20
3.1.3. Les protéines G.....	21
3.1.4. L'adénylate cyclase (AC).....	23
3.1.4.1. Structure.....	23

3.1.4.2. Isoformes.....	25
3.1.4.3. Régulation de l'activité de l'AC.....	25
3.1.4.3.1. Régulation par les protéines G.....	25
3.1.4.3.2. Régulation par d'autres mécanismes.....	26
3.1.4.4. L'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc).....	26
3.1.5. Altération de l'expression des protéines G dans l'hypertension.....	30
3.1.6. Altération de l'AMPc dans l'hypertension.....	31
3.2. Les récepteurs aux facteurs de croissance.....	32
3.2.1. Descriptions générales.....	32
3.2.2. Mécanismes de signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance (RFC).....	33
3.2.2.1. La voie de ras-MAPK.....	34
3.2.2.2. La voie de PI3K-AKT.....	35
3.2.2.3. La voie de c-Src.....	36
3.2.3. Transactivation des RFC.....	37
3.2.4. Les MAPK dans la pathologie cardiovasculaire.....	39
3.3. Le stress oxydatif.....	39
3.3.1. Les sources des espèces réactives oxygénées (ERO).....	40
3.3.1.1. Les sources enzymatiques des ERO.....	41
3.3.1.1.1. La NAD(P)H oxydase.....	42
3.3.1.1.2. Structure de la NAD(P)H oxydase.....	42
3.3.1.1.3. La NAD(P)H oxydase au niveau vasculaire.....	43
3.3.1.2. Les sources nonenzymatiques.....	45

3.3.1.3. <i>Le stress oxydatif induit par les peptides vasoactifs</i> .....	45
3.3.1.3.1. L'angiotensine II (Ang II) et le stress oxydatif.....	45
3.3.1.3.2. L'endothéline 1 (ET 1) et le stress oxydatif.....	47
3.3.2. Les voies de signalisation activées par les ERO.....	47
3.3.2.1.1. Les récepteurs aux facteurs de croissance.....	48
3.3.2.1.2. Le MAP kinases.....	49
3.3.3. Implication du stress oxydatif dans l'hypertension.....	50
3.3.3.1. <i>Le dommage vasculaire</i> .....	50
3.3.3.2. <i>L'hypertension dans l'espèce humaine</i> .....	51
4. Hypothèse et objectifs.....	51
<b>Chapitre 2 – Article scientifique</b> .....	<b>55</b>
<b>Chapitre 3 – Discussion et conclusions</b> .....	<b>93</b>
1. Discussion.....	94
2. Conclusions.....	98
3. Perspectives.....	100
4. Bibliographie.....	103



## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I

<b>Figure 1.1.</b> La microcirculation.....	5
<b>Figure 1.2.</b> Schéma de l'activation de la contraction du muscle lisse.....	13
<b>Figure 1.3.</b> La signalisation par un RCPG $G_{\alpha s}$ , le $EP_2$ , récepteur de la prostaglandine $E_2$ , et un RCPG $G_{\alpha i}$ , le mGluR3, récepteur du glutamate métabotrope 3, à l'adénylate cyclase.....	19
<b>Figure 1.4.</b> Structure des récepteurs couplés aux protéines G.....	21
<b>Figure 1.5.</b> Cycle d'activation et d'inactivation des protéines G.....	23
<b>Figure 1.6.</b> Structure de l'adénylate cyclase.....	24
<b>Figure 1.7.</b> L'AMP cyclique est générée à partir de l'ATP.....	29
<b>Figure 1.8.</b> Le modèle de la transduction du signal du récepteur au facteur de croissance épidermique.....	34
<b>Figure 1.9.</b> Le mécanisme ligand-dépendant de transactivation de l'EGF-R par les récepteurs couplés aux protéines G.....	38
<b>Figure 1.10.</b> Activation de la NAD(P)H oxydase.....	43
<b>Figure 1.11.</b> Altération des certaines voies de signalisation à long terme stimulées par l'AngII dans l'hypertension.....	46
<b>Figure 1.12.</b> Schéma illustratif des objectifs.....	54

### Chapitre II

<b>Figure 2.1.</b> Effect of various concentrations of dbcAMP on the levels of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12-weeks Old SHR and age-matched WKY.....	83
<b>Figure 2.2.</b> Effect of dbcAMP on hormonal inhibition of adenylyl cyclase activity in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.....	84
<b>Figure 2.3.</b> Effect of dbcAMP on GTP $\gamma$ S-mediated inhibition of forskolin (FSK)-stimulated adenylyl cyclase activity in VSMC from 12-weeks old	

SHR and age-matched WK.....	85
<b>Figure 2.4.</b> Effect of dbcAMP on thymidine incorporation and cell number in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.....	86
<b>Figure 2.5.</b> Effect of dbcAMP on superoxide anion ( $O_2^-$ ) production and NAD(P)H oxidase activity in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY....	87
<b>Figure 2.6.</b> Effect of various concentrations of dbcAMP on the levels of Nox 4 and p47 <sup>phox</sup> proteins in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY...88	
<b>Figure 2.7.</b> Effect of various concentrations of dbcAMP on EGF-R and PDGF-R phosphorylation in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.....	89
<b>Figure 2.8.</b> Effect of various concentrations of dbcAMP on c-Src phosphorylation in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.....	90
<b>Figure 2.9.</b> Effect of various concentrations of dbcAMP on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.....	91
<b>Figure 2.10.</b> Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which decreased intracellular cAMP increase the expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins and cellular proliferation in VSMC from SHR.....	92

### Chapitre III

<b>Figure 3.1.</b> Schéma intégratif des conclusions.....	99
---	----

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AC	adénylate cyclase
AMPC	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
Ang II	angiotensine II
ANP	peptide natriurétique auriculaire
AT <sub>1</sub>	récepteur de l'angiotensine II de type 1
ATP	adénosine triphosphate
CNP	peptide natriurétique de type C
CMLV	cellules musculaires lisses vasculaires
DAG	diacylglycérol
DOCA-salt	modèle de rats hypertendus dû à un traitement au sel et à la déoxycorticostérone
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine
EGF	facteur de croissance épidermal
EGF-R	récepteur au facteur de croissance épidermal
Epac	<i>exchange proteins directly activated by cAMP</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ERO	espèces réactives oxygénées
ET-1	endothéline-1
ET <sub>A</sub>	récepteur de l'endothéline de type A
ET <sub>B</sub>	récepteur de l'endothéline de type B

FSK	forskoline
GDP	guanosine diphosphate
Gi	protéine G inhibitrice
Gs	protéine G stimulatrice
GTP	guanosine triphosphate
GTP $\gamma$ S	guanosine 5'-O-(3'thiotriphosphate)
HO $^-$	anion hydroxide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogene
IP3	inositol 1,4,5 triphosphate
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kilodalton
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MLCK	kinase des chaînes légères de la myosine
MPCP	phosphatase des chaînes légères de la myosine
NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	monoxide d'azote
NOS	synthase du monoxyde d'azote
O <sub>2</sub> $^-$	anion superoxyde
OHOO $^-$	peroxynitrite
PDE	phosphodiesterase
PDGF	facteur dérivé des plaquettes

PDGF-R	récepteur du facteur dérivé des plaquettes
PI3K	phosphoinositol-3-kinase
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase dépendante du calcium
PLC	phospholipase C
rMLC	chaînes légères de régulation de la myosine
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RFC	récepteurs aux facteurs de croissance
RTK	récepteurs à activité tyrosine kinase
SHR	modèle de rats spontanément hypertendus
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
WKY	rats Wistar-Kyoto

A mes très chers parents et à mon cher mari qui ont toujours été là pour moi,  
et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

## REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais remercier Dr Madhu B. Anand-Srivastava qui m'a accueillie dans son laboratoire de recherche et qui m'a permis de poursuivre mes études supérieures sous sa supervision. Un immense merci pour son encadrement, ses conseils, ses encouragements, sa patience et sa confiance en moi.

Je remercie aussi Dr Michèle Brochu et Dr Rémy Sauvé d'avoir gracieusement accepté de faire partie de mon groupe de jury et d'avoir accordé le temps nécessaire à la correction de mon mémoire.

Je veux chaleureusement remercier mes collègues de laboratoire et amis Nathan, Yessica, Jasmine, Mehdi, Yousra, Magda ainsi que Dr Yuan Li pour l'esprit d'équipe, l'atmosphère agréable qu'ils m'ont offert. J'apprécie beaucoup leur disponibilité constante et les échanges positifs qu'on a eus ensemble.

Je tiens également à remercier tous les membres du Département de physiologie, les professeurs, les assistants de recherche, les étudiants et les secrétaires. L'ambiance amicale qu'ils ont su créer a rendu le travail beaucoup plus captivant et agréable au sein du département.

Finalement, je veux remercier mes parents Efimia et Anatolie, mon mari Eudochim, mon grand-père Boris, ma sœur Marina, mon frère Valentin, mon beau-frère Vladimir, mes nièces Vlada et Mirela pour leur soutien et leur appui. Ils ont toujours été présents et ils m'ont épaulé quoi qu'il arrive. Ils m'ont aidé à trouver les forces pour avancer et le courage pour faire face aux difficultés.

**CHAPITRE 1**

**INTRODUCTION**

**ET**

**REVUE DE LITTÉRATURE**



# 1 LE SYSTÈME CIRCULATOIRE

La nécessité d'un système circulatoire est une conséquence de l'évolution aussi que de l'augmentation de la taille et de la complexité des organismes multicellulaires. Dans les organismes complexes, le système circulatoire fournit un gradient de concentration du sang vers les cellules centrales pour les nutriments et en direction opposée pour les déchets. La maintenance d'un tel gradient de concentration intracellulaire-vers-extracellulaire nécessite un système de convection rapide qui va faire circuler vite le liquide parmi les surfaces qui sont en équilibre avec le milieu externe (ex., les poumons, les intestins, l'épithélium rénale) et les cellules centrales particulières situées profondément à l'intérieur de l'organisme (Boron and Boulpaep 2005). Pour les mammifères et les oiseaux, l'échange des gaz avec le milieu externe est tellement important qu'ils ont développé un système de circulation double avec deux pompes qui fournit le débit complet du cœur vers les poumons. Le système circulatoire des humains intègre trois éléments fonctionnels de base : une pompe (le cœur) qui fait circuler un liquide (le sang) à travers un ensemble de tubes (les vaisseaux).

## 1.1 Le cœur

Une pompe remarquable, pesant environ 300g, qui fait fonctionner la circulation humaine. En réalité le cœur est constitué de deux pompes, le cœur gauche ou la pompe principale et le cœur droit ou la pompe stimulante (Boron and Boulpaep 2005). Celles-ci opèrent en série et nécessitent une égalisation délicate des leurs débits. Le débit de chaque pompe est d'environ 5 litres/min, mais il peut facilement augmenter de cinq fois pendant l'exercice. Avec chaque battement, les ventricules transmettent l'énergie nécessaire pour faire circuler le sang en générant la charge de pression qui pousse le débit à travers le système vasculaire.

## 1.2 Les vaisseaux sanguins

À partir de l'anatomie, on peut diviser le système vasculaire en deux circuits principaux : la circulation systémique et la circulation pulmonaire. On peut aussi diviser le système vasculaire dans deux parties : une partie à haute pression qui s'étend du ventricule gauche contractante jusqu'aux capillaires systémiques et une partie à basse pression qui s'étend à partir des capillaires systémiques à travers le cœur droit, via la circulation pulmonaire et l'oreillette gauche jusqu'au ventricule gauche dans son état relâché (Boron and Boulpaep 2005).

La paroi des vaisseaux sanguins est composée de trois couches : tunica intima, tunica media et tunica adventitia. Les capillaires, qui possèdent juste une couche interne des cellules endothéliales reposant sur une lame basale, sont l'exception. L'intima est constituée des cellules endothéliales qui se trouvent en contact direct avec le sang. Celles-ci sécrètent plusieurs substances vasoactives comme, par exemple, le monoxyde d'azote, l'ET-1 et le peptide natriurétique de type C (CNP) qui modifient le diamètre des vaisseaux. Après l'intima vient tunica media qui est constituée des cellules du muscle lisse (CML) qui jouent un rôle primordial dans la réactivité vasculaire : elle permet la vasodilatation et la vasoconstriction de l'artère. Tunica adventitia quant à elle est constituée de fibres élastiques et de fibres de collagène permettant ainsi l'ancrage des vaisseaux aux structures environnantes (Berne and Levy 2001; Tortora and Grabowski 2003).

### 1.2.1 Les artères

La fonction des artères est de transporter le sang sur haute pression vers les tissus. Pour cette raison leurs parois sont solides et le flux sanguin y est rapide (Guyton and Hall 2000). Selon l'amplification de la pression transmurale, les artères augmentent en diamètre. Mais le changement de diamètre n'est pas pareil dans les deux types d'artères, il est beaucoup plus haut dans les artères élastiques ou de conductance en comparaison avec les artères musculaires ou de résistance.

### ***1.2.1.1 Les artères de conductance***

Les artères de conductance ou élastiques comme, par exemple, l'aorte ont moins de couches de muscle lisse et ne sont pas sous contrôle nerveux. La concordance d'une artère élastique est substantielle : l'augmentation de la pression transmurale de 0 à 100 mm Hg, ce qui correspond à la pression artérielle moyenne, augmente le volume relatif de l'artère par environ 180%. Avec une augmentation supplémentaire de la pression et du diamètre, la concordance des artères ne diminue que légèrement (Boron and Boulpaep 2005).

### ***1.2.1.2 Les artères de résistance***

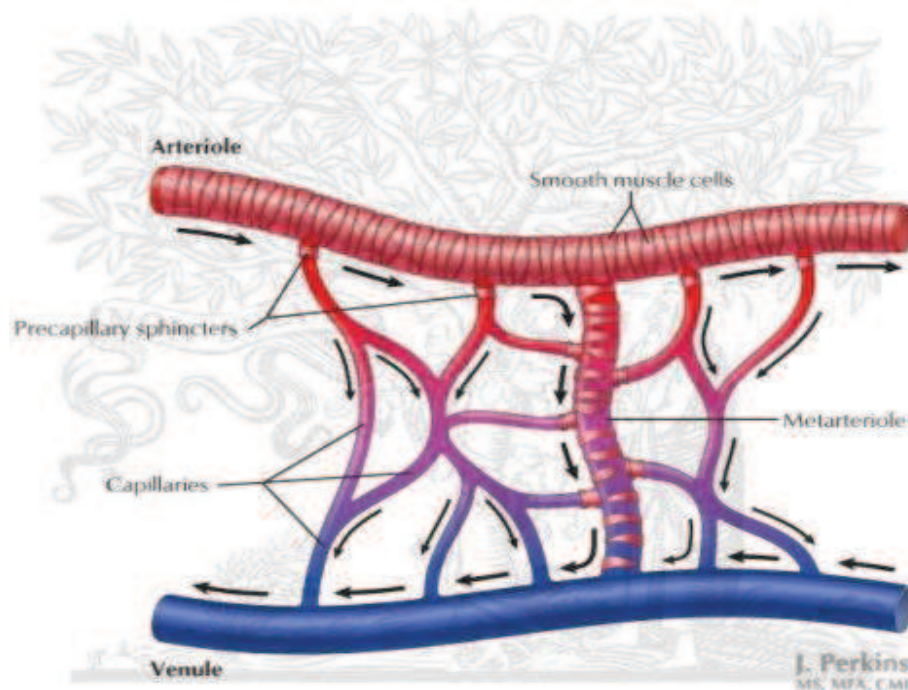
Dans les artères de résistance ou musculaires, le renforcement de la pression n'augmente que légèrement le diamètre dans des conditions physiologiques. Les artères musculaires ont une résistance plutôt stable. Elles jouent un rôle important dans la régulation de la distribution du sang vers les organes. Pourtant, elles sont sensibles aux changements de pression et de débit cardiaque. Par des mécanismes locaux, elles ont la capacité de s'adapter à leur environnement biomécanique. Lorsque le flux sanguin change, l'artère répond rapidement par des modifications fonctionnelles et structurales. Cette réponse est assurée par des mécanismes humoraux autocrines et/ou paracrines. Par contre, lorsque la réponse vasomotrice est insuffisante pour compenser une augmentation chronique du débit sanguin, l'artère subit un remodelage vasculaire (Boron and Boulpaep 2005).

## **1.2.2 Les veines**

Les veines sont des vaisseaux qui assurent le retour au cœur du sang quittant les tissus, et ont aussi une fonction non moins importante, elles sont le principal réservoir de sang. Parce que la pression dans le système veineux est très basse, les parois veineuses sont minces. Elles sont pourtant musclées, ce qui permet aux veines de se contracter ou de se dilater et de jouer par conséquent le rôle d'un réservoir de volume variable capable de stocker plus ou moins de sang selon les besoins de l'organisme (Guyton and Hall 2000).

### 1.2.3 La microcirculation

La microcirculation est le site principal pour l'échange des gaz, de l'eau, des nutriments et des déchets. Dans la plupart des tissus, l'écoulement capillaire sert exclusivement à ces besoins nutritionnels. Cependant, dans quelques tissus, une grande partie du débit capillaire est non-nutritionnel. Dans le glomérule rénal, par exemple, le flux capillaire forme le filtrat glomérulaire. La circulation sanguine à travers la peau joue un rôle clé dans la régulation thermique. Les capillaires servent également à d'autres fonctions non-nutritionnelles, telles que la signalisation, ex. la distribution des hormones et la défense de l'organisme, ex. livraison des plaquettes (Boron and Boulpaep 2005).



**Figure 1.1. La microcirculation**

**Référence:** Mulroney S.E., Myers A.K. Netter's Essential Physiology. p 126.

### 1.3 Régulation de la pression artérielle

La pression sanguine est un facteur hémodynamique déterminant parce qu'une pression artérielle adéquate est nécessaire pour une perfusion appropriée des organes : très basse et

on dit que le patient est en choc, très haute et on parle d'un patient hypertendu. Une élévation aiguë et profonde de la pression artérielle peut être tout aussi dangereuse que son effondrement soudain. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le contrôle de la pression artérielle, certains d'entre eux concernent le contrôle à court terme et d'autres le contrôle à long terme (Boron and Boulpaep 2005). La réglementation à court terme de la pression artérielle, sur une échelle de temps de secondes à quelques minutes, se fait par de voies nerveuses et vise le cœur, les vaisseaux et la médullosurrénale. La régulation à long terme de la pression artérielle, sur une échelle de temps des heures à quelques jours, se produit par de voies qui ciblent les vaisseaux sanguins ainsi que les reins, dans leur contrôle du volume du liquide extracellulaire.

### **1.3.1 Mécanismes de régulation à court terme**

Les réflexes neuronaux qui régulent la pression artérielle moyenne fonctionnent comme une série de boucles de feedback négatif. Toutes ces boucles sont composées des éléments suivants : un détecteur, des voies neuronales afférentes, un centre de coordination, des voies neuronales efférentes et les effecteurs. Un système double de détecteurs et de réflexes neuronaux contrôle la pression artérielle moyenne. Les détecteurs primaires sont les barorécepteurs qui sont effectivement des récepteurs à l'étirement ou mécanorécepteurs détectant la distension des parois vasculaires. Les détecteurs secondaires sont les chémorécepteurs qui perçoivent les changements des  $PO_2$ ,  $PCO_2$  et pH sanguines. Les centres de régulation sont situés dans SNC, principalement dans la moelle, mais des sites dans le cortex cérébral et l'hypothalamus exercent également le contrôle. Les effecteurs comprennent le système de conduction, les cellules du muscle cardiaque, les cellules du muscle lisse vasculaire dans les artères et les veines ainsi que la médullosurrénale (Boron and Boulpaep 2005).

### ***1.3.1.1 Les barorécepteurs***

La boucle de feedback négative des barorécepteurs est conçue d'une telle manière que l'augmentation de la pression artérielle moyenne entraîne une vasodilatation et la bradycardie tandis que sa diminution provoque une vasoconstriction et la tachycardie. Les détecteurs se trouvent sur des sites exposés à haute pression comme le sinus carotidien et la crosse aortique. Les barorécepteurs tant dans le sinus carotidien que dans la crosse aortique sont les extrémités ramifiées et enroulées des fibres nerveuses sensibles myélinisées imbriquées dans les couches élastiques. Les barorécepteurs sont plutôt sensibles à l'étirement et à l'altération de la paroi vasculaire aussi bien produite par un renforcement de la pression transmurale que par l'augmentation de la pression elle-même (Boron and Boulpaep 2005).

### ***1.3.1.2 Les chémorécepteurs***

Les détecteurs secondaires, les chémorécepteurs périphériques, jouent aussi un rôle important dans le contrôle de la pression sanguine. Tandis que les impulsions provenant des barorécepteurs exercent une commande négative sur le centre vasomoteur médullaire, provoquant la vasodilatation; les chémorécepteurs périphériques exercent une commande positive, provoquant la vasoconstriction. Une baisse du  $PO_2$  et du pH artériels ainsi que une hausse du  $PCO_2$  stimulent les chémorécepteurs périphériques. À travers les nerfs afférents, l'impulsion est transmise au centre vasomoteur d'où par les voies nerveuses efférentes est conduite vers le cœur et les vaisseaux sanguins déclenchant la bradycardie et la vasoconstriction. Il y a deux types des chémorécepteurs périphériques, les corpuscules carotidiens et les corpuscules aortiques qui se trouvent à proximité des barorécepteurs. Dans le système cardiovasculaire, les chémorécepteurs périphériques jouent leur rôle seulement durant une hypoxie sévère ex., dans une hypotension hémorragique (Boron and Boulpaep 2005).

### 1.3.2 Mécanismes de régulation à long terme

En plus des mécanismes neuronaux à action rapide, le contrôle humoral contribue aussi à l'homéostasie de la circulation. Dans la plupart des cas, ce système de contrôle fonctionne sur une échelle de temps de quelques heures ou de quelques jours, beaucoup plus lentement que le contrôle par le SNC médié par les neurotransmetteurs. La régulation humorale de la circulation est divisée en deux classes : 1) les substances vasoactives relâchées dans le sang qui modulent la tonicité vasomotrice des artères et des veines, 2) les substances nonvasoactives qui agissent sur d'autres cibles que le système cardiovasculaire en contrôlant le volume circulant efficace.

#### 1.3.2.1 Contrôle de la tonicité vasomotrice des artères et des veines

Les substances vasoactives endocrines et paracrines suscitent la contraction et la relâche des vaisseaux sanguins. Dans la majorité des cas, le contrôle paracrine domine sur le contrôle endocrine. Les messagers chimiques qui contrôlent les vaisseaux sanguins peuvent être des amines, des peptides, des dérivés de l'acide arachidonique ou des gaz comme l'oxyde nitrique (Boron and Boulpaep 2005).

Les **amines biogènes** peuvent être des vasoconstricteurs (l'épinéphrine et la sérotonine) ou des vasodilatateurs (l'histamine). La source de l'**épinéphrine** est la médullosurrénale qui exerce son action sur les vaisseaux sanguins en activant les récepteurs  $\alpha_1$ , les récepteurs adrénergiques prédominants à ce niveau là, provoquant la vasoconstriction. L'épinéphrine se lie aussi aux récepteurs  $\beta_1$  dans le cœur augmentant ainsi la contractilité et la fréquence cardiaque. Pour le système cardiovasculaire, les effets des catécholamines originaires de la médullosurrénale sont généralement mineurs comparés à ceux de la norépinéphrine libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques. La **sérotonine** est une monoamine présente dans les terminaisons nerveuses ainsi que dans les plaquettes et les mastocytes. La sérotonine circulante est un vasoconstricteur qui agit plutôt au niveau local que systémique. La sérotonine est particulièrement importante dans les dommages vasculaires en contribuant à l'hémostase.

L'*histamine* est présente dans les terminaisons nerveuses, mais peut aussi être relâchée en réponse aux lésions tissulaires ou à l'inflammation. L'histamine est un vasodilatateur.

Les **peptides vasoactives** peuvent être des vasoconstricteurs ou des vasodilatateurs. L'*angiotensine II* (Ang II) fait partie de la cascade rénine-angiotensine-aldostérone et est un vasoconstricteur puissant. Elle est synthétisée à partir de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Dans les cellules du muscle lisse vasculaire, l'Ang II se lie aux récepteurs AT<sub>1</sub>, des récepteurs couplés aux protéines G, et active la phospholipase C, augmente le [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, inhibe l'adénylate cyclase et diminue le niveau d'AMPc, ayant comme résultat final la vasoconstriction. Cependant, dans des conditions normales, elle n'est pas présente dans des concentrations plasmatiques suffisamment élevées pour provoquer une vasoconstriction systémique. Au contraire, l'Ang II joue un rôle majeur dans le contrôle du système cardiovasculaire pendant les hémorragies, l'exercice et d'autres conditions similaires qui réduisent le débit sanguin rénal. La *vasopressine* est libérée par l'hypophyse postérieure et est connue aussi comme l'hormone antidiurétique. La vasopressine a un effet vasoconstricteur seulement dans des concentrations supérieures à celles qui sont fortement antidiurétiques. Le choc hémorragique provoque la libération accrue de la vasopressine ainsi que la vasoconstriction qui elle permet une restauration transitoire de la pression artérielle (Boron and Boulpaep 2005). Les *endothélines* (ETs) sont produites par les cellules endothéliales et même si sur une base molaire les ETs sont les vasoconstricteurs les plus puissants, il n'est pas clair si ces agents paracrines jouent un rôle dominant dans l'homéostasie générale de la pression sanguine. Le *facteur natriurétique auriculaire* (ANP de l'anglais *atrial natriuretic peptide*) est relâché par les myocytes auriculaires en réponse à l'étirement et est un vasodilatateur puissant. L'ANP a aussi des effets natriurétique et diurétique, il réduit le volume plasmique, et par conséquent, la pression sanguine.

Les **prostaglandines** sont synthétisées dans plusieurs tissus à partir de l'acide arachidonique. La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sont des vasodilatateurs particulièrement forts. Dans les veines et dans quelques artères l'acide arachidonique provoque des contractions endothélium-dépendantes (Boron and Boulpaep 2005).



L'**oxyde nitrique** (NO) est produit dans les cellules endothéliales par l'oxyde nitrique synthétase à partir de l'arginine. Le NO est un vasodilatateur paracrine puissant, qui joue un rôle important dans l'homéostasie générale de la pression sanguine. Il agit par la stimulation de la guanylate cyclase soluble et la formation du GMP cyclique (Surks 2007).

Les **mécanismes à la base de l'EDHF** (de l'anglais *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) sont responsables principalement de la modulation du tonus des CMLV dépendante de l'endothélium dans les artères de résistance. La contribution de l'EDHF à la dilatation dépendante de l'endothélium augmente avec la diminution du diamètre des vaisseaux. Étant donné que les réponses médiées par l'EDHF sont plus fortes après l'inhibition de la NOS, il pourrait être suggéré que la production continue de NO par les cellules endothéliales amortit la génération de l'EDHF et/ou le mécanisme de son action. L'EDHF est un mécanisme de secours qui s'active lorsque la production de NO est diminuée (Luksha, Agewall et al. 2009). Les réponses médiées par l'EDHF, suite à une stimulation des récepteurs couplés aux protéines G par des agonistes, sont initiées par une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) dans les cellules endothéliales et par conséquent l'activation des canaux  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  endothéliales ce qui provoque une hyperpolarisation des cellules endothéliales. Dans certains tissus, l'hyperpolarisation des cellules endothéliales pourrait être régulée par l'activation du cytochrome P450 et la génération résultante des acides epoxyeicosatriénoïques (EETs de l'anglais *epoxyeicosatrienoic acids*). L'hyperpolarisation endothéliale se propage ensuite vers les cellules musculaires lisses adjacentes par deux mécanismes: les jonctions myo-endothéliales (MEGJ de l'anglais *myoendothelial gap junctions*) qui peuvent aussi être modulées par les EETs et l'efflux de  $\text{K}^+$  à travers les canaux ioniques endothéliaux  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  qui induit l'hyperpolarisation des myocytes environnantes par l'activation des canaux  $\text{K}_{\text{IR}}$  et/ou la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ . Ces mécanismes ne sont pas nécessairement incompatibles, ils peuvent se produire simultanément ou successivement et agir en synergie. L'hyperpolarisation des CMLV induit leur relaxation par la fermeture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants ( $\text{vCa}^{2+}$ ) et par la réduction du turn-over des phosphatidylinositides intracellulaires ce qui diminue le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Busse, Edwards et al. 2002).

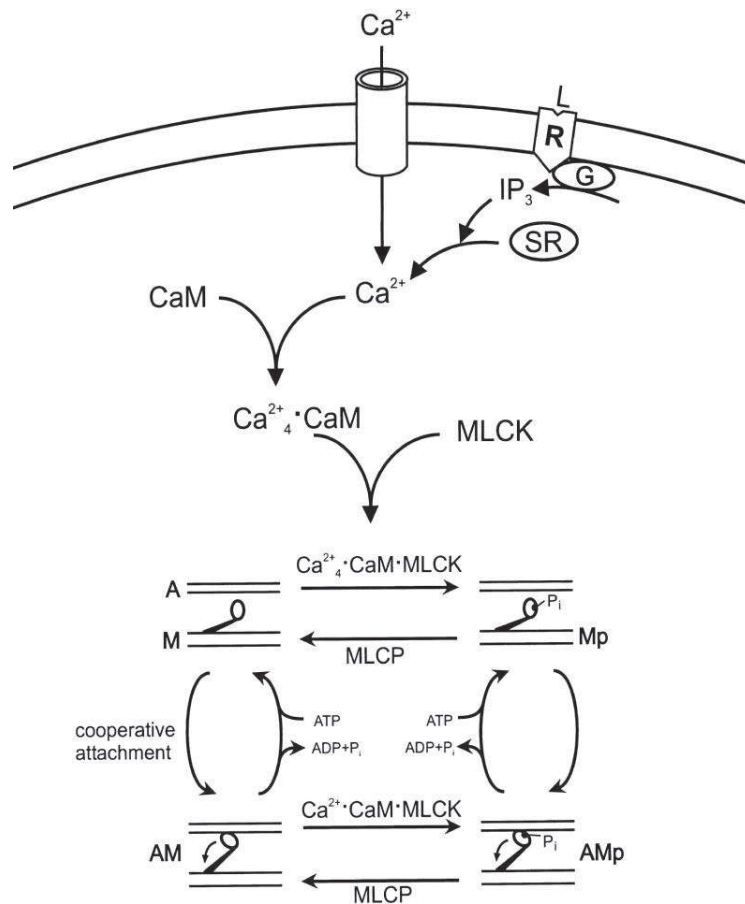
### ***1.3.2.2 Les mécanismes intracellulaires de régulation du tonus du muscle lisse vasculaire***

Les deux principales protéines impliquées dans la contraction musculaire sont l'actine et la myosine. La contraction des muscles comprend l'attachement et le détachement cyclique de la partie globulaire de la myosine au filament actine, ce qui permet aux filaments d'actine et de myosine de coulisser l'un devant l'autre. L'énergie pour l'interaction actine-myosine est fournie par l'ATP. Le fonctionnement ATP-ase de la myosine activé par l'actine catalise la déphosphorylation de l'ATP avec la libération de l'énergie. (Adelstein and Eisenberg 1980). Dans le muscle lisse vasculaire des vertébrés, les chaînes légères de régulation de la myosine (rMLC de l'anglais *regulatory light chains of myosin II*) inhibent le fonctionnement ATPase déclenché par l'actine. La phosphorylation des rMLC par la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK de l'anglais *myosin light-chain kinase*)  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendante et la déphosphorylation par une phosphatase de type 1 (MLCP de l'anglais *myosin light-chain phosphatase*) qui est liée à la myosine par une sous-unité régulatrice (MYPT1) sont les mécanismes principaux du contrôle du tonus du musculaire lisse vasculaire. De l'équilibre entre l'activité de la MLCK et de la MLCP dépend l'ampleur de la phosphorylation des rMLC et, par conséquent, de la force de contraction (Pfitzer 2001).

L'activation des cellules du muscle lisse vasculaire par différents agonistes ou par la dépolarisation électrique entraîne une augmentation rapide du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui se lie à la calmoduline et active la MLCK, ce qui conduit à la phosphorylation des rMLC principalement au niveau de la Ser(19) (Somlyo and Somlyo 1994). La phosphorylation des rMLC permet au fonctionnement ATPase de la myosine d'être déclenché par l'actine, et par conséquent, de produire la contraction musculaire. Lors de la contraction, le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les muscles lisses augmente soit à la suite de l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'espace extracellulaire soit à la suite de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des réserves intracellulaires (Horowitz, Menice et al. 1996). L'influx du calcium à travers la sarcolemme dans des conditions physiologiques se produit par l'entremise des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants de type T et L (transitoire et de longue durée, respectivement), ou par l'intermédiaire de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemmale (McDonald, Pelzer et al. 1994). La libération du calcium des

réerves intracellulaires passe à travers les canaux activés par l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) ou via le phénomène de "Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release" à travers le récepteur de la ryanodine. L'IP<sub>3</sub> est un produit soluble de l'hydrolyse de la phospholipase C généré lors de la stimulation des RCPG couplés aux protéines Gq/11 (Berridge 1993).

Les rMLC peuvent également être phosphorylés d'une manière indépendante de Ca<sup>2+</sup> par la protéine kinase Rho-associée (ROK). ROK est activée par la Rho, une GTPase monomérique Ras-associée qui à son tour est activée par les RCPG couplés aux protéines G<sub>12/13</sub> (Amano, Ito et al. 1996). La phosphorylation du MYPT1 par ROK entraîne l'inhibition de la MLCP. Par contre, l'activité de la MLCP est augmentée par les kinases dépendantes d'AMPc et du GMPc (PKA et PKG, respectivement) ce qui résulte en une diminution de la phosphorylation des rMLC sensible au Ca<sup>2+</sup> et une réduction de la force de contraction. Il est bien établi que l'AMPc et le GMPc diminuent la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> de la contraction à la fois dans le muscle lisse intact et dans le muscle lisse perméabilisé (Kerrick and Hoar 1981; Van Riper, Weaver et al. 1995; Seguchi, Nishimura et al. 1996). In vitro, la PKA phosphoryle la MLCK sur deux sites, A et B, situés vers l'extrémité COOH-terminale par rapport au domaine de liaison de la calmoduline. La phosphorylation du site A et pas du site B a diminué l'affinité de la MLCK pour le complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (Conti and Adelstein 1981), et on a pensé que ceci est responsable de la désensibilisation. Toutefois, les agents qui augmentent l'AMPc in vivo ont des effets négligeables sur la phosphorylation de site A et sur l'activation de la MLCK par le Ca<sup>2+</sup> (Stull, Hsu et al. 1990). Ceci suggère que l'AMPc désensibilise le muscle lisse par un autre mécanisme qui n'est pas encore défini. En ce qui concerne le GMPc, il a été expérimentalement confirmé que la MLCP est activée par ce messenger second soit directement (Surks, Mochizuki et al. 1999) soit indirectement par la phosphorylation de la télodine (Wu, Haystead et al. 1998) ou l'inhibition de RhoA (Sauzeau, Le Jeune et al. 2000).



**Figure 1.2. Schéma de l'activation de la contraction du muscle lisse**

**Abréviations:** *G*, les protéines hétérotrimériques  $G_{q/11}$ , *R*, récepteur, *L*, ligand,  $IP_3$ , inositol 1,4,5-triphosphate, *SR*, réticulum sarcoplasmique, *CaM*, calmoduline, *MLCK*, kinase des chaînes légères de la myosine, *MLCP*, myosin light-chain phosphatase, *A*, actine, *M*, la myosine nonphosphorylée, *M<sub>p</sub>*, la myosine phosphorylée, *AM* and *AM<sub>p</sub>*, force-generating cross bridges.

**Référence:** Pfitzer G. Invited Review: Regulation of Myosin phosphorylation in smooth muscle. *L Appl Physio* 2001; **91**(1), p.498

### 1.3.2.3 Contrôle du volume circulant efficace

Les voies qui ciblent le contrôle rénal du volume du liquide extracellulaire ainsi que du volume circulant efficace sont les plus importants régulateurs à long terme de la pression

artérielle moyenne. Le volume circulant efficace n'est pas un volume *anatomique* mais plutôt un volume *fonctionnel* du sang qui reflète l'ampleur de la perfusion tissulaire détecté par la plénitude ou la pression dans les vaisseaux. Les détecteurs du volume circulant efficace comme, par exemple, les barorécepteurs et les récepteurs à bas-pression situés dans l'artère pulmonaire, envoient des signaux à l'organe effecteur dominant – les reins – pour changer le taux d'excrétion du  $\text{Na}^+$  dans l'urine. Ces signaux vers les reins suivent quatre voies effectrices parallèles: 1) l'axe de la rénine-Ang II- aldostérone, 2) le système nerveux autonome, 3) la relâche de la vasopressine par l'hypophyse postérieure et 4) la relâche du ANP par les myocytes auriculaires. Parmi ces quatre voies parallèles, l'axe de la rénine-Ang II-aldostérone est la plus importante. Les deux, l'aldostérone et l'Ang II augmente la réabsorption du  $\text{Na}^+$  dans les tubules rénaux mais leur mécanismes d'action sont différents. L'Ang II amplifie la réabsorption du  $\text{Na}^+$  en activant les échangeurs Na-H dans les tubules proximaux, en stimulant la relâche de l'aldostérone, en réduisant la pression hydrostatique dans les capillaires péri-tubulaires. En ce qui concerne l'aldostérone, elle augmente la transcription de la pompe Na-K ainsi que l'expression des canaux  $\text{Na}^+$  apicaux et les cotransporteurs Na/K/Cl. L'effet net de l'action de l'aldostérone est l'augmentation de la réabsorption du  $\text{Na}^+$  et la sécrétion du  $\text{K}^+$ .

## 2 L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE

Selon la Société Canadienne d'Hypertension, l'hypertension artérielle est une préoccupation de santé importante au Canada qui affecte plus de cinq millions de personnes. Aux États-Unis, le nombre de personnes ayant l'hypertension ou qui prennent des antihypertenseurs s'élève à 43 millions, ce qui représente 24% de la population adulte (Carretero and Oparil 2000).

L'hypertension est une condition cardiovasculaire caractérisée par une augmentation soutenue de la pression artérielle. Une pression artérielle moyenne supérieure à 110 mm Hg au repos est considérée comme signe d'hypertension; à ce niveau-là, la pression artérielle diastolique est supérieure à 90 mm Hg et la systolique est supérieure à 140 mm Hg (Guyton and Hall 2000). Il existe deux types d'hypertension, l'hypertension primaire ou essentielle

et l'hypertension secondaire. L'hypertension essentielle compte pour plus de 90% des cas d'hypertension. Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'étiologie de l'hypertension comme la sécrétion inappropriée de la rénine, un apport élevé de sodium à long terme, un mode de vie sédentaire, la surproduction des hormones antinatriurétiques et des vasoconstricteurs.

L'incidence de l'hypertension augmente avec l'âge. Sa prévalence est d'environ 50% dans la population âgée de 60 à 69 ans et augmente jusqu'à 70% dans la population âgée de plus de 70 ans (Suri and Qureshi 2006). Plusieurs études ont rapporté la répercussion des différents facteurs y compris l'âge, la race, le genre, et l'indice de la masse corporelle sur l'hypertension. L'hypertension est un facteur de risque majeur pour l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance cardiaque congestive, les maladies rénales (Mulvany 1991). Malgré les efforts déployés par la recherche, on ignore ce qui déclenche l'hypertension dans la population générale. Dans la plupart des cas, les facteurs génétiques ainsi que environnementaux sont responsables pour la pathogénèse de l'hypertension (Lifton, Gharavi et al. 2001). Les études ont démontré que des mutations dans les gènes de la famille des protéines kinases WNK1 et WNK2 (de l'anglais *With-no-Lysine Ks*) causent le syndrome du Gordon, une forme mendélienne rare d'hypertension suite à une augmentation de la rétention rénale du sodium (Huang, Kuo et al. 2008). Pendant l'hypertension, les petites artères subissent des changements structuraux et fonctionnels qui ont comme conséquence la réduction de la taille de la lumière et l'augmentation de la résistance périphérique (Lehoux and Tedgui 1998).

## 2.1 La pathophysiologie de l'hypertension

Pendant l'hypertension, la paroi vasculaire est soumise constamment à des forces mécaniques sous la forme d'étirage ou de traction due à la pression sanguine et sous la forme de contrainte de cisaillement due au débit sanguin. La contrainte de cisaillement est principalement sentie par les cellules endothéliales situées à l'interface entre le sang et la paroi vasculaire. Les changements fonctionnels soit dans la contrainte de cisaillement soit dans l'étirage aboutissent au remodelage vasculaire. Les processus impliqués dans le remodelage vasculaire comprennent l'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaires ainsi que la

synthèse protéique accrue et la réorganisation de la matrice protéique extracellulaire (Lehoux and Tedgui 1998). La caractéristique primaire de l'hypertension essentielle est l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique qui est associée aux altérations structurales et fonctionnelles des vaisseaux (Korner, Bobik et al. 1989). Les changements structuraux comprennent la réduction du diamètre de la lumière vasculaire et l'épaississement de la tunica media. Au niveau cellulaire, ce sont l'hyperplasie, l'hypertrophie et l'élongation des CMLV qui résultent en une lumière plus petite et en un diamètre plus restreint (Mulvany, Baandrup et al. 1985; Korsgaard, Aalkjaer et al. 1993). Plusieurs facteurs règlent la fonction des CMLV; tout d'abord les peptides vasoactives tels que l'Ang II et l'ET-1 qui stimulent la vasoconstriction et la croissance, ensuite les facteurs de la vasorelaxation tels que l'oxyde nitrique, les prostaglandines et le facteur natriurétique auriculaire qui induisent la vasodilatation (Rubanyi 1991). Les cellules du muscle lisse vasculaire jouent le rôle central dans ces événements. Les CLMV détectent les stimuli mécaniques résultant de l'étirage pulsatile et les traduisent dans des signaux intracellulaires menant à une modulation de l'expression génique et des fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'apoptose, la migration et le remodelage (Haga, Li et al. 2007). En utilisant des CMLV aortiques des rats néonataux, Wilson et ses collègues ont démontré qu'une pression mécanique cyclique induit la production du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, de l'anglais *platelet-derived growth factor*)  $\alpha\alpha$  et  $\beta\beta$  et que la croissance des CMLV induite par la pression a été dépendante de l'action autocrine du PDGF (Wilson, Mai et al. 1993). L'étirement des CMLV induit une phosphorylation rapide du récepteur  $\alpha$  du PDGF indépendamment de l'activation du son ligand (Hu, Bock et al. 1998). L'étirement induit également la phosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF-R, de l'anglais *epidermal growth factor receptor*), ce qui recrute les protéines adaptatrices Shc et Grb2 (de l'anglais *growth factor receptor-bound 2*) qui à leur tour activent le ERK1/2 (de l'anglais *extracellular signal-regulated kinases*) (Iwasaki, Eguchi et al. 2000). Plusieurs molécules des protéines kinases induites par l'étirement ont été identifiées dans les CMLV parmi lesquelles les Phosphoinositides-3 kinases (PI3Ks), la protéine kinase C (PKC), le NF- $\kappa$ B (de l'anglais *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), la famille Rho des GTPases et les MAP kinases. L'étirement des CMLV induit l'activation de la PI3K et de la PKB/AKT qui peuvent être inhibées par un

pré-traitement avec la N-acétylcystéine, un fixateur des espèces réactives oxygénées (EROs), suggérant le rôle des EROs dans la mécano-transduction des CMLV (Zhou, Lee et al. 2003).

## **2.2 Un modèle animal d'hypertension primaire: le rat spontanément hypertendu (SHR)**

Le modèle de rat spontanément hypertendu (SHR) est un modèle analogue à l'hypertension essentielle chez l'humain. Il s'agit d'un modèle d'hypertension génétique créé à la suite des croisements consanguins sélectifs de rats WKY ayant les plus hautes valeurs de pression artérielle. L'hypertension chez les rats SHR apparaît spontanément vers la cinquième semaine et ensuite augmente avec l'âge jusqu'à atteindre une pression systolique autour de 180 à 200 mm Hg (Okamoto and Aoki 1963). L'augmentation du ratio media/lumière observée chez les humains souffrant d'hypertension a également été observée chez le modèle SHR (Heagerty, Aalkjaer, Bund, Korsgaard, et Mulvany, 1993). Dans un article publié en 2001, Intengan et Schiffrin suggèrent fortement que le remodelage vasculaire observé chez les rats SHR est identique à celui remarqué chez les humains souffrant d'hypertension artérielle (Intengan and Schiffrin 2001). Ce modèle permet donc à la communauté scientifique d'approfondir ses connaissances relatives aux mécanismes à l'origine du remodelage vasculaire à tous les niveaux, que ce soit les mécanismes menant à l'hyperplasie ou encore ceux qui induisent l'hypertrophie des CLMV.



### **3 LES MÉCANISMES DE SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'HYPERTENSION**

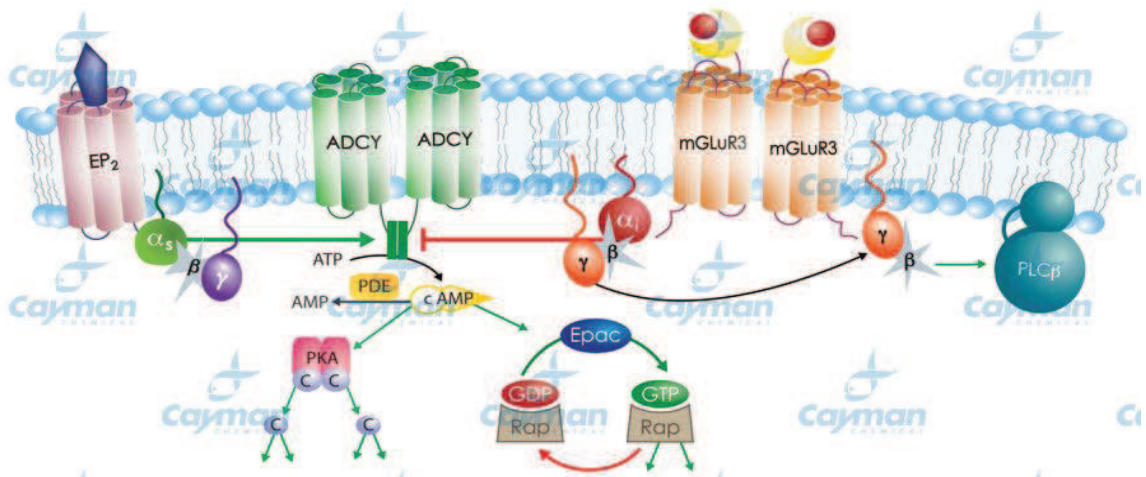
La prolifération cellulaire accrue est le résultat du déséquilibre de la balance entre les facteurs qui stimulent la prolifération et ceux qui l'inhibent. Dans des conditions pathologiques, diverses molécules favorisent l'hypertension en faisant pencher la balance du côté de la vasoconstriction, de l'hypertrophie et de la prolifération. Ces facteurs, nommés messagers premiers, vont mettre à contribution tout un réseau de communication intracellulaire qui va leur permettre ainsi d'activer ou d'inactiver les différentes fonctions de la cellule. Les messagers premiers sont généralement des hormones qui ne franchissent pas la membrane plasmique. Pour produire une réaction de l'autre côté de la membrane, les messagers premiers doivent lier des récepteurs transmembranaires. Le récepteur ancré dans la membrane plasmique pourra ensuite activer une seconde protéine, cette fois intracellulaire, qui à son tour activera une ou plusieurs voies signalétiques (Berne and Levy 2001; Voet and Voet 2011).

#### **3.1 Le système de l'adénylate cyclase/AMPC**

##### **3.1.1 Généralités**

Le système de l'adénylate cyclase/AMPC hormonosensible est composé de trois éléments associés à la membrane plasmique : les récepteurs pour une variété des hormones et des neurotransmetteurs, les protéines hétérotrimériques G et l'entité catalytique, l'adénylate cyclase (Schramm and Selinger 1984). La première composante du système de l'adénylate cyclase/AMPC interagit avec les ligands pour convertir les signaux extracellulaires en réactions intracellulaires. La nature du message extracellulaire peut inclure des molécules de signalisation extracellulaire, tels que les protéines messagers à bas poids moléculaire ou les signaux sensoriels (Krauss 2003). Le système de l'adénylate cyclase/AMPC dans les cellules des mammifères est activé par les prostaglandines et par

une variété d'hormones et de peptides (Rodbell, Lin et al. 1974). Il a été démontré que l'adrénocorticotrophine, le glucagon (Pohl, Krans et al. 1971) et l'épinéphrine (Schramm, Feinstein et al. 1972) se liaient de manière réversible sur des sites spécifiques dans la membrane plasmique des cellules cibles qui contiennent le système de l'adénylate cyclase/AMPc répondant à ces hormones (Schramm and Selinger 1984). Les cellules peuvent répondre à un message extracellulaire seulement si elles expriment des récepteurs qui reconnaissent et lient spécifiquement cette molécule messagère particulière. Une cellule donnée contient des récepteurs pour différents ligands de sorte que la réponse à un ligand particulier peut dépendre du niveau de l'affinité des autres ligands pour la machinerie cellulaire de transduction du signal (Voet, Voet et al. 2008).



**Figure 1.3.** La signalisation par un RCPG *G<sub>s</sub>*, le EP<sub>2</sub>, récepteur de la prostaglandine E<sub>2</sub>, et un RCPG *G<sub>i</sub>*, le mGluR3, récepteur du glutamate métabotrope 3, à l'adénylate cyclase

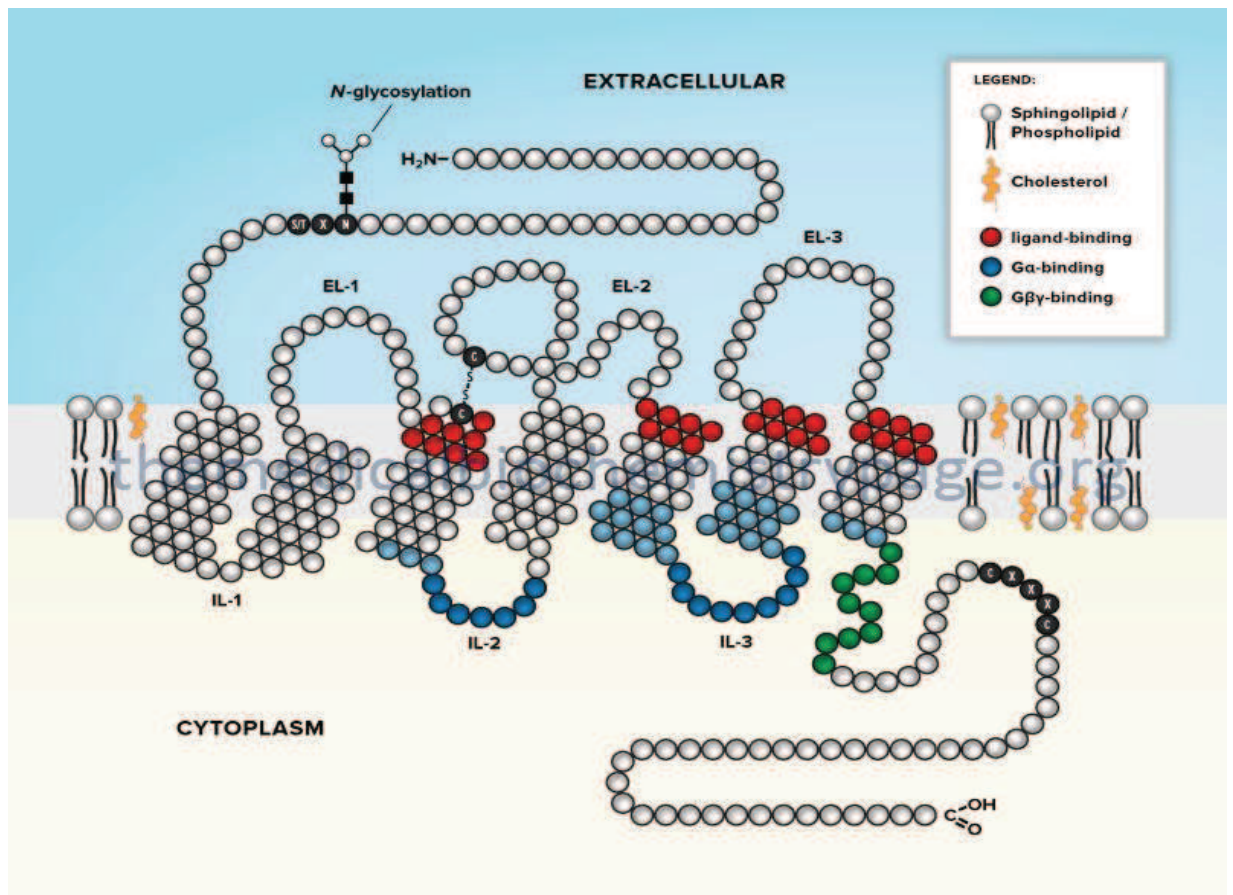
*Abréviations:* EP<sub>2</sub>, le récepteur de la prostaglandine E<sub>2</sub>, α<sub>s</sub>, la sous-unité α de la protéine G stimulatrice, ADCY, adénylate cyclase, α<sub>i</sub>, la sous-unité α de la protéine G inhibitrice, mGluR3, le récepteur métabotrope du glutamate 3, ATP, adénosine triphosphate, PDE, phosphodiésterase, cAMP, l'adénosine monophosphate cyclique, PKA, la protéine kinase A, Epac, exchange proteins activated directly by cyclic AMP.

**Référence:** Thomas G. Brock. G Proteins and Their Coupled Receptors  
www.caymanchem.com

### 3.1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs transmembranaires. La caractéristique structurale commune des tous les RCPG est la présence de sept hélices transmembranaires hydrophobes connectées entre elles par une alternance de boucles intracellulaires (i1, i2 et i3) et extracellulaires (e1, e2 et e3). Un réseau de ponts hydrogène entre les acides aminés polarisés permet l'attache du récepteur à la membrane plasmique. Ces sept domaines transmembranaires sont entourés de chaque côté par les domaines C-terminal orienté du côté intracellulaire et N-terminal orienté du côté extracellulaire (Krauss 2003).

Les domaines N-terminaux des divers RCPG se différencient par la présence de sites de glycosylation de type N et par des variations de leur structure primaire. Ces changements post-traductionnelles affectent l'activité et l'expression à la membrane des RCPG. Les boucles intracellulaires, ainsi que le segment intracellulaire, sont responsables de l'interaction du récepteur avec les protéines G. Ce segment contient des sites de palmitoylation, une modification post-traductionnelle servant à fixer le domaine C-terminal à la membrane ainsi que des sites de phosphorylation qui jouent un rôle important dans la régulation des RCPG (Krauss 2003). Les acides aminés, les glycoprotéines, la lumière, les peptides et les phospholipides sont parmi les signaux capables d'activer les RCPG. La liaison du ligand au domaine extracellulaire du RCPG est nécessaire pour l'activation du récepteur, créant un changement de conformation qui affecte principalement l'emplacement spatial des hélices transmembranaires (Krauss 2003). Ainsi, le changement de la conformation spatiale du RCPG se transmet jusqu'aux boucles intracellulaires et au domaine C-terminal, en particulier, à la troisième boucle intracellulaire (Gomperts, Tatham et al. 2002). Ce changement permet l'interaction du récepteur avec les molécules en aval de la voie de signalisation et se traduit par leur activation, comme dans le cas des protéines G (Krauss 2003).



**Figure 1.4. Structure des récepteurs couplée aux protéines G**

**Référence :** [www.themedicalbiochemistrypage.org/signal-transduction.php](http://www.themedicalbiochemistrypage.org/signal-transduction.php)

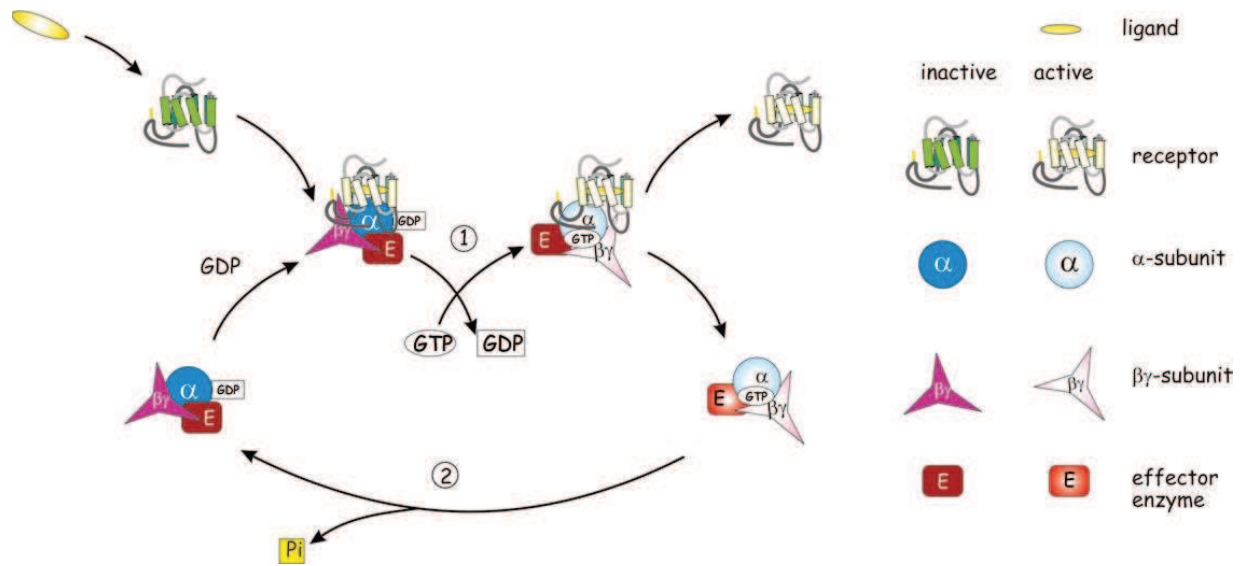
### 3.1.3 Les protéines G

Les protéines de liaison au GTP (protéines G) sont ancrées sur la surface cytoplasmique de la membrane plasmique où elles servent de molécules de relais entre les récepteurs et les protéines intracellulaires (Alberts 2002). Les protéines G sont composées de trois sous-unités protéiques :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Gilman 1987; Alberts 2002). La sous-unité  $\alpha$  possède une activité GTPase intrinsèque, c'est-à-dire qu'elle catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP. Les protéines G sont classifiées selon l'identité de leur sous-unité  $\alpha$  (Bridges and Lindsley 2008). Elles sont divisées en quatre familles majeures, Gs, Gi, Gq et G12. Le clonage moléculaire a révélé quatre formes différentes des protéines Gs, stimulatrices, résultant de

l'épissage différentiel d'un seul gène (Bray, Carter et al. 1986; Robishaw, Smigel et al. 1986). Ces isoformes, sensibles à la toxine de cholera (CT)(Offermanns 2003), stimulent l'activité de l'adénylate cyclase (AC) résultant en la formation d'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA). La famille Gi, dont les membres sont sensibles à la toxine pertussique (PT) (Offermanns 2003), est constituée de trois isoformes ubiquitaires : G $\alpha$ i-1, G $\alpha$ i-2 et G $\alpha$ i-3(Robishaw, Smigel et al. 1986; Itoh, Toyama et al. 1988). Le rôle de la famille Gi, inhibitrice est d'inhiber l'activité de l'AC et de diminuer le niveau d'AMPc. Les membres de la famille Gq stimulent la PLC $\beta$  amenant à la formation d'IP3 et du DAG suivi par une augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation des PKC (Hendriks-Balk, Peters et al. 2008). Bien qu'exprimée d'une manière ubiquitaire, la fonction biologique de la famille G12 est très peu connue (Strathmann and Simon 1991).

Quand le GDP est lié à la sous-unité  $\alpha$  de n'importe quelle famille des protéines G, cette dernière est associée avec le complexe  $\beta\gamma$ , formant un hétérotrimère inactif lié au récepteur (Neer 1995). Lorsqu'un ligand stimule un RCPG, ce dernier devient actif et subit un changement de conformation (Hollmann, Strumper et al. 2005). La sous-unité  $\alpha$  subit aussi un changement de conformation qui diminue son affinité pour le GDP, et le GDP se détache et libère le site actif.

Puisque la concentration intracellulaire de GTP est plus élevée que celle de GDP, le GTP prend la place du GDP. Une fois que le GTP est lié à la sous-unité  $\alpha$ , cette dernière se dissocie du récepteur et du complexe  $\beta\gamma$ . Ensuite ces composants peuvent agir avec différents effecteurs et moduler la production et l'activation des messagers seconds (Hepler and Gilman 1992). L'état actif de la sous-unité  $\alpha$  demeure jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP par l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$  (Neer 1995). Quand le GTP est clivé formant un GDP et un phosphate inorganique (Pi), la sous-unité  $\alpha$  se réassocie avec le dimère  $\beta\gamma$ , ceux-ci redeviennent inactifs et se réassocient au récepteur en attente d'une prochaine activation.



**Figure 1.5. Cycle d'activation et d'inactivation des protéines G**

*Abréviations:* GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate

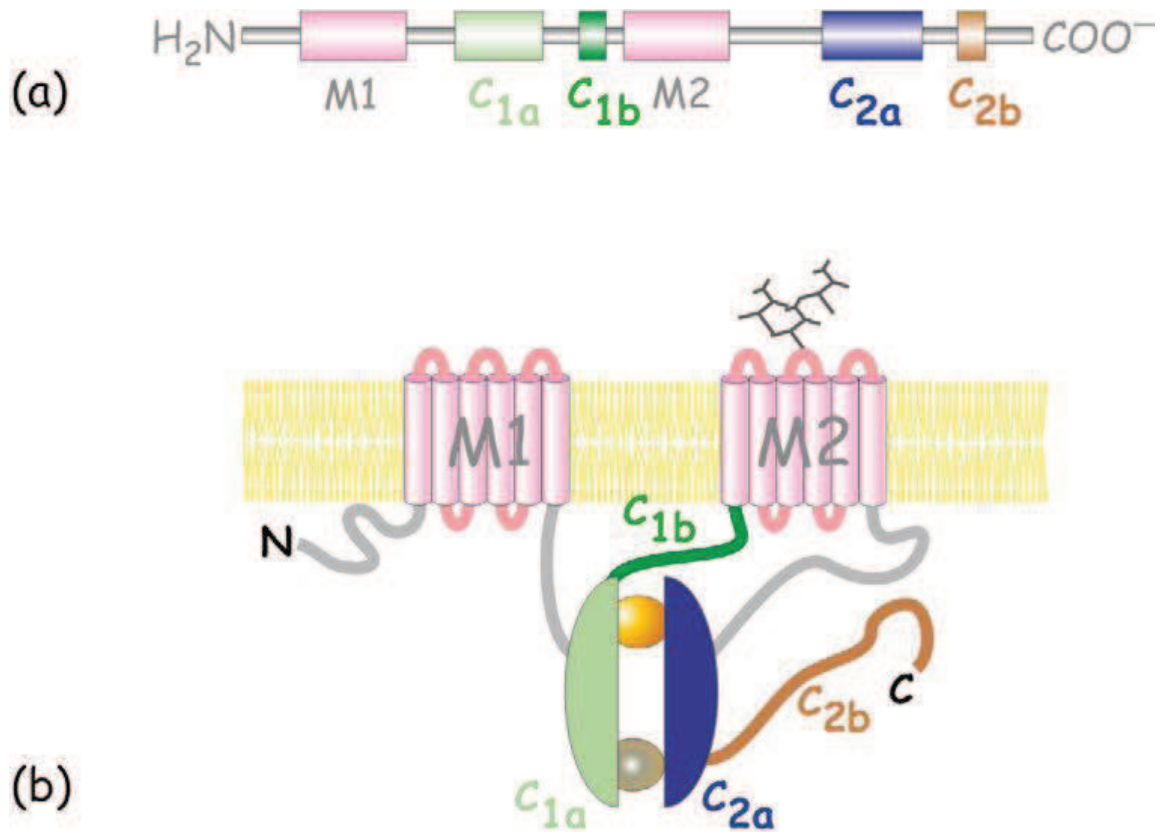
**Référence:** Gomperts B.D., Kramer IJ. M., Tatham P. E. Signal transduction (Second edition) p.85

### 3.1.4 L'adénylate cyclase (AC)

#### 3.1.4.1 Structure

Chez les mammifères, l'AC est exprimée dans tous les tissus, mais à de très bas niveaux, elle constitue environ 0.01-0.001% des toutes les protéines membranaires. L'AC est une large protéine transmembranaire qui est composée de deux domaines hydrophobes comprenant chacun six hélices transmembranaires (M1 et M2). Les deux domaines sont reliés entre eux par deux boucles hydrophiles situées du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire (C1 et C2). L'interaction entre les C1 et C2 est essentielle pour la catalyse. Les domaines C1a et C2a s'associent pour former le noyau catalytique, tandis que le domaine C1b ainsi que les C1a et C2a se lient aux molécules régulatrices (Voet, Voet et al. 2008). La sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gs et la ditérpène forskoline s'associent

principalement à la boucle C2 alors que la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_i$  s'attache à la boucle C1 (Sunahara and Taussig 2002).



**Figure 1.6. Structure d l'adénylate cyclase**

*a) L'architecture de domaine de l'adénylate cyclase; b) La topologie générale de l'enzyme*

**Abréviations:** *N*, extrémité N-terminale, *M1-M2*, les domaines transmembranaires, *C1<sub>a</sub>-C1<sub>b</sub>-C2<sub>a</sub>-C2<sub>b</sub>*, les fragments cytoplasmiques catalytiques, *C*, extrémité C-terminale.

**Référence:** Gomperts B.D., Kramer IJ. M., Tatham P. E. Signal transduction (Second edition) p.135

### ***3.1.4.2 Isoformes***

Neuf isoformes d'AC membranaires et une isoforme d'AC soluble ont été isolées et caractérisées. Le profil d'expression et de distribution de l'AC varie en fonction des isoformes. Les isoformes d'AC membranaires sont exprimées de façon ubiquitaire, néanmoins, certaines isoformes se localisent majoritairement dans certains tissus spécifiques; par exemple, l'AC des types 5 et 6 sont principalement exprimés dans le cœur. Par ailleurs, la forme soluble de l'AC est seulement exprimée dans les organes reproducteurs mâles, les testicules (Sunahara and Taussig 2002). Toutes les isoformes de l'AC sont activées par la sous-unité  $\alpha$  du Gs et la forskoline mais certaines isoformes (type 1,3) sont activées aussi par le  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline. Les types 1 et 2 de l'AC semblent également avoir des sites indépendants d'interaction avec les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G (Sunahara, Dessauer et al. 1996).

### ***3.1.4.3 Régulation de l'activité de l'AC***

L'identification de plusieurs isoformes d'AC ainsi que la découverte des schémas de régulation distincts, spécifiques au tissu, permet la classification des modèles de régulation.

#### ***3.1.4.3.1 Régulation par les protéines G***

L'activité de chaque isoforme de l'AC est régulée différemment par les protéines G. Toutes les isoformes d'AC membranaires sont activées par la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gs, alors que la sous-unité Gi inhibe seulement les isoformes de type 5 et 6. Autres que les sous-unités  $\alpha$ , les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G peuvent pareillement agir comme médiateurs intracellulaires en activant à leur tours les AC de type 2, 4 et 7 ou en inhibant les isoformes de type 1, 5, 6 et 8 (Sunahara and Taussig 2002). Au cours des différentes étapes de l'activation de ce système, il y a une amplification du signal autrement dit chaque complexe ligand/récepteur active des nombreuses protéines G et, pendant cette période,



chaque protéine G active plusieurs AC catalysant ainsi la synthèse d'un grand nombre de molécules d'AMPc

#### 3.1.4.3.2 Régulation par d'autres mécanismes

**Régulation par phosphorylation.** L'AC catalyse la synthèse de l'AMPc à partir de l'ATP. L'AMPc se lie à la sous-unité régulatrice de la kinase dépendante de l'AMPc (PKA) activant ainsi la kinase pour phosphoryler les résidus spécifiques Thr ou Ser des protéines cibles dans le cytosol et le noyau (Voet, Voet et al. 2008). La régulation potentielle de l'AC par la PKC a aussi été explorée. Des études ont montré que la phosphorylation de l'enzyme par la PKC augmente l'activité des types 2, 5 et 7 (le type 6 est inhibé) de l'AC. Il s'agit d'une conséquence de l'activation du RCPG suivie d'une activation de PLC $\beta$  à travers le Gq et la génération de diacyl glycerol (DAG) (Gomperts, Tatham et al. 2002)

**Régulation par le Calcium et la Forskoline.** Le Calcium est un régulateur important de l'AC. Les changements dans la concentration intracellulaire du Ca<sup>2+</sup> aussi influence la concentration intracellulaire de l'AMPc. En association avec la calmoduline, le Ca<sup>2+</sup> augmente l'activité de l'AC de type 1,3 et 7. La concentration intracellulaire d'AMPc augmente lorsque les cellules transfectées exprimant les isoformes de l'enzyme sont exposées à des agonistes qui élèvent Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Taussig and Gilman 1995). Un autre activateur de l'AC est la forskoline, une diterpène isolée des racines de *Coleus forskohlii*. La forskoline active directement l'AC en contournant toutes les influences en amont y compris les récepteurs et les protéines liant le GTP. La forskoline potentialise également l'activation de l'AC médiée par la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gs (Gomperts, Tatham et al. 2002)

#### 3.1.4.4 L'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPc)

L'AMPc est le premier second messenger découvert et identifié par Sutherland et Rall à la fin des années 50 (Sutherland and Rall 1958). Il est formé en réponse aux divers stimuli extracellulaires y compris les hormones ou les neurotransmetteurs. L'AMPc est généré à

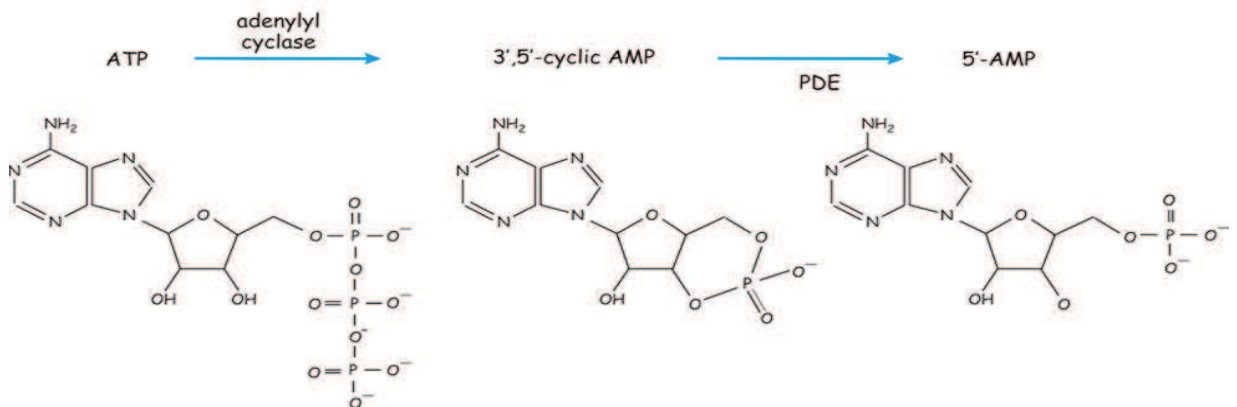
partir de l'ATP par l'adénylate cyclase et est dégradé par la phosphodiesterase (PDE) en adénosine-5'-monophosphate (Follin-Arbelet, Hofgaard et al. 2011). Les principales cibles de l'AMPc sont la protéine kinase A (PKA) (Tasken and Aandahl 2004), les canaux ioniques dépendants de l'AMPc (Kaupp and Seifert 2002) et l'échange de protéines activée par l'AMPc (Epac de l'anglais *exchange-proteins-directly-activated-by-cAMP*) (de Rooij, Zwartkruis et al. 1998). L'AMPc affecte de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation cellulaire, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose d'une manière PKA-dépendante et PKA-indépendante (Kobsar, Heeg et al. 2008). Ainsi, il peut influencer et régler des actions spécialisées uniques à des types cellulaires spécifiques. Dans le cas des myocytes cardiaques, l'AMPc influence les mécanismes inotropes et chronotropes (Tomita, Nazmy et al. 2003). En agissant par l'intermédiaire de la PKA, l'AMPc influence l'activité de plusieurs protéines cardiaques clés impliquées dans le couplage excitation-contraction tels que les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L, le phospholamban, le RyR, et la troponine I (Bers 2008). Ces effets produisent l'augmentation du courant  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) PKA-dépendant, la libération et l'assimilation du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique ainsi que la désensibilisation des myofilaments pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Le résultat net est l'effet inotrope positif caractéristique de l'activation des récepteurs bêta adrénergiques ( $\beta$ -AR) dans les myocytes cardiaques. En plus, la liaison de l'AMPc aux canaux dépendants des nucléotides cycliques activés par l'hyperpolarisation (HCN de l'anglais *hyperpolarization-activated-cyclic-nucleotide-gated-channels*) qui transportent le courant du pacemaker ( $I_f$ ), permet d'augmenter le rythme cardiaque en réponse à une stimulation sympathique, effet chronotrope positif. Dans les CMLV, la relaxation médiée par l'augmentation de l'AMPc intracellulaire est souvent associée à la diminution de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . Il est bien établi que l'AMPc diminue la sensibilité de la contraction au  $\text{Ca}^{2+}$  à la fois dans le muscle lisse intacte ainsi que perméabilisé (Kerrick and Hoar 1981; Van Riper, Weaver et al. 1995; Seguchi, Nishimura et al. 1996). In vitro, la PKA phosphoryle la MLCK sur deux sites, A et B, situés vers l'extrémité COOH-terminale par rapport au domaine de liaison de la calmoduline. La phosphorylation du site A et pas du site B a diminué l'affinité de la MLCK pour le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (Conti and Adelstein 1981), et on a pensé que ceci est responsable de la désensibilisation. Toutefois, les agents qui augmentent l'AMPc in vivo ont des effets négligeables sur la phosphorylation de site A et sur l'activation de la MLCK

par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Stull, Hsu et al. 1990). Ceci suggère que l'AMPC désensibilise le muscle lisse par un autre mécanisme qui n'est pas encore défini. Par contre, l'activité de la MLCP est augmentée par la PKA ce qui résulte en une diminution de la phosphorylation des rMLC sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  et en une réduction de la force de contraction.

Ceci soulève la question comment est-ce que l'AMPC peut exercer une telle multitude d'actions sophistiquées sur des types cellulaires particuliers? Chaque type cellulaire est une entité complexe dont les composantes sont inextricablement organisées dans l'espace 3D. Cela s'applique également aux mécanismes impliqués dans le contrôle des taux d'AMPC et de la génération des réponses spécifiques dans des locus d'action intracellulaire distincts (Baillie and Houslay 2005; Fischmeister 2006). L'AMPC est généré par différentes isoformes de l'adénylate cyclase dont la majorité sont incorporées dans la membrane plasmique de la surface cellulaire (Cooper 2003). Celles-ci sont activées par des récepteurs transmembranaires couplés à la protéine Gs, comme entre autres le récepteur  $\beta$ -adrénergique, ce qui stimule la production de l'AMPC à la surface cytosolique de la membrane plasmique qui ressemble à un nuage d'AMPC. Cependant, parce que les cellules sont polaires, différents récepteurs couplés aux Gs et isoenzymes de l'adénylate cyclase peuvent être limités aux sous-domaines membranaires distincts (Cooper 2003) de manière à fournir des «sources ponctuelles» de production de l'AMPC à la membrane plasmique. Ceci offre le potentiel pour la compartimentation de la signalisation de l'AMPC dans les cellules, une notion qui a été la première fois utilisée par Buxton et Brunton dans des études sur des myocytes cardiaques (Buxton and Brunton 1983). Cependant, parce que la diffusion libre de l'AMPC est rapide, ( $130$  à  $700 \mu\text{m sec}^{-1}$ ), sans aucun moyen de le dégrader après l'activation de l'adénylate cyclase, l'intérieur de la cellule sera rapidement saturé avec de l'AMPC. La capacité de générer et de moduler des gradients d'AMPC dans la cellule dépend de la dégradation de l'AMPC en 5'-AMP qui est réalisé par les PDEs de l'AMPC (Lugnier 2006). L'activité des PDEs dans le cytosol permet la formation de gradients d'AMPC qui dépendent de la source de production de l'AMPC par les adénylates cyclases situées dans les sous-domaines spécifiques de la membrane plasmique. Cette production dépendante de l'adénylate cyclase et de PDEs permet de moduler les gradients d'AMPC dans les cellules, canalisant ainsi la signalisation de l'AMPC le long des conduits spécifiques. Pour pouvoir restreindre les gradients d'AMPC à des sites intracellulaires spécifiques, les PDEs sont

positionnées à des sites intracellulaires spécifiques et ciblent des complexes de signalisation caractéristiques dans les cellules (Houslay and Adams 2003; Baillie and Houslay 2005; Fischmeister 2006)

Un tel système sophistiqué offre le moyen de générer une multitude de microenvironnements à l'intérieur de la cellule qui se trouvent sous le contrôle précis d'une sous-population spécifiques et attachée des PDEs. Chacune de ces sous-populations des PDEs peut être envisagée comme des régulateurs distincts des processus contrôlés par l'AMPc soit à travers la PKA et ses substrats associés ou à travers l'Epac et son effecteur, le Rap1/2.



**Figure 1.7. L'AMP cyclique est générée à partir de l'ATP**

*Abréviations : ATP, adenosine triphosphate; 3',5'-cyclic AMP, adenosine 3',5'-monophosphate cyclique; PDE, phosphodiesterase; 5'-AMP, adenosine 5'-monophosphate.*

**Référence:** Gomperts B.D., Kramer IJ. M., Tatham P. E. Signal transduction (Second edition) p.133

### 3.1.5 Altération de l'expression des protéines G dans l'hypertension

Il a été auparavant prouvé que les protéines hétérotrimériques G sont impliquées dans plusieurs pathologies, y compris l'hypertension, le diabète et l'insuffisance cardiaque. Le changement du niveau de protéines Gi et de l'activité de l'adénylate cyclase a été rapporté dans les tissus cardiovasculaires des rats spontanément hypertendus (SHR) et des différents modèles artificiels d'hypertension artérielle, y compris les rats hypertendus traités au sel et au déoxycorticostérone acétate (DOCA) (Marcil, de Champlain et al. 1998). Une augmentation de l'expression des protéines Gi $\alpha$ -1 et Gi $\alpha$ -2 et de l'ARNm a été démontrée dans les cœurs et aortes des SHR ainsi que dans les cœurs des DOCA rats avec l'hypertension établie (Marcil, de Champlain et al. 1998). Il a été démontré que l'expression accrue des protéines Gi $\alpha$  a lieu avant le début de l'hypertension chez les SHR et DOCA rats suggérant l'implication de la surexpression de la protéine Gi dans l'hypertension artérielle (Marcil, Thibault et al. 1997). Notre laboratoire a montré que la surexpression des protéines Gi $\alpha$ -2 et Gi $\alpha$ -3 précède le développement de l'hypertension et que l'inactivation des protéines Gi par la toxine pertussique atténue le développement de l'hypertension artérielle chez les rats SHR (Li and Anand-Srivastava 2002). Dans le but de déterminer si la baisse de pression artérielle observée chez les rats SHR était due à une diminution de la prolifération des CMLV, on a ainsi étudié l'effet de l'inhibition de la protéine Gi sur la prolifération. On a démontré que l'inhibition de la protéine Gi par la toxine pertussique inhibe la prolifération accrue des CMLV de SHR, mais n'a aucun effet sur celles de WKY. La conclusion est d'une forte importance clinique, car un niveau relativement élevé d'expression de Gi a été montré en association avec une pression artérielle élevée chez les humains (Baritono, Ceolotto et al. 2004). Une autre étude faite dans notre laboratoire a montré que dans les cœurs des modèles d'hypertrophie cardiaque par surcharge de volume des rats Sprague-Dawley existe une diminution de l'expression de la protéine G $\alpha$  et non de Gi $\alpha$  (Di Fusco, Hashim et al. 2000). Tsutsui et ses collègues ont rapporté des niveaux déficients des protéines Gi endothéliales dans l'athérosclérose des artères coronaires (Tsutsui, Shimokawa et al. 1994). Une fonction réduite de G $\alpha$  dans le système  $\beta$  adréno-récepteur-adénylate cyclase a été également signalée dans les artères fémorales isolées à partir des rats SHR (Asano, Masuzawa et al. 1988). Suite à ces recherches, il

semble pertinent d'approfondir le rôle de la protéine Gi et de déterminer les facteurs qui induisent une augmentation de son expression.

### 3.1.6 Altération de l'AMPc dans l'hypertension

La hausse de la pression artérielle dans l'hypertension essentielle est due à une augmentation de la résistance périphérique vasculaire. L'augmentation de la résistance périphérique est attribuée à des changements structurels dans les vaisseaux, aux anomalies dans le mouvement du  $\text{Ca}^{2+}$  et à l'aberration dans le métabolisme des nucléotides cycliques (Anand-Srivastava 1996). Le système adénylate cyclase/AMPc est engagé dans les deux, le contrôle de la contractilité cardiaque et du tonus vasculaire (Triner, Vulliemoz et al. 1972). La diminution du taux d'AMPc dans les tissus cardiovasculaires a été impliquée dans la pathogenèse de l'hypertension (Ramanathan and Shibata 1974). L'AMPc a été largement impliquée dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire (Barnes and Liu 1995) et rénale (Chatziantoniou, Ruan et al. 1993; Sandner, Kornfeld et al. 1999). La réduction de l'activité de l'adénylate cyclase en réponse à la stimulation des récepteurs  $\beta$  adrenergiques a été démontrée dans le système vasculaire mésentérique (Amer, Gomoll et al. 1974), l'aorte et le myocarde des SHR (Anand-Srivastava 1988). Les agents qui augmentent le taux d'AMPc provoquent une relaxation du muscle lisse artériel et antagonisent l'effet vasoconstricteur de l'Ang II (Randall, MacLennan et al. 1996). L'AMPc inhibe également la réponse chimiotactique des CML artérielles à l'Ag II in vitro (Dubey, Jackson et al. 1995). Shahid et collaborateurs ont récemment démontré que dans les souris IEX-1 (de l'anglais *immediate early responsive gene X-1*) knockout l'hypertension provient principalement à cause de la déficience de la production et de la signalisation par 3',5'-AMPc dans le muscle lisse vasculaire (Shahid, Shen et al. 2010) Bohm et ses collègues ont rapporté l'effet inotrope positif du pimobendane, un inhibiteur de la phosphodiesterase dans le myocarde des individus en insuffisance cardiaque et le rôle joué par d'autres facteurs tels que la sensibilité accrue des myofilaments au  $\text{Ca}^{2+}$  dans le renforcement de la force de contraction (Bohm, Morano et al. 1991). La surexpression de l'Epac1 (de l'anglais *exchange proteins directly activated by cAMP*), un des effecteurs de la signalisation de l'AMPc, inhibe la synthèse du collagen induite par le TGF $\beta$ 1 dans les fibroblastes cardiaques ce qui signifie

que la diminution du niveau de l'Epac est impliquée dans le développement de la fibrose cardiaque (Yokoyama, Patel et al. 2008).

## 3.2 Les récepteurs aux facteurs de croissance

### 3.2.1 Description générale

Les récepteurs à tyrosine kinase sont des protéines à un seul passage transmembranaire qui comprennent dans leur partie extracellulaire un domaine de liaison au ligand et dans leur partie intracellulaire, un domaine à tyrosine kinase (Alberts 2002). La liaison du ligand à son récepteur induit une homo- ou une hétérodimérisation de ce dernier, phénomène essentiel pour l'activité tyrosine kinase du récepteur (Alberts 2002). Une fois le récepteur activé et dimérisé, il recrute les protéines cibles pour initier la cascade de signalisation qui contrôle les facteurs de transcription. Divers facteurs de croissance relaient leurs effets à travers les récepteurs ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque, comme le facteur de croissance épidermique (EGF de l'anglais *epidermal growth factor*) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF de l'anglais *platelet-derived growth factor*) (Alberts 2002).

*Le récepteur au facteur de croissance épidermique* (EGF-R de l'anglais *epidermal growth factor receptor*) et son ligand, le EGF, ont été identifiés par Cohen en 1962 et en 1980 (Cohen 1962; Cohen, Carpenter et al. 1980). L'EGF fait partie de la famille EGF qui comprend pareillement le TGF- $\alpha$  et HB-EGF et c'est la forme soluble de son précurseur membranaire qui subit la protéolyse (Lee, Fenton et al. 1995). L'EGF est produit par divers types cellulaires parmi lesquels on retrouve les cellules endothéliales, les CMLV et les fibroblastes (Cohen 1960). Tous les membres de la famille EGF se lient aux récepteurs EGF-R, aussi appelés ErbB1 (Prigent and Lemoine 1992). La famille des récepteurs tyrosine kinase dont le récepteur EGF-R fait partie porte le nom d'ErbB et comprend également ErbB2, ErbB3 et ErbB4 (Roepstorff, Grovdal et al. 2008). La liaison d'EGF à son récepteur entraîne une homodimérisation du récepteur EGF-R ou une

hétérodimérisation du récepteur EGF-R avec les autres membres de la famille ErbB (Xian 2007).

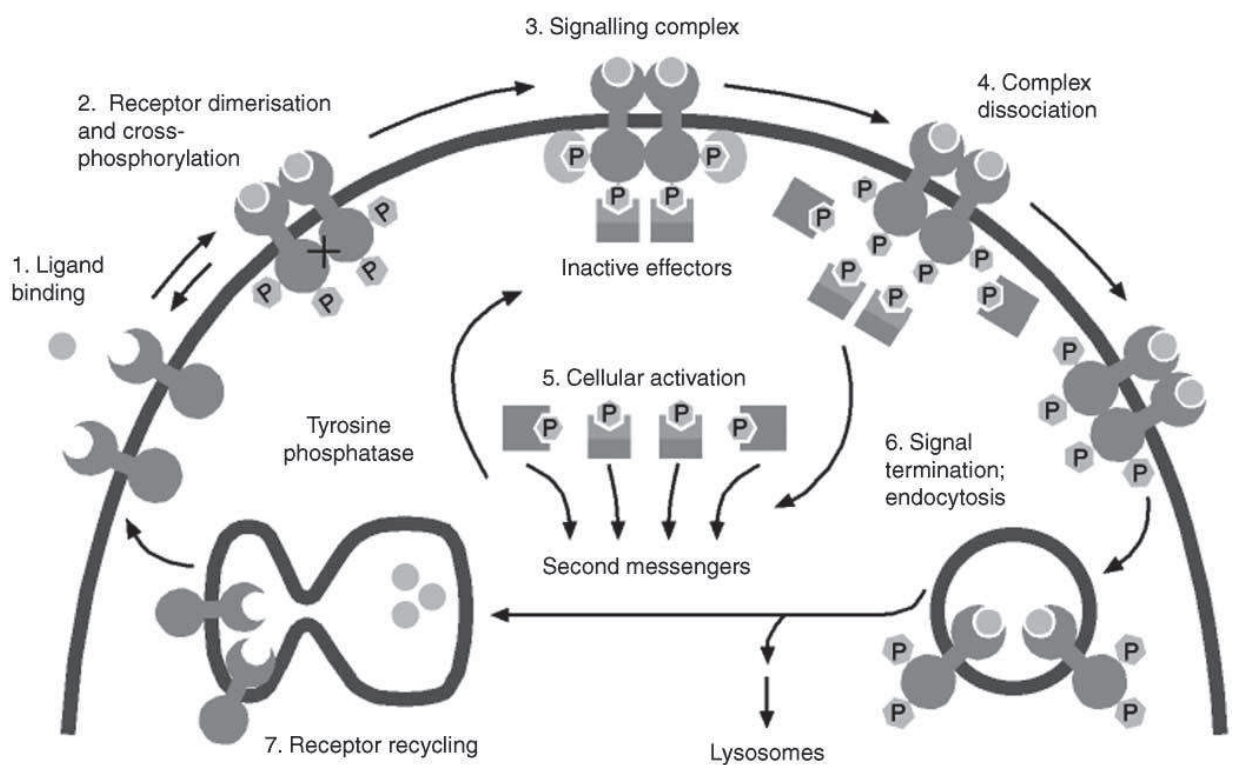
*Le récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes* (PDGF-R de l'anglais *platelet-derived growth factor receptor*). À sa découverte dans le sérum sanguin, le PDGF a été présenté comme un facteur de croissance pour les CMLV, les fibroblastes et les cellules gliales (Kohler and Lipton 1974; Westermark and Wasteson 1976). Chez l'humain, le PDGF est composé de quatre chaînes polypeptidiques, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D. Ces chaînes polypeptidiques se lient entre elles par des ponts disulfures afin de former différentes combinaisons des dimères, c'est-à-dire PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC et PDGF-DD (Bergsten, Uutela et al. 2001; Gilbertson, Duff et al. 2001; Heldin, Eriksson et al. 2002). Les PDGF se lient à deux types de récepteurs tyrosine kinase, le PDGF-R $\alpha$  et le PDGF-R $\beta$  (Andrae, Gallini et al. 2008). Les récepteurs au PDGF forment également des homo- ou hétérodimères tels que, PDGF-R $\alpha\alpha$ , PDGF-R $\beta\beta$  et PDGF-R $\alpha\beta$  (Heldin and Westermark 1999). Le récepteur PDGF-R $\alpha$  lie avec une grande affinité les chaînes PDGF-A et PDGF-B tandis que le récepteur PDGF-R $\beta$  ne lie que la chaîne PDGF-B (Hammacher, Mellstrom et al. 1989; Seifert, Hart et al. 1989; Kanakaraj, Raj et al. 1991).

### **3.2.2 Mécanismes de signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance (RFC)**

La liaison des facteurs de croissance tels que l'EGF et le PDGF avec leurs récepteurs induit la dimérisation et l'autophosphorylation de ces derniers sur leur résidu tyrosine intracellulaire (Kelly, Haldeman et al. 1991; Ferguson, Berger et al. 2003). Cette autophosphorylation active le récepteur kinase et fournit des sites d'arrimage pour la fixation des protéines de signalisation (Kazlauskas and Cooper 1989; Roepstorff, Grovdal et al. 2008). La liaison entre le récepteur et les protéines de signalisation engage des interactions protéine-protéine au niveau des domaines spécifiques. Par exemple, la région liant les tyrosines phosphorylées (PTB de l'anglais *phosphotyrosine-binding*) et les régions d'homologie avec Src (SH2 de l'anglais *Src homology regions 2*) sont des domaines qui reconnaissent les tyrosines phosphorylées. Les domaines SH3 reconnaissent les régions



riches en proline. La région d'homologie avec pleckstrin (PH de l'anglais *pleckstrin homology*) est un domaine qui reconnaît les membranes de phospholipide alors que le domaine PDZ reconnaît les séquences spécifiques pour le C-terminale (Heldin, Ostman et al. 1998). Les cascades de signalisation relayées par EGF-R et par PDGF-R sont la voie ras-MAPK, la voie PI3K-AKT et la voie PLC $\gamma$ -PKC (Scaltriti and Baselga 2006; Andrae, Gallini et al. 2008; Roepstorff, Grovdal et al. 2008).



**Figure 1.8. Le modèle de la transduction du signal du récepteur au facteur de croissance épidermique**

**Référence:** Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*. 2001; **37**(4), p.3

### ***3.2.2.1 La voie de ras-MAPK***

Les MAP kinases forment une famille des protéines serine/thréonine spécifiques qui sont activées par les facteurs mitogéniques. Cette famille est composée de trois voies : la voie d'ERK, la voie de p38 et la voie de JUNK. Ces voies jouent un rôle important dans la croissance et l'apoptose (Mii, Khalil et al. 1996; Force and Bonventre 1998). La voie d'ERK1/2 est notamment connue pour son implication dans la prolifération des cellules, incluant la prolifération des CMLV. Il a été démontré que l'activation de ERK1/2 joue un rôle important dans l'augmentation du taux de prolifération des CMLV en condition d'hypertension (Force and Bonventre 1998). La voie de ERK1/2 consiste en une cascade de phosphorylation qui s'amorce lorsqu'un agoniste se lie à son récepteur. L'activation du récepteur permet de stimuler la première MAP kinase Ras qui à son tour phosphoryle Raf qui ensuite active MEK. La cascade finit lorsqu'ERK1/2 est activé par MEK. ERK1/2 agit sur plusieurs substrats dont la majorité sont les facteurs de transcription. ERK1/2 peut également activer des protéines kinases et des phospholipases (Widmann, Gibson et al. 1999). Plusieurs stimuli peuvent activer ces cascades comme par exemple les facteurs de croissance, les peptides vasoactifs tels que l'Ang II et les cytokines. L'augmentation de ces facteurs peut contribuer à l'activation d'ERK1/2 dans des conditions pathologiques. De plus, Hashim et ses collègues ont prouvé que l'augmentation de la prolifération induite par l'Ang II est inhibée par le traitement avec l'inhibiteur de MEK1, le PD98059, dans des cellules de type A10 (Hashim, Li et al. 2006). Dans le cas des CMLV de rats SHR qui ont un niveau plus élevé d'Ang II endogène en comparaison avec les CMLV des WKY, le taux de phosphorylation d'ERK1/2 est également plus haut en comparaison avec les CMLV des WKY (Lappas, Daou et al. 2005). Ces résultats soulignent l'importance de la voie d'ERK1/2 dans la transduction des signaux moléculaires de l'Ang II.

### ***3.2.2.2 La voie de PI3K-AKT***

Les phosphoinositide 3-kinase (PI3K) constituent une famille de lipides kinases importante dans la transduction des signaux cellulaires. Elles sont impliquées dans la croissance, la mobilité, la prolifération et la différenciation des cellules. Les PI3K sont

divisées en 3 classes: I, II et III. Cette classification est basée sur leur régulation, leur structure primaire et leur substrat *in vitro*. La classe I est prédominante dans le système vasculaire et les PI3K de cette classe sont composées d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85 ou p101) (Leevers, Vanhaesebroeck et al. 1999). La classe I est activée par les récepteurs tyrosine kinase et par les RCPG. Les PI3Ks catalysent la formation de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI (3,4,5) P3), ce qui conduit à l'activation de plusieurs protéines kinases dont l'AKT (Oudit, Sun et al. 2004). En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K, Seki et ses collègues ont démontré que l'augmentation de calcium intracellulaire par l'Ang II à travers l'activation des canaux calciques I<sub>Ba</sub> requiert l'activation de la PI3K dans les CMLV (Seki, Yokoshiki et al. 1999). De plus, Vecchione et ses collègues ont montré que la délétion de la sous-unité p110 $\gamma$  dans des modèles des souris transgéniques avait un effet protecteur contre l'hypertension induite par l'administration de l'Ang II *in vivo* (Vecchione, Patrucco et al. 2005). Ces études soulignent l'importance de la PI3K dans la transduction des signaux moléculaires de l'Ang II *in vitro* et *in vivo*. Dans les CMLV, une des importantes molécules de la signalisation de l'Ang II activée par la PI3K est l'AKT, connue également sur le nom de protéine kinase B (Takahashi, Taniguchi et al. 1999). Il a été prouvé que l'AKT est responsable de l'activation des canaux calciques I<sub>Ba</sub> impliqués dans la relâche du calcium intracellulaire induite par l'Ang II. De plus, une autre étude montre que l'AKT régule la synthèse protéique en activant la p70 S6-kinase (p70S6K) (Eguchi, Iwasaki et al. 1999). AKT inhibe l'apoptose et stimule la survie des CMLV en contrôlant également l'expression de Bcl-2 et de c-Myc et en inhibant les caspases (Coffer, Jin et al. 1998). Même si le rôle de l'AKT dans la signalisation de l'Ang II n'est pas totalement élucidé, ces études laissent croire qu'un dérèglement de la balance entre l'effet mitogénique et l'effet apoptotique de l'AKT est un processus impliqué dans le développement de l'hypertension.

### **3.2.2.3 La voie de c-Src**

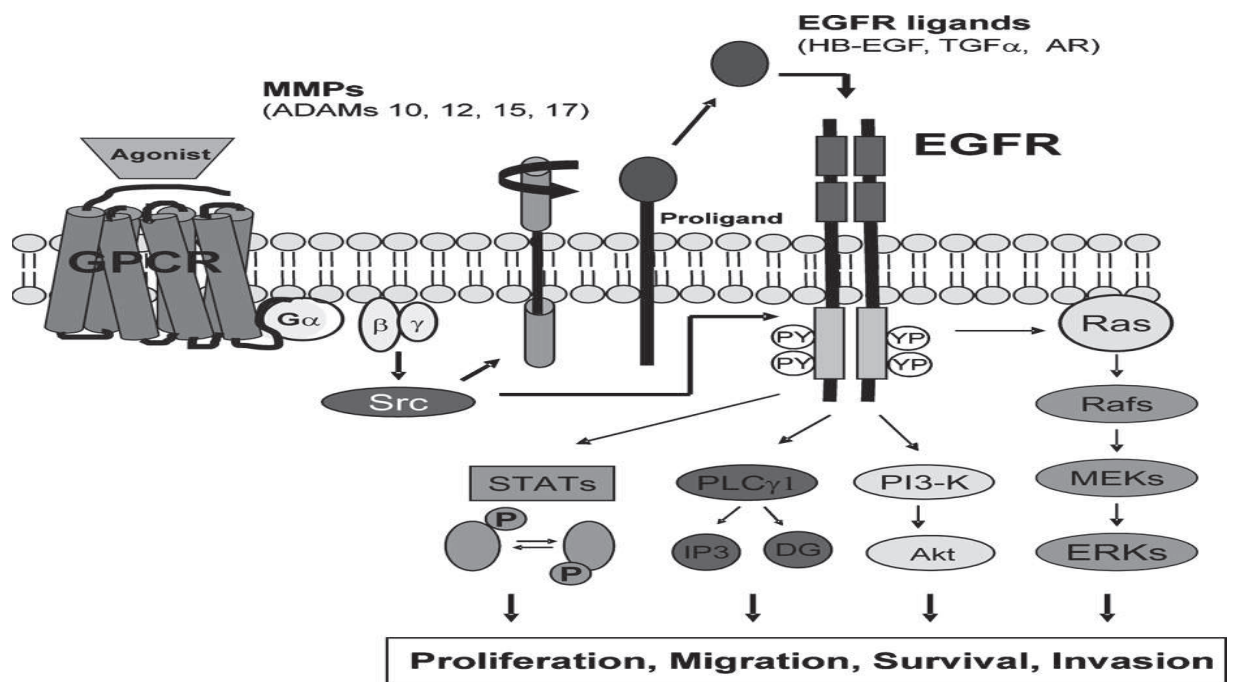
Les récepteurs aux facteurs de croissance peuvent aussi interagir avec d'autres molécules de signalisations notamment le c-Src (Scaltriti and Baselga 2006). c-Src est le membre le mieux caractérisé d'une famille de neuf protéines kinases cytoplasmiques qui

participent à la transduction du signal des facteurs de croissance (Bolen, Rowley et al. 1992). c-Src est composé de deux domaines de liaisons, le SH2 et le SH3, un domaine kinase, un domaine non catalytique dans le C-terminale et une séquence de myristoylation dans le N-terminale (Bolen, Rowley et al. 1992). Le résidu Tyr<sup>530</sup> paraît jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de c-Src. La phosphorylation du Tyr<sup>530</sup> par la kinase Src C-terminal (Csk de l'anglais *C-terminal Src kinase*) inhibe l'activité de c-Src, alors que la déphosphorylation de ce résidu semble être un mécanisme d'activation de c-Src (Klages, Adam et al. 1994). L'activité de c-Src peut être également inhibée par les interactions intramoléculaires entre le domaine catalytique C-terminale et les domaines SH2 et SH3 (Cooper and Howell 1993). c-Src qui est localisé dans le cytosol active plusieurs substrats incluant la protéine kinase d'adhésion focale, le PI3K et les protéines transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT de l'anglais *signal transducers and activators of transcription*) (Yeatman 2004; Summy and Gallick 2006). Même si c-Src fonctionne d'une manière indépendante, il peut aussi agir comme un transducteur de signal pour EGF-R, PDGF-R et également activer ces récepteurs (Leu and Maa 2003). Il joue également le rôle de médiateur dans la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance par les RCPG (Prenzel, Zwick et al. 2000). c-Src joue un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, la migration et la survie (Prenzel, Zwick et al. 2000).

### 3.2.3 Transactivation des RFC

La transactivation de RTK est un processus global dans la signalisation des RCPG. En fonction du récepteur et du type cellulaire, les RCPG utilisent plusieurs stratégies pour activer les voies signalétiques en aval, y compris la PI3K et les MAPK. La plupart d'entre eux impliquent l'interférence entre les RCPG et les RTK. Dans certains cas, les RCPG eux-même font partie du complexe signalétique, notamment la formation des complexes entre le récepteur AT1 et le Jak2, ainsi que entre les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques, la  $\beta$ -arrestine et le c-Src (Luttrell, Daaka et al. 1999). Des études ont démontré que la transactivation de l'EGF-R stimulée par l'Ang II nécessite c-Src dans les CMLV (Ushio-Fukai, Griendling et al. 2001). Linseman et ses collègues ont rapporté que la transactivation du PDGF-R- $\beta$

induite par l'Ang II implique la formation des complexes avec Shc, Grb2, ainsi que c-Src dans les cultures des CMLV (Linseman, Benjamin et al. 1995). En effet, des ouvrages récents avec différents RCPG dont l'AT1 suggèrent que l'activation des MAPK induite par les RCPG exige la formation du complexe Shc-Grb2-Sos (de l'anglais *Shc protein-growth factor receptor binding protein 2-nucleotide exchange factor SOS*) et l'activation subséquente des tyrosines kinases tels que l'EGF-R (Daub, Weiss et al. 1996), le PDGF-R- $\beta$  (Linseman, Benjamin et al. 1995) et le c-Src (Wan, Kurosaki et al. 1996).



**Figure 1.9. Le mécanisme ligand-dépendant de transactivation de l'EGF-R par les récepteurs couplés aux protéines G.**

**Abréviations :** GPCR, récepteurs couplés aux protéines G; Src, tyrosine kinase Src; EGFR, récepteur au facteur de croissance épidermique; PLC $\gamma$ 1, phospholipase  $\gamma$ 1; IP3, inositol-1,4,5-triphosphate; DAG, diacylglycerol; Raf, serine/thréonine protéine kinase Raf; MEK, thréonine/tyrosine protéine kinase MEK; MMPs, métalloprotéinases matricielles; ADAM, a desintegrin and metalloprotease family; PI3-K, phosphatidylinositol-3 kinase; Akt, protéine kinase Akt; Ras, protéine G monomère Ras; ERK, extracellular signal-regulated kinase; STAT, signal transducers and activators of transcription.

**Référence:** Liebmann C. EGF receptor activation by GPCRs: A universal pathway reveals different versions *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011;331, p. 222-231.

### 3.2.4 Les MAPK dans la pathologie cardiovasculaire

La balance entre l'activation et l'inactivation des MAPK est très importante pour la production des réponses cellulaires spécifiques. Cependant, toute activation excessive ou inappropriée de la cascade de signalisation des MAPK est impliquée dans le développement ou la progression de plusieurs pathologies comme l'hypertension, le diabète et l'athérosclérose. Des peptides vasoactifs tels que l'Ang II et l'ET-1, peuvent réguler la voie des MAPK. Pour ce faire, il a été démontré que l'Ang II, un puissant vasoconstricteur, stimule l'activation des MAPK en entraînant l'hyperplasie et l'hypertrophie des CMLV provenant des artères humaines (Touyz, Deng et al. 1999; Touyz 2004). De plus, l'activation de la voie des MAPK par l'Ang II et l'ET-1 est impliquée dans la progression des complications vasculaires provoquées par l'hypertension artérielle (Xu, Liu et al. 1996). L'inhibition de la cascade MAPK/ERK par la PKA, l'effecteur primaire de la signalisation de l'AMPc, a été mentionné dans plusieurs types cellulaires (Cook and McCormick 1993; Severson, Kong et al. 1993), y compris les CML provenant des artères humaines (Graves, Bornfeldt et al. 1993)

## 3.3 Le stress oxydatif

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des dérivés de l'oxygène produites à la suite du métabolisme aérobie cellulaire et qui possèdent des propriétés oxydantes (Lyle and Griendling 2006). Par l'oxydation d'une molécule, on comprend la perte des électrons par cette molécule, ce qui la rend instable et réactive (Alberts 2002). Au contraire, la réduction se définit comme étant le gain des électrons par une molécule (Alberts 2002). Au cours de l'évolution, les espèces vivantes (animaux, plantes et bactéries) se sont adaptées à la présence de l'oxygène dans leur environnement et ont développé des enzymes permettant sa consommation, ainsi que l'élimination de ses métabolites réduits. Une surproduction des ERO ou une déficience dans les mécanismes de leur élimination peuvent favoriser le développement des complications vasculaires et autres (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989; Bonnefont-Rousselot 2002; Migliore and Coppede 2002; Lassegue and Griendling

2004). De ce fait, le stress oxydatif se produit lorsqu'il y a une surproduction des ERO par rapport à leur élimination (Lyle and Griendling 2006).

### 3.3.1 Les sources des espèces réactives oxygénées (ERO)

Les ERO comprennent à la fois les radicaux libres, qui ont des électrons non-appariés à une base d'azote ou à l'oxygène, et autres espèces telles que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) qui agissent comme des oxydants. Une forme essentielle des ERO est l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), mais les systèmes biologiques produisent d'autres espèces, y compris l'anion hydroxyle ( $\text{HO}^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Dans les vaisseaux, l'anion  $\text{O}_2^-$  est produit par la réduction d'un électron de l'oxygène en utilisant le Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAD(P)H) en tant que donneur d'électrons (Taniyama and Griendling 2003). Le superoxyde a un électron non apparié, qui lui confère une grande réactivité et qui rend la molécule instable. Le peroxyde d'hydrogène est principalement éliminé par la conversion en  $\text{H}_2\text{O}$ . Cette réaction peut être spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) dont il existe trois isoformes, CuZnSOD, MnSOD et la SOD-extracellulaire (EC-SOD) (Fridovich 1997). La dismutation SOD-catalysée est favorisée lorsque la concentration de  $\text{O}_2^-$  est faible et la concentration de la SOD élevée. Contrairement à l' $\text{O}_2^-$ , l' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est pas un radical libre et est une molécule beaucoup plus stable. Il est soluble dans les lipides, traverse la membrane cellulaire et a une plus longue demi-vie que l' $\text{O}_2^-$  (Han, Antunes et al. 2003). Dans le système biologique, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est balayé par la catalase et la glutathion peroxydase pour produire les molécules d' $\text{H}_2\text{O}$  (Schafer and Buettner 2001). Le peroxyde d'hydrogène peut également générer le radical hydroxyle hautement réactif  $\text{HO}^-$ , en présence des molécules contenant des métaux telles que le  $\text{Fe}^{2+}$  (Fridovich 1997). Lorsque l' $\text{O}_2^-$  est produit en excès, une quantité importante d' $\text{O}_2^-$  réagit avec le monoxyde d'azote (NO) pour produire l' $\text{ONOO}^-$ . Dans le système vasculaire, l' $\text{O}_2^-$ , l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , l' $\text{ONOO}^-$ , le NO et l' $\text{HO}^-$  sont produites à des degrés divers. Leur production est contrôlée par des enzymes anti-oxydantes comme la catalase, la SOD, la thiorédoxine, le glutathion (Thannickal and Fanburg 2000). Dans le système biologique, les ERO ont des multiples sources enzymatiques et non enzymatiques (Touyz and Schiffrin 2004).

### 3.3.1.1 Les sources enzymatiques des ERO

Toutes les protéines ou systèmes enzymatiques qui en exerçant leurs fonctions font des transferts d'électrons peuvent entraîner la formation des ERO comme sous-produits de ces réactions. La génération des ERO dans les mitochondries représente 1-2% de la production totale d' $O_2^-$  dans des conditions oxydoréductions (Thannickal and Fanburg 2000). Dans le système vasculaire, plusieurs systèmes enzymatiques contribuent à la formation des ERO, y compris la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase, les NO-synthases endothéliales, les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, les lipoxygénases, les monooxygénases cytochrome P450, et les cyclooxygénases (Clempus and Griendling 2006). Les mitochondries génèrent les ERO comme sous-produits au cours de la production d'ATP par transfert d'électrons à travers la cytochrome oxydase C. La NAD(P)H oxydase est l'une des sources majeures des ERO dans les vaisseaux sanguins. La xanthine oxidoréductase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine dans le processus de métabolisme de la purine. La xanthine oxydoréductase existe sous deux formes interconvertibles, soit la xanthine déshydrogénase ou la xanthine oxydase. La première réduit le NAD<sup>+</sup>, tandis que la seconde réduit l'oxygène moléculaire conduisant à la production d' $O_2^-$  et d' $H_2O_2$  (Touyz 2004). Les synthases d'oxyde nitrique (NOS de l'anglais *nitric oxide synthase*) génère l' $O_2^-$  en plus du NO. Les membres de NOS sont codés par des gènes différents. Il existe trois isoformes, y compris la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3), la NOS neuronale (nNOS ou NOS1) et la NOS inductible (iNOS ou NOS2) (Gilkeson, Mudgett et al. 1997). Les NOS utilisent la L-arginine en tant que substrat pour synthétiser le NO d'une manière dépendante de tétrahydrobioptérine (H4B). Si la concentration de la L-arginine ou de la H4B est faible, ou si la H4B est oxydée, la eNOS devient découplée et génère d'importantes quantités d' $O_2^-$  (Stuehr, Pou et al. 2001). Le découplage de l'eNOS a été démontré dans l'athérosclérose, le diabète et l'hypertension qui sont tous associés à l'activation du système rénine-angiotensine et à la production d' $O_2^-$  par l'eNOS (Taniyama and Griendling 2003).



### 3.3.1.1.1 La NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase est une enzyme constituée de plusieurs sous-unités qui catalyse la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> à partir du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAD(P)H) en utilisant la NAD(P)H comme donneur d'électron (Azumi, Inoue et al. 1999; Griendling, Sorescu et al. 2000)

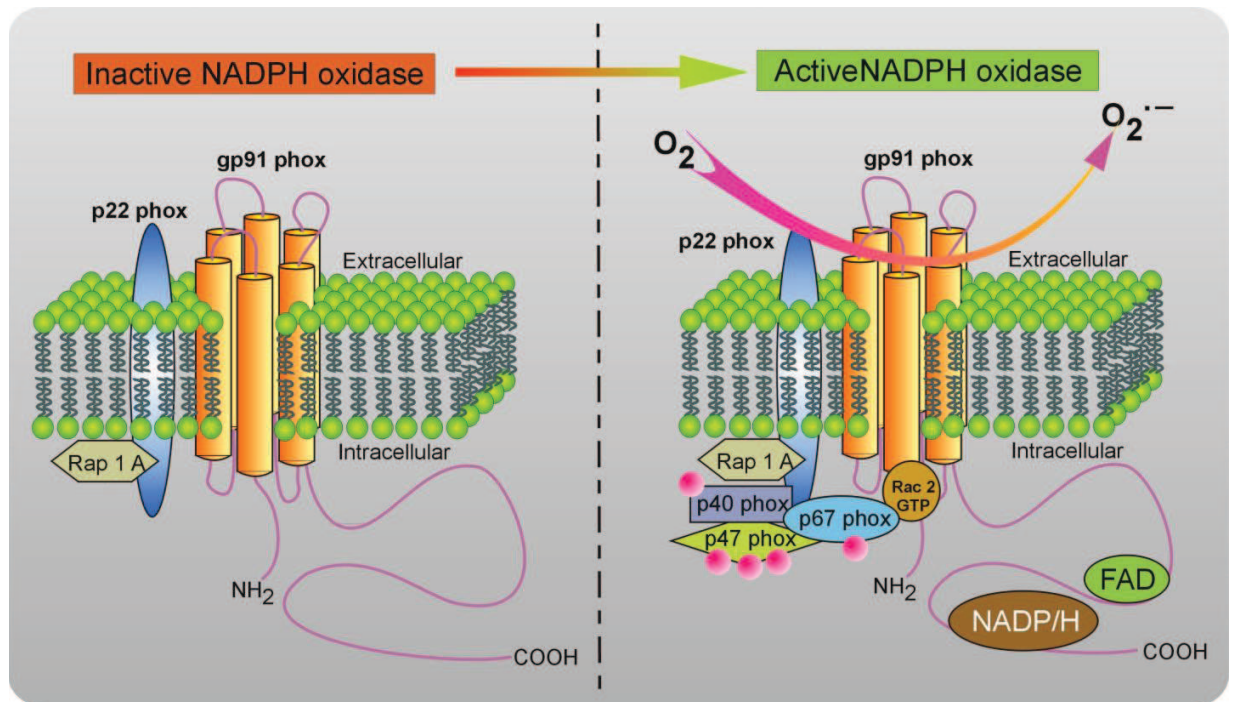


La NAD(P)H oxydase a été premièrement décrite dans les phagocytes (les neutrophiles, les granulocytes, les monocytes et les macrophages) et les tissus vasculaires (Fridovich 1974; Babior, Lambeth et al. 2002).

### 3.3.1.1.2 Structure de la NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase est composée des deux sous-unités membranaires, p22<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup> (phox de l'anglais *Phagocyte oxydase*) qui est aussi appelée NOX2 et des sous-unités cytoplasmiques, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> (Babior, Lambeth et al. 2002; Vignais 2002). Une petite protéine G Rac participe à l'assemblage des unités cytoplasmiques et à l'activation de l'enzyme (Griendling, Sorescu et al. 2000). Le p22<sup>phox</sup> et le gp91<sup>phox</sup>, localisés à la membrane, forment un hétérodimère appelé le cytochrome b558 (Touyz and Schiffrin 2004). Le gp91<sup>phox</sup> a six domaines transmembranaires contient une paire des molécules hème et le site de liaison pour la NAD(P)H (Brandes and Kreuzer 2005). Le cytochrome b558, aussi appelé flavocytochrome b558 à cause de l'association avec la flavine adénine dinucléotide (FAD), contient l'appareil de transport des électrons donc, il est le conduit physique pour le transfert des électrons à travers la membrane (Cross and Segal 2004). p47<sup>phox</sup> est la protéine qui transporte les sous-unités cytoplasmiques aux sous-unités membranaires pour assembler la oxydase active. p67<sup>phox</sup> contient deux domaines SH3 homologues à Src, l'un au milieu de la protéine, et l'autre près de l'extrémité carboxyle. Les domaines SH3 interagissent avec p22<sup>phox</sup> pour activer l'enzyme. p22<sup>phox</sup> est situé dans la membrane avec gp91<sup>phox</sup> et a une queue dans le cytosol. Quand la p22<sup>phox</sup> est phosphorylée,

elle se lie à la p47<sup>phox</sup> : une interaction essentielle dans l'activation de l'enzyme (Brandes and Kreuzer 2005).



**Figure 1.10. Activation de la NAD(P)H oxydase**

Figure inspirée de : [www.genkyotex.com/index.php?rubID=5](http://www.genkyotex.com/index.php?rubID=5)

### 3.3.1.1.3 La NAD(P)H oxydase au niveau vasculaire

Au niveau cardiovasculaire la NAD(P)H oxydase est l'enzyme la mieux étudiée parmi celles impliquées dans la production des ERO (Lassegue and Clempus 2003). Elle est la source principale de production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Berry, Hamilton et al. 2000; Channon and Guzik 2002). Plusieurs caractéristiques distinguent la NAD(P)H oxydase vasculaire de celle identifiée dans les phagocytes. L'activité de cette dernière est inductible, alors que l'activité de la NAD(P)H oxydase vasculaire est principalement constitutive et peut augmenter à la suite d'une stimulation par un agoniste tel que l'Ang II, le PDGF et la thrombine (Zalba, San Jose et al. 2001; Rueckschloss, Quinn et al. 2002). Le rôle physiologique de la production d'anion superoxyde par les cellules des vaisseaux sanguins se distingue

également de celui des phagocytes: l' $O_2^-$  produit par la NAD(P)H oxydase vasculaire participe à la signalisation cellulaire, ce qui est compatible avec leur faible quantité retrouvée dans les tissus tandis que dans les phagocytes la production d'anions superoxydes cytotoxiques joue plutôt le rôle de mécanisme de défense contre les agents pathogènes (Szasz, Thakali et al. 2007). De plus, la production basale d' $O_2^-$  par la NAD(P)H oxydase vasculaire est significativement plus faible comparativement à celle produite par l'enzyme des phagocytes (Hohler, Holzapfel et al. 2000). Enfin, le site de production cellulaire de l'anion superoxyde par la NAD(P)H vasculaire est pareillement différent. La NAD(P)H oxydase vasculaire produit l' $O_2^-$  dans le milieu intracellulaire, alors que celle provenant des phagocytes produit l' $O_2^-$  dans le milieu extracellulaire (Li and Shah 2002; Lassegue and Clempus 2003). La NAD(P)H oxydase est présente au niveau de toutes les couches vasculaires : au niveau de intima (Muzaffar, Jeremy et al. 2003), media (Touyz, Chen et al. 2002) et de l'adventicia (Rey and Pagano 2002). Elle est présente également au niveau des cellules en culture telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les CMLV (Griendling, Minieri et al. 1994; Touyz, Chen et al. 2002). Dans les cellules endothéliales et dans les cellules de l'adventice, on reconnaît les sous-unités  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p22^{phox}$  et  $gp91^{phox}$  (Rey and Pagano 2002; Lassegue and Clempus 2003). Au niveau des CMLV, la situation est plus complexe puisque les sous-unités majeures ne sont pas constamment détectées. Seulement  $p47^{phox}$  et  $p22^{phox}$  semblent être exprimées d'une manière invariable (Lassegue and Clempus 2003). Dans les CMLV des artères de résistance de rat, toutes les sous-unités majeures sont exprimées, incluant le  $gp91^{phox}$  (Azumi, Inoue et al. 1999; Touyz, Chen et al. 2002) par contre le  $gp91^{phox}$  est absent dans les CMLV de l'aorte. Des études récentes ont montré la présence de nouveaux homologues du  $gp91^{phox}$  qui forment une famille appelée Nox, pour NAD(P)H oxydase (Suh, Arnold et al. 1999; Cheng, Cao et al. 2001; Ago, Kitazono et al. 2004). Cette famille comprend sept membres : Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 et Duox2 (Griendling 2006). On retrouve Nox1 et Nox4 dans les CMLV de l'aorte des rongeurs ainsi que Nox5 dans celles des humains (Cheng, Cao et al. 2001). Par contre, les CMLV des vaisseaux de résistance humains contiennent le Nox2 et le Nox4 et pas le Nox1 (Clempus and Griendling 2006). Nox1 est aussi exprimé en faible quantité dans les cellules endothéliales et les fibroblastes (Griendling 2004). Nox4 est

hautement exprimé dans toutes les cellules de la paroi vasculaire, spécialement dans les vaisseaux cérébraux (Miller, Drummond et al. 2005).

### ***3.3.1.2 Les sources nonenzymatiques***

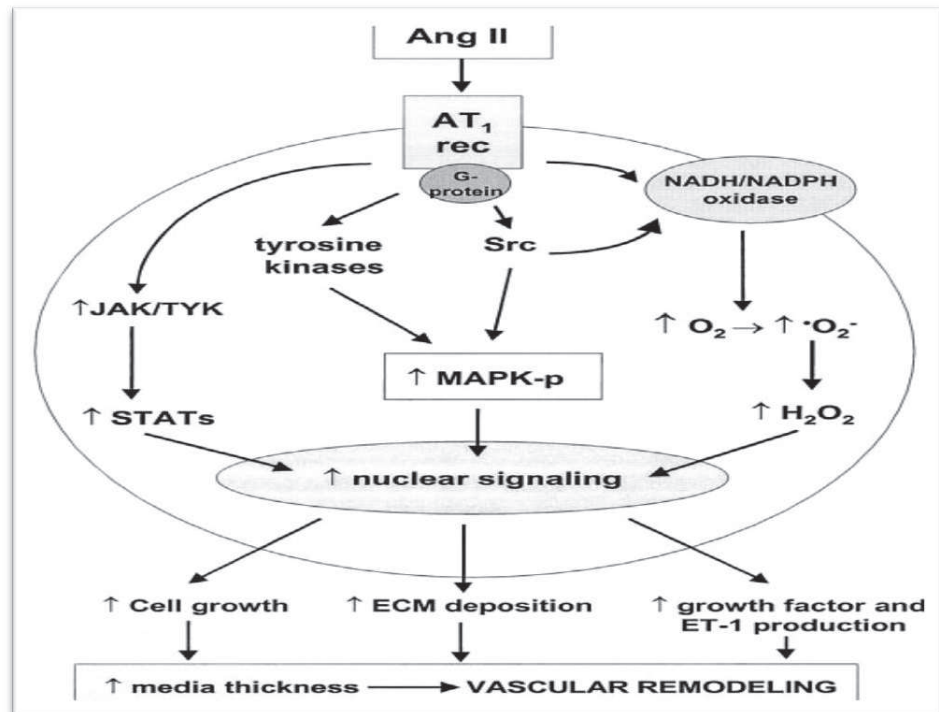
L'autooxydation des petites molécules telles que la dopamine, l'épinéphrine, les flavines et les hydroquinones peut être une source importante des ERO dans la cellule. Dans la plupart des cas, le produit net de telles réactions d'autooxydation est l' $O_2^-$  (Freeman and Crapo 1982). Les peroxysomes sont une source importante de production globale d' $H_2O_2$  dans la cellule. Ils contiennent un certain nombre d'enzymes génératrices d' $H_2O_2$  dont la glycolate oxydase, l'acide oxydase, l'urate oxydase et l'acyl-CoA oxydase (Thannickal and Fanburg 2000). La production cellulaire des ERO peut déclencher la production davantage des ERO par des réactions des radicaux en chaîne. La réaction entre les ERO et les acides gras polyinsaturés dans la membrane cellulaire peut entraîner la constitution de l'acide gras peroxy radical ( $R-COO^{\cdot}$ ) qui va réagir avec les chaînes adjacentes des acides gras et va stimuler la production davantage des radicaux lipidiques (Zalba, San Jose et al. 2001). Le métabolisme de l'acide arachidonique impliquant la lipoxigénase et la voie dépendante de cyclooxygénase conduisant à la synthèse des leucotriènes a été aussi rapporté pour générer des ERO. L'activité de la lipoxigénase a été également impliquée dans la signalisation redox-réglémenté de l'Ang II et de l'EGF (Thannickal and Fanburg 2000).

### ***3.3.1.3 Le stress oxydatif induit par les peptides vasoactifs***

#### ***3.3.1.3.1 L'Angiotensine II et le stress oxydatif***

Les ERO sont impliquées dans multiples réponses physiologiques induites par l'Ang II, parmi lesquelles se trouvent la prolifération des CMLV, la déficience de la relaxation dépendante de l'endothélium, l'induction de la réponse inflammatoire vasculaire et l'hypertrophie cardiaque (Griendling and Ushio-Fukai 2000). L'hypertrophie induite par l'Ang II dans les CMLV est dépendante de la production intracellulaire d' $H_2O_2$  (Griendling,

Minieri et al. 1994; Ushio-Fukai, Zafari et al. 1996) et est inhibée par le traitement avec des antioxydants (Nakamura, Fushimi et al. 1998). Laursen et collaborateurs ont rapporté que le stress oxydatif était impliqué dans l'hypertension induite par l'Ang II (Laursen, Rajagopalan et al. 1997). En plus, la stimulation de la production d' $\cdot\text{O}_2^-$ , ainsi que de l'expression des sous-unités gp47<sup>phox</sup> et Nox4 de la NAD(P)H oxydase par l'Ang II a également été rapportée (Li, Lappas et al. 2007). L'augmentation du stress oxydatif semble également provoquer l'activation de c-Src, la transactivation des récepteurs de croissance induite par l'Ang II (Mehta and Griendling 2007) et l'activation de la voie signalétique d'ERK1/2 (Lappas, Daou et al. 2005).



**Figure 1.11. Altérations des certaines voies de signalisation à long terme stimulées par l'Ang II dans l'hypertension**

*Abréviations : Ang II, angiotensine II; AT<sub>1</sub> rec, récepteur à l'angiotensine II type 1; ET1, endothéline 1; NADH/NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxyde d'hydrogène ; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anion superoxyde; JAK/TYR, JAK/TYR kinases; STAT, signal transducers and activators of transcription; ECM, matrice extracellulaire.*

**Référence:** Touyz R.M., Schiffrin E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*. 2000; **52**(4), p. 639-672

### 3.3.1.3.2 L'Endothéline 1 (ET 1) et le stress oxydatif

Des études ont démontré que l'administration d'ET-1 dans les CMLV et dans les artères isolés des rats traités au sel DOCA induit une augmentation d' $O_2^-$  par l'intermédiaire de l'activation de la NAD(P)H oxydase (Li, Fink et al. 2003). De plus, des études effectuées dans les artères provenant des rats traités au sel DOCA ont révélé une augmentation de l'ET-1 (Lariviere, Thibault et al. 1993) et de l' $O_2^-$  (Li, Fink et al. 2003; Li, Galligan et al. 2003). Au contraire, l'administration de l'antagoniste du récepteur  $ET_A$  provoque une inhibition de la production d' $O_2^-$  suggérant une augmentation du stress oxydatif via l'activation du récepteur  $ET_A$  par l'ET-1 (Callera, Touyz et al. 2003; Li, Galligan et al. 2003). Également, certaines études montrent que l'induction de la vasoconstriction par l'ET-1 implique la production d' $O_2^-$  et que ce mécanisme serait aussi retransmis par le récepteur  $ET_A$  (Diederich, Skopec et al. 1994; Galle, Lehmann-Bodem et al. 2000). Sedeek et collaborateurs ont rapporté que l'infusion des CMLV des rats Sprague-Dawley à l'ET-1 produisait une augmentation significative d' $O_2^-$  en fonction des doses injectées (Sedeek, Llinas et al. 2003). Ensuite, des études ont également démontré que la prolifération du muscle lisse stimulée par l'ET-1 impliquait l'induction des ERO (Wedgwood, Dettman et al. 2001).

### 3.3.2 Les voies de signalisation activées par les ERO

Dans les années 1970, pour la première fois, il a été observé que les ERO peuvent également fonctionner comme des messagers seconds. Il avait été remarqué que l'insuline stimule la production cellulaire d' $H_2O_2$  et que l' $H_2O_2$  exogène mimait les actions de l'insuline (Mukherjee, Lane et al. 1978). Ultérieurement, plusieurs études ont décrit l'implication des ERO endogènes dans les cascades de signalisation de plusieurs types cellulaires (Forman and Torres 2002; Landmesser, Dikalov et al. 2003). Les cibles majeures des ERO sont les protéines tyrosines kinases (PTK), les facteurs de transcription, les protéines activatrices de mitogène kinase (MAPK), les canaux ioniques et les phospholipases (Droge 2002).

### ***3.3.2.1 Les récepteurs aux facteurs de croissance***

Les espèces réactives oxygénées sont impliquées dans la phosphorylation des résidus tyrosine de l'EGF-R. Des études antérieures ont montré que, dans les CMLV de l'aorte, la phosphorylation de l'EGF-R par l'Ang II sur des résidus tyrosine spécifiques nécessite des ERO et elles ont démontré aussi que c-Src contribue à la sensibilité d'oxydoréduction de cette réponse. Ainsi, la transactivation de l'EGF-R est une voie biochimique importante activée par l'Ang II et médiée par les ERO dans les CMLV (Ushio-Fukai, Griendling et al. 2001). En outre, la sensibilité de la phosphorylation d'EGF-R pour l'oxydoréduction est confirmée par la constatation que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène augmente la phosphorylation d'EGF-R dans les CMLV (Ushio-Fukai, Alexander et al. 1999). Il a été également décrit l'inhibition de l'autophosphorylation d'EGF-R par l'addition de la catalase A431 dans les cellules du carcinome épidermoïde humaine (Bae, Kang et al. 1997). La phosphorylation tyrosine d'EGF-R induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implique l'inhibition de la tyrosine phosphatases. Knebel et ses collègues ont démontré que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait inhiber la déphosphorylation d'EGF-R par l'inhibition de la tyrosine phosphatases (Knebel, Rahmsdorf et al. 1996). L'interaction des facteurs de croissance avec leurs récepteurs induit également une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules du carcinome hépatocellulaire humaine (HepG2cells). Bae et collègues ont indiqué que la liaison de la PI3K au PDGF-R $\beta$  est nécessaire pour la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par le PDGF (Bae, Sung et al. 2000). On a aussi rapporté que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimule la phosphorylation du Tyr<sup>1021</sup> du récepteur PDGF-R $\beta$  dans les CMLV. Cette phosphorylation nécessite l'activation des deux protéines kinases, PKC $\delta$  et c-Src, mais pas la kinase intrinsèque du récepteur PDGF-R $\beta$ , ce qui suggère l'implication du c-Src et de la PKC dans la phosphorylation de PDGF-R $\beta$  induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Saito, Frank et al. 2002). Des travaux antérieurs ont montré l'implication des métalloprotéases dans la transactivation du PDGF-R $\beta$  et de l'EGF-R par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les CMLV. Un inhibiteur de la matrixmetalloproteases (MMP)-2/9 inhibe à la fois la transactivation de l'EGF-R induite par l'Ang II et celle induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le blocage ultérieure de la croissance et de la migration des CMLV (Eguchi, Dempsey et al. 2001).

### 3.3.2.2 Les MAP kinases

Les MAPK sont des sérine/thréonine kinases qui jouent le rôle de médiateurs dans la transduction nucléaire des signaux extracellulaires conduisant à l'activation des facteurs de transcription et à l'amélioration de l'expression des gènes. Les MAPK des mammifères sont regroupés en six sous-familles principales, dont trois sont les mieux caractérisées : les ERK1/2 (de l'anglais *extracellular signal-regulated kinases*) également connus sous le nom de p44 MAPK kDa et p42 MAPK kDa respectivement, la c-JNK (de l'anglais *c-Jun N-terminal kinases*) et la p38 MAPK. Cette classification est basée sur la présence des différents acides aminés dans leurs motifs de phosphorylation, Glu pour ERK1/2, Pro pour c-JNK et Gly pour p38 MAPK (Touyz and Berry 2002). Veidt et ses collègues ont démontré que les ERO intracellulaire sont essentiels pour l'activation des p38 MAPK, c-JNK et ERK5 induite par l'Ang II dans les CMLV, alors que la phosphorylation de ERK1/2 semble être insensible à l'oxydo-réduction. En outre, le traitement des CMLV avec NAC (N-Acetyl Cysteine), un piègeur des radicaux libres, ou avec DPI (chlorure de diphényliodonium), un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, s'est opposé aux effets stimulants de l'Ag II sur c-JNK et p38 MAPK mais pas à l'effet sur l'activité de ERK1/2 (Viedt, Soto et al. 2000). La phosphorylation des récepteurs des facteurs de croissance est une étape importante dans l'activation des MAPK par l'Ang II. L'activation des récepteurs des facteurs de croissance déclenche également la production des ERO (Bae, Kang et al. 1997). Touyz et ses collègues ont montré que l'Ang II stimule la production d'ERO en partie grâce à la transactivation de l'IGF-R et de l'EGF-R. L'inhibition des récepteurs à activité tyrosine kinase et la biodisponibilité réduite des ERO ont diminué la phosphorylation induite par l'Ang II de p38 MAPK et de ERK5, mais pas celle de ERK1/2 (Touyz, Cruzado et al. 2003). Le rôle du stress oxydatif dans la phosphorylation d'ERK1/2 au niveau des CMLV A10 a également été rapporté. La phosphorylation accrue de ERK1/2 a été atténuée jusqu'au niveau contrôle par un antioxydant suggérant le rôle des ERO dans le renforcement de la phosphorylation de ERK1/2 (Li, Lappas et al. 2007). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène stimule la phosphorylation d'AKT/PKB dans les CMLV suggérant que la phosphorylation d'AKT/PKB est sensible à l'oxydoréduction (Crossthwaite, Hasan et al. 2002). Ushio-Fukai et ses collègues ont démontré que la phosphorylation de PKB induite par l'Ang II est significativement inhibée à la fois par DPI, un inhibiteur de la NAD(P)H



oxydase, et par la surexpression de la catalase. Ces résultats nous suggèrent que les ERO pourraient jouer un rôle potentiel en tant que transducteurs de signaux reliant le récepteur AT1 à la voie de signalisation de la PKB dans les CMLV (Ushio-Fukai, Alexander et al. 1999).

### **3.3.3 Implication du stress oxydatif dans l'hypertension**

#### ***3.3.3.1 Le dommage vasculaire***

La surexpression des ERO provoque un dysfonctionnement de la cellule. Elle affecte l'homéostasie cellulaire et amène des dommages oxydatifs sur les composantes de base de la cellule (Szasz, Thakali et al. 2007). Elle cause aussi la modification des protéines en changeant la conformation des acides aminés et en amenant à un changement dans la fonction protéique ou en augmentant leur susceptibilité à la protéolyse (Davies 1987; Droge 2002). Elle entraîne également des modifications oxydatives au niveau des lipides et acides nucléiques (Szasz, Thakali et al. 2007). Les dommages oxydatifs générés par les ERO affectent le fonctionnement des vaisseaux, par exemple, la croissance des CMLV, la migration des cellules, la déposition de collagène et l'altération de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP de l'anglais *matrix metalloproteinase*), ce qui est un facteur important dans le remodelage artériel durant les maladies cardiovasculaires (Griendling, Sorescu et al. 2000; Touyz 2000). Dans les cellules endothéliales, le stress oxydatif induit l'apoptose ce qui abîme le fonctionnement de ces cellules. De plus, l'expression accrue des ERO dans les cellules stimule l'activation des facteurs de transcription (ex. NFκB et AP-1) et des gènes pro-inflammatoires (cytokines et interleukines), augmente aussi le niveau des molécules d'adhésion (ex. ICAM, VCAM, PECAM) et la production des chemokines (ex. MCP-1) et finalement stimule le recrutement des cellules inflammatoires (monocytes, macrophages), des phénomènes impliqués dans l'inflammation et la réparation vasculaire (Griendling, Sorescu et al. 2000; Touyz, Deschepper et al. 2002). L'augmentation d' $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  altère ainsi la relaxation dépendante de l'endothélium, augmente la réactivité contractile, puis détériore le tonus vasculaire.

### ***3.3.3.2 L'hypertension dans l'espèce humaine***

Des études cliniques ont montré la présence d'une production accrue des ERO chez les humains atteints d'hypertension essentielle. On a trouvé que le niveau des piègeurs des ERO, tels que la vitamine E, la glutathione et de la SOD est diminué chez les patients hypertendus (Sagar, Kallo et al. 1992). Berry et ses collègues ont démontré que la NAD(P)H oxydase est la source de production basale d' $O_2^-$  dans les artères internes et les veines saphènes humaines et que l'Ang II augmente le niveau d' $O_2^-$  dans les artères humaines. Cet effet est médié par la NAD(P)H oxydase et inhibé par l'antagoniste du récepteur AT1, losartan (Berry, Hamilton et al. 2000). L'activation du système rénine-angiotensine a été proposée comme un important médiateur dans l'activation de la NAD(P)H oxydase et la production des ERO dans l'hypertension humaine. Certains des effets thérapeutiques antihypertensifs des inhibiteurs des récepteurs AT1 et des inhibiteurs de l'ECA ont été attribués à l'inhibition de la NAD(P)H oxydase (Touyz and Schiffrin 2004). Plusieurs rapports ont montré le rôle de l'Ang II dans l'expression et l'activation des sous-unités de la NAD(P)H oxydase (Touyz, Cruzado et al. 2003).

## **4 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

Le rôle d'AMPc dans le développement de la pathologie cardiaque a soulevé l'intérêt dès sa découverte et continue d'attirer l'attention jusqu'aujourd'hui. Une relation entre l'AMPc et la fibrose cardiaque a été documenté (Yokoyama, Patel et al. 2008). Des études ont rapporté l'implication de l'AMPc dans la régulation du tonus vasculaire rénal (Chatziantoniou, Ruan et al. 1993; Sandner, Kornfeld et al. 1999) et pulmonaire (Barnes and Liu 1995). Récemment il a été démontré que dans les souris IEX-1 knockout, l'hypertension dérive de l'altération de la production et de la signalisation par l'AMPc dans les CMLV (Shahid, Shen et al. 2010). Les agents qui augmentent le taux d'AMPc s'opposent à l'effet vasoconstricteur de l'Ang II (Randall, MacLennan et al. 1996) et inhibent la réponse chimiotactique des CMLV à l'Ang II in vitro (Dubey, Jackson et al. 1995). Un taux diminué d'AMPc intracellulaire a été observé dans les CMLV des rats SHR comparativement aux rats normotendus (Anand-Srivastava 1988; Anand-Srivastava 1992)

et cette différence a été remarquée même chez les jeunes SHR qui n'avaient pas encore développé l'hypertension (Ramanathan and Shibata 1974).

Dans notre laboratoire on a constaté que dans les CMLV des rats SHR (Anand-Srivastava 1992) et des modèles expérimentaux d'hypertension (Anand-Srivastava, de Champlain et al. 1993) il y a une augmentation de l'expression et des fonctions des protéines  $G_{\alpha}$ . Il a été aussi démontré que les CMLV des rats SHR ont un taux de prolifération plus important par rapport aux WKY de même âge (Paquet, Baudouin-Legros et al. 1989). L'augmentation de l'expression des protéines  $G_{\alpha}$  et la prolifération accrue des CMLV des rats SHR ont été attribuées à la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance et à l'activation de la voie de signalisation de la MAPK par les peptides vasoactives endogènes (Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011). Le rôle du stress oxydatif dans l'augmentation de l'expression des protéines  $G_{\alpha}$  par le mécanisme de transactivation des récepteurs des facteurs de croissance a aussi été signalé (Mbong and Anand-Srivastava 2012). Nous émettons l'hypothèse que la diminution du taux d'AMPc intracellulaire peut influencer l'augmentation de l'expression des protéines  $G_{\alpha}$  et la prolifération accrue des CMLV des rats SHR.

L'objectif de cette étude consiste donc à évaluer l'effet du niveau réduit d'AMPc intracellulaire sur l'expression et les fonctions augmentées des protéines  $G_{\alpha}$  ainsi que sur la prolifération accrue des CMLV des rats SHR. Il est bien connu que les protéines  $G_{\alpha}$  qui inhibent l'AC liée à la membrane sont un des éléments les plus importants qui diminuent le niveau intracellulaire d'AMPc. Mais, d'autres facteurs sont aussi impliqués dans le contrôle des taux d'AMPc tels que l'AC soluble activée par le bicarbonate (Buck, Sinclair et al. 1999; Tresguerres, Levin et al. 2011), les phosphodiesterases (Adderley, Sprague et al. 2010), ainsi que l'activation ou l'inhibition de l'AC liée à la membrane par les tyrosine kinases d'une manière indépendante des protéines G (Tan, Kelvin et al. 2001). Il est donc possible que le taux intracellulaire d'AMPc dans les CMLV des SHR soit diminué avant que les protéines  $G_i$  commencent à augmenter, processus qui débute à l'âge de deux semaines (Marcil, Thibault et al. 1997). S'il s'avère que le taux diminué d'AMPc intracellulaire augmente le niveau des protéines  $G_i$ , le second but de ce projet sera de

déterminer la voie de signalisation cellulaire par laquelle il accomplit son effet. Afin de répondre à ces objectifs, on utilisera des CMLV provenant de la culture primaire des aortes de rats SHR et WKY. Les cellules seront traitées avec différentes concentrations de dibutyryladénosine 3',5'-monophosphate cyclique (dbcAMP), un analogue de l'AMPc perméable à la membrane cellulaire et l'expression des protéines G $\alpha$ i-2 et G $\alpha$ i-3 ainsi que le taux de prolifération des cellules seront déterminés. L'effet du dbcAMP sur l'activité de l'AC sera également examiné dans les deux types cellulaires. En second lieu, pour vérifier si l'AMPc contrôle les protéines Gi et la prolifération par un mécanisme impliquant la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance et l'activation de la voie de signalisation de la MAPK l'effet du dbcAMP sur l'expression des EGF-R, PDGF-R, ERK1/2 et c-Src seront évaluées par la méthode d'immunobuvardage de type Western. Finalement, si les résultats montrent que l'AMPc accomplit son effet par l'activation des récepteurs tyrosine kinase, les conséquences de l'augmentation du niveau d'AMP sur le stress oxydatif seront aussi examinées à l'aide de la méthode de chimiluminescence à la lucigénine.

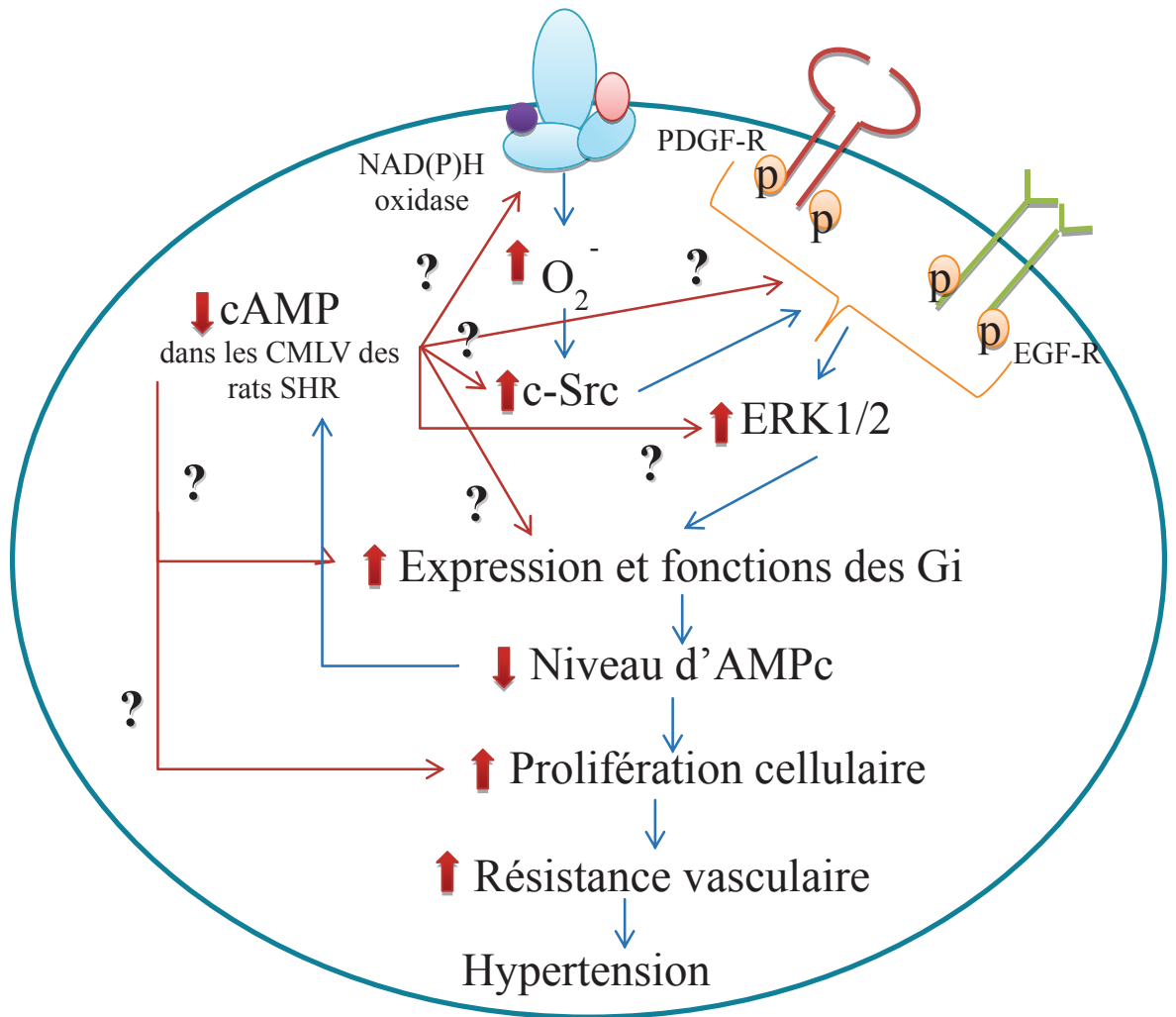


Figure 1.12: Schéma illustratif des objectifs

**CHAPITRE 2**

**ARTICLE SCIENTIFIQUE**

**Role of reduced levels of intracellular cAMP in enhanced expression of Gi proteins and hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from SHR\***

Svetlana Gusan and Madhu B. Anand-Srivastava\*\*

Department of Physiology, Université de Montréal, Quebec, Canada

**Running Head:** Reduced intracellular levels of cAMP and Gi proteins, hyperproliferation

\*\* Correspondence address:

Dr Madhu B. Anand-Srivastava

Department of Physiology,

Faculty of Medicine,

Université de Montréal

C.P. 6128

Succ. Centre-Ville

Montréal (Québec) H2X 1H1

Canada

## Abstract

We have previously shown that vascular smooth muscle cells (VSMC) from spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit enhanced expression of inhibitory G proteins (Gi) and enhanced cell proliferation as compared to VSMC from Wistar-Kyoto rats (WKY). The levels of cAMP were shown to be decreased in VSMC from SHR. The present study was therefore undertaken to examine the contribution of the decreased intracellular level of cAMP in the enhanced expression of Gi proteins and increased proliferation of VSMC from SHR and to further explore the underlying molecular mechanisms responsible for this response. VSMC from SHR showed an enhanced expression of Gia-2 and Gia-3 as compared to VSMC from WKY which was decreased in a dose-dependent manner by dbcAMP, a cell-permeable cAMP analog. In addition, the enhanced functions of Gi proteins as demonstrated by enhanced inhibition of adenylyl cyclase by inhibitory hormones and forskolin (FSK)-stimulated adenylyl cyclase activity by low concentration of GTP $\gamma$ S in VSMC from SHR were also restored to the WKY levels by dbcAMP. The enhanced proliferation of VSMC exhibited by SHR was also attenuated by dbcAMP and forskolin, an activator of adenylyl cyclase. In addition, dbcAMP also restored the increased production of superoxide anion (O $_2^-$ ), NAD(P)H oxidase activity and enhanced expression of Nox4 and p47<sup>phox</sup> proteins observed in VSMC from SHR to control levels. Furthermore, the increased phosphorylation of PDGF-R, EGF-R, c-Src and ERK1/2 exhibited by VSMC from SHR were also decreased by dbcAMP in a dose-dependent manner. These results suggest that decreased levels of intracellular cAMP exhibited by VSMC from SHR contributes to the enhanced expression of Gi proteins and hyperproliferation through increasing oxidative stress and transactivation of EGF-R, PDGF-R and MAP kinase signaling pathway.

**Key words:** Gi proteins; cell proliferation; cAMP; oxidative stress; growth factor receptors; ERK1/2; vascular smooth muscle cells; SHR.



## 1. Introduction

Cyclic AMP (cAMP), a second messenger produced by adenylyl cyclase signal transduction system plays an important role in the regulation of variety of physiological functions including cardiac contractility, vascular smooth muscle tone, cell proliferation and protein synthesis (Assender, Southgate et al. 1992; Giasson, Servant et al. 1997; Bers 2002; Barlow, Rose et al. 2006). The adenylyl cyclase activity and the levels of cAMP are regulated by two guanine nucleotide regulatory proteins (G proteins), stimulatory (Gs) and inhibitory (Gi) that mediate the stimulatory and inhibitory responses of the hormones respectively to adenylyl cyclase (Neer 1995) and increase or decrease the levels of cAMP. G proteins are heterotrimers composed of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -subunits. The  $\alpha$  subunit is responsible for binding and hydrolyzing GTP and confers specificity in receptor and effector interaction. Four different isoforms of G $\alpha$  proteins resulting from the differential splicing of a single gene (Bray, Carter et al. 1986; Robishaw, Smigel et al. 1986), and three distinct forms of G $\alpha$  proteins (G $\alpha$ -1, G $\alpha$ -2 and G $\alpha$ -3) encoded by three distinct genes have been identified (Itoh, Toyama et al. 1988). All three forms of G $\alpha$  (G $\alpha$ -1 to G $\alpha$ -3) are implicated in adenylyl cyclase inhibition (Itoh, Toyama et al. 1988) and in the activation of atrial K<sup>+</sup> channel. (Yatani, Mattera et al. 1988)

Alterations in the levels of G<sub>i</sub> protein and associated decreased adenylyl cyclase signaling have been linked to impaired cellular functions leading to various pathological states, including hypertension, hypertrophy and cardiac failure (Anand-Srivastava 1992; Thibault and Anand-Srivastava 1992; Giasson, Servant et al. 1997; Kashihara, Nakada et al. 2012). Several abnormalities in G protein expression, adenylyl cyclase activity, and cAMP levels have been reported in cardiovascular tissues from genetic models (spontaneously hypertensive rats(SHR)) and different models of experimentally induced hypertensive rats (Anand-Srivastava 1988; Anand-Srivastava, Picard et al. 1991; Anand-Srivastava 1992; Bohm, Gierschik et al. 1992; Thibault and Anand-Srivastava 1992; Anand-Srivastava, de Champlain et al. 1993). An increased expression of Gi protein and Gi protein mRNA resulting in decreased levels of cAMP, has been reported in hearts and aortas from SHR and in hearts from deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats and 1 kidney 1 clip (1K1C) rats with established hypertension (Anand-Srivastava 1992; Thibault and

Anand-Srivastava 1992; Anand-Srivastava, de Champlain et al. 1993; Ge, Garcia et al. 2006). The increased expression of  $G_{i\alpha}$  proteins was shown to occur before the onset of hypertension in SHR and in DOCA-salt hypertensive rats suggesting that the enhanced levels of  $G_{i\alpha}$  proteins and associated decreased levels of cAMP may be one of the contributing factors in the pathogenesis of hypertension (Marcil, Thibault et al. 1997; Marcil, de Champlain et al. 1998). This was further supported by our studies showing that the inactivation of  $G_{i\alpha}$  protein by pertussis toxin in 2-week-old SHR (prehypertensive state) that attenuated the inhibition of adenylyl cyclase and increased the levels of cAMP also resulted in the attenuation of blood pressure in SHR (Li and Anand-Srivastava 2002).

The levels of Gi proteins have been shown to be regulated by several modulators including vasoactive peptides, nitric oxide, cGMP etc (Palaparti, Ge et al. 1999; Boumati, Li et al. 2003; Bassil and Anand-Srivastava 2006; Bassil and Anand-Srivastava 2007). We have earlier shown that vasoactive peptides such as angiotensin II (Ang II), endothelin (ET-1) and arginine vasopressin (AVP) increased (Palaparti, Ge et al. 1999; Boumati, Li et al. 2002; Boumati, Li et al. 2003) whereas atrial natriuretic peptide (ANP), C-ANP<sub>4-23</sub>, NO donors, SNAP and SNP and cGMP decreased the expression of  $G_{i\alpha}$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) (Anand-Srivastava 2000; Bassil and Anand-Srivastava 2006; Bassil and Anand-Srivastava 2007). Ang II-induced enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins was shown to be restored to control levels by dibutyryl cAMP suggesting the implication of decreased levels of intracellular cAMP in Ang II-induced enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins in A10 VSMC (Li et al. 2012). In addition, VSMC from SHR also exhibited enhanced levels of  $G_{i\alpha}$  proteins which were shown to be attributed to the enhanced oxidative stress due to the increased levels of superoxide anion, NAD(P)H oxidase activity and increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, p47<sup>phox</sup> and Nox4 (Saha, Li et al. 2008). We recently showed that the enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 in VSMC from SHR contribute to the enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins through oxidative stress-induced transactivation of growth factor receptors and MAP kinase signalling [32, 33]. Since VSMC from SHR exhibit decreased levels of cAMP (Anand-Srivastava 1988; Anand-Srivastava 1992), it may be possible that the decreased levels of intracellular cAMP may contribute to the increased expression of Gi proteins and hyperproliferation of VSMC from SHR. The present study was therefore undertaken to

investigate the role of decreased levels of intracellular cAMP in the enhanced expression of Gi proteins and hyperproliferation of VSMC from SHR and the underlying signaling pathways in this response. For this study, we examined the effect of dbcAMP and cAMP agonists on Gi $\alpha$  expression and function, cellular proliferation, oxidative stress and growth factors receptors and MAPK activity in VSMC from SHR and age-matched WKY rats.

We provide evidence that decreased levels of intracellular cAMP through increased oxidative stress and c-Src activation transactivate growth factors receptors, which through MAPK signalling, enhance the expression of Gi proteins and proliferation of VSMC from SHR.

## 2. Methods

Adenosine triphosphate, dibutyryl cyclic AMP, forskolin and isoproterenol were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Creatinine kinase, myokinase (EC 2.7.4.3), guanosine 5'-[3'-thio]triphosphate (GTP $\gamma$ S), guanosine triphosphate (GTP) and adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) were purchased from Boehringer-Mannheim (Montreal, Quebec, Canada). ATP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] (3000 Ci/mmol) and Thymidine [methyl-<sup>3</sup>H](88.9 Ci/mmol) were from Perkin Elmer (Boston, MA, USA). Antibodies against G $\alpha$ -2 (L5), G $\alpha$ -3 (C-10), p-EGF-R(phosphospecific-tyrosine<sup>1173</sup>), EGF-R(1005), p-PDGF-R(phosphospecific-tyrosine<sup>857</sup>), PDGF-R(958), p-c-Src(phosphospecific-tyrosine<sup>419</sup>), c-Src(N-16), p-ERK1/2 (phosphospecific-tyrosine<sup>204</sup>), ERK1/2(C-14), Nox4(N-15), p47<sup>phox</sup>(D-10) dynein(74-1) were purchased from Santa-Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). All other chemicals used in these experiments were purchased from Sigma-Aldrich.

### 2.1. Cell culture and incubation

VSMC from 12-week-old SHR and age-matched WKY rats were cultured from aortas as described previously (Anand-Srivastava, Franks et al. 1982). The purity of the cells was checked by immunofluorescence technique using  $\alpha$ -actin as described previously (Li, Levesque et al. 2010). These cells were found to contain high levels of smooth muscle-specific actin. The cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> flasks and incubated at 37 °C in 95% air and 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, L-glutamine and sodium bicarbonate) containing antibiotics and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)). The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin containing 0.2% EDTA and utilized between passages 4 and 12. Confluent cells cultures were then starved by incubation for 3 h in DMEM without FBS at 37 °C to reduce the interference by growth factors present in the serum. The cells were then incubated in the absence or presence of 0.5 mM or different concentrations (0.1, 0.3, 0.5 and 1mM) of dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) for 16 hours. After incubation, the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in a 200  $\mu$ l buffer (lysis) containing 25 mM Tris·HCl (pH 7.5), 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM NaCl, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl

sulfate and 0.5 µg/ml leupeptin on ice. The cell lysate were centrifuged at 12.000 rpm for 10 min at 4°C, and the supernatants were used for Western blot analysis using the specific, before mentioned antibodies.

### ***2.2 Adenylyl cyclase activity determination***

Adenylyl cyclase activity was determined by measurement of [<sup>32</sup>P] cAMP formation from [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP, as described previously (Marcil, de Champlain et al. 1998; Hashim, Liu et al. 2002). Typical assay medium contained 50 mM glycylglycine (pH 7.5), 0.5 mM MgATP, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP ( $1.5 \times 10^6$  cpm), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (in excess of ATP concentration), 100 mM NaCl, 0.5 mM cAMP, 1 mM IBMX, 0.1 mM EGTA, 10 µM guanosine 5'( $\gamma$ -thio) triphosphate (GTP $\gamma$ S), or otherwise as indicated, and an ATP-regenerating system consisting of 2 mM creatinine phosphate, 0.1 mg/ml creatinine kinase, and 0.1 mg/ml myokinase in a final volume of 200 µl. Incubations were initiated by the addition of the membrane preparations (20-40 µg) to the reaction mixture, which had been thermally equilibrated for 2 min at 37 °C. The reactions, conducted in triplicate for 10 min at 37 °C, were terminated by the addition of 0.6 ml 120 mM zinc acetate containing 0.5 mM unlabeled cAMP. cAMP was purified by coprecipitation of other nucleotides with ZnCO<sub>3</sub> by addition of 0.5 ml of 144 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and subsequent chromatography using double-column system, as described previously (Marcil, de Champlain et al. 1998; Lappas, Daou et al. 2005).

### ***2.3. Western blot analysis***

Western blotting of Gi $\alpha$ -2, Gi $\alpha$ -3, ERK1/2, EGF-R and PDGF-R, c-Src, p47<sup>phox</sup> and Nox4 was performed as described previously (Anand-Srivastava 1992; Anand-Srivastava, de Champlain et al. 1993). After SDS-PAGE, the separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) with a semi-dry transblot apparatus (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) at 15 V for 45 min (Gi $\alpha$ -2, Gi $\alpha$ -3, ERK1/2, c-Src, p47<sup>phox</sup> and Nox4) or a liquid transfer apparatus (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) at 100 V for 1 h (EGF-R and PDGF-R). After transfer, the membranes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in PBS containing 5% skim milk at room temperature

for 1 h. The blots were then incubated with specific antibodies against different proteins: L5 against  $G\alpha$ -2, C-10 against  $G\alpha$ -3, E-4 against p-ERK1/2, C-14 against ERK1/2, phosphospecific Tyr<sup>1173</sup> against p-EGF-R, 1005 against EGF-R, phosphospecific Tyr<sup>857</sup> against p-PDGF-R, 958 against PDGF-R, N-15 against Nox4, D-10 against p47<sup>phox</sup> and 74-1 against dynein, served as control in PBS containing 0.1% Tween-20 overnight at 4°C. The antigen-antibody complexes were detected by incubating the blots with respective secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. The blots were then washed three times with PBS before reacting with enhanced-chemiluminescence (ECL) Western blotting detection reagents (Amersham, Ontario, Canada). Quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the enhanced laser densitometer LKB Ultrosan XL and quantified using the Gelscan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada)

#### ***2.4. Superoxide anion measurements***

Basal superoxide anion production in VSMC was measured using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method with low concentration (5  $\mu$ M) of lucigenin as described previously (Wu, Millette et al. 2001). After treatment with dbcAMP (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM), the cells were washed in oxygenated Krebs-HEPES buffer, scraped and placed in scintillation vials containing lucigenin solution, and the emitted luminescence was measured with a liquid scintillation counter (Wallac 1409; PerkinElmer Life Science, St-Laurent, Québec, Canada) for 5 min. The average luminescence value was estimated, the background value subtracted and the result was divided by the total weight of proteins in each sample.

#### ***2.5. NAD(P)H oxidase activity determination***

NAD(P)H oxidase activity in the samples was assessed by adding NADH  $10^{-4}$  M (Sigma-Aldrich) in the vials before counting. Basal superoxide-induced luminescence was then subtracted from the luminescence value induced by NADH.

### ***2.6. Determination of cell proliferation.***

Cell proliferation was quantified by DNA synthesis and by directly counting the cell number. DNA synthesis was evaluated by incorporation of [<sup>3</sup>H]Thymidine into cells as described previously (20). Subconfluent SHR and WKY VSMC were plated in 6-well plates for 24 h and were serum deprived for 24 h to induce cell quiescence. Confluent cells were then incubated with dbcAMP (0.5 mM) or forskolin (100 μM) for 24 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1 μCi) was added and further incubated for 4 h before the cells were harvested. The cells were rinsed twice with ice-cold PBS and incubated with 5% trichloroacetic acid for 1 h at 4°C. After being washed twice with ice-cold water, the cells were incubated with 0.4 N sodium hydroxide solution for 30 min at room temperature, and radioactivity was determined by liquid scintillation counter. Cell viability was checked by the Trypan blue exclusion technique, which indicated that more than 90–95% of cells were viable. Cell counts were determined by counting the viable cells in a hemocytometer with the Trypan blue dye exclusion assay.

### ***2.7. Statistical analysis***

Data are expressed as means ± standard error (SE) and were analyzed using one-way ANOVA in conjunction with Newman-Keuls test. A mean difference between groups was considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### ***3.1 Implication of decreased levels of intracellular cAMP in enhanced expression of Gi proteins in VSMC from SHR***

To investigate if decreased level of intracellular cAMP reported in VSMC from SHR (Anand-Srivastava 1988) contribute to the enhanced expression of Gi $\alpha$  proteins in VSMC from SHR, the effect of different concentrations (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) of a permeable analog of cAMP, dbcAMP was examined on the enhanced expression of Gi $\alpha$ -2 and Gi $\alpha$ -3 proteins in VSMC from SHR (Fig.1). Gi $\alpha$ -1 is absent in VSMC (Clark, Milligan et al. 1992). As reported earlier (Lappas, Daou et al. 2005), VSMC from SHR exhibited enhanced expression of Gi $\alpha$ -2 (1A) and Gi $\alpha$ -3 (1B) proteins by about 60% and 40% respectively as compared to VSMC from WKY and dbcAMP decreased the enhanced expression of Gi $\alpha$ -2 and Gi $\alpha$ -3 proteins in a concentration-dependent manner with maximum effect (100% decrease) at 0.5mM. On the other hand, this treatment did not significantly affect the levels of Gi $\alpha$  proteins in VSMC from WKY rats.

#### ***3.2 Implication of decreased levels of intracellular cAMP in enhanced functions of Gi proteins in VSMC from SHR***

##### *3.2.1 Receptor-dependent functions*

Since the enhanced expression of Gi $\alpha$ -2 and Gi $\alpha$ -3 proteins in VSMC from SHR is attributed to the decreased levels of intracellular cAMP, it was of interest to examine if the enhanced functions of Gi proteins reported earlier in VSMC from SHR (Anand-Srivastava 1992) were also due to the decreased levels of intracellular cAMP. To investigate this, the effect of dbcAMP on receptor-dependent and -independent functions was examined in VSMC from SHR. For the dependent functions of Gi, the effect of 0.5 mM of dbcAMP on the hormonal inhibitions of adenylyl cyclase activity was examined in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in Fig. 2, indicate that Ang II-, C-ANP<sub>4-23</sub>- and oxotremorine- mediated enhanced inhibition (35% for Ang II and 45% for C-ANP<sub>4-23</sub> and oxotremorine) of adenylyl cyclase activity in VSMC from SHR compared to WKY rats, were reversed toward WKY levels by dbcAMP.



### 3.2.2 Receptor-independent functions

For receptor-independent functions, the effects of dbcAMP were investigated on the inhibitory effects of GTP $\gamma$ S ( $10^{-12}$ - $10^{-7}$ M) on forskolin (FSK)-stimulated adenylyl cyclase activity in VSMC from SHR and WKY rats. The results shown in Fig. 3 indicate that the FSK-stimulated adenylyl cyclase activity was inhibited by GTP $\gamma$ S in a concentration-dependent manner in VSMC from SHR and WKY, however, the inhibition was significantly enhanced (28%) in VSMC from SHR as compared with VSMC from WKY and was reversed to control levels by dbcAMP.

### 3.3 Implication of decreased levels of intracellular cAMP in enhanced proliferation of VSMC from SHR

VSMC from SHR have been shown to exhibit enhanced proliferation as compared to WKY rats (Li, Levesque et al. 2010). Since cAMP regulates the cell growth, it was of interest to investigate if the decreased levels of intracellular cAMP reported in VSMC from SHR (Anand-Srivastava 1988; Saha, Li et al. 2008) contribute to the enhanced proliferation of VSMC of SHR. To test this, we examined the effect of dbcAMP on cell proliferation of VSMC from SHR and WKY rats, and the results are shown in Fig. 4. As reported previously, VSMC from SHR exhibited enhanced proliferation compared with WKY (~350%) as determined by [ $^3$ H] thymidine incorporation (Fig. 4A), which was significantly attenuated by ~100% by dbcAMP. On the other hand, dbcAMP did not have any effect on the proliferation of VSMC from WKY. In addition, forskolin, a direct activator of adenylyl cyclase enzyme, also attenuated the enhanced proliferation of VSMC from SHR by 100%, whereas these antagonists did not reduce the proliferation of VSMC from WKY rats. In addition, the cell number as determined by Trypan blue dye exclusion assay was also increased by ~400% in VSMC from SHR, which was attenuated to control WKY levels by dbcAMP and forskolin (Fig. 4B)

### 3.4 Implication of decreased levels of intracellular cAMP in enhanced production of superoxide anion and NAD(P)H oxidase activity in VSMC from SHR VSMC

We earlier showed the role of enhanced levels of G $\alpha$  proteins in increased production of O $_2^-$  in VSMC from SHR (Saha, Li et al. 2008). Since cAMP is the downstream signaling

molecule of  $G_{i\alpha}$  protein and the levels of cAMP were decreased in SHR, it was of interest to examine if the enhanced oxidative stress exhibited by VSMC from SHR was attributed to the decreased levels of intracellular cAMP. To examine this, the effect of dbcAMP on  $O_2^-$  production and NAD(P)H oxidase activity was investigated in VSMC from SHR. Results shown in Fig. 5, indicate that the enhanced production of  $O_2^-$  (Fig. 5A) and NAD(P)H oxidase activity (Fig. 5B) in VSMC from SHR compared to WKY rats were restored to control WKY levels by dbcAMP. On the other hand, dbcAMP did not have any effect on  $O_2^-$  production and NAD(P)H oxidase activity in VSMC from WKY rats.

### ***3.5. Implication of decreased levels of intracellular cAMP in enhanced expression of NAD(P)H oxidase subunits in VSMC from SHR***

The levels of different subunits of NAD(P)H oxidase, such as Nox4, p47<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> have been reported to be upregulated in several tissues from SHR including VSMC (Zalba, Beaumont et al. 2000; Chabrashvili, Tojo et al. 2002; Lodi, Cogolludo et al. 2006). Since dbcAMP decreased the enhanced production of  $O_2^-$  and NAD(P)H oxidase activity in VSMC from SHR, it may be possible that dbcAMP-evoked decrease in  $O_2^-$  production and NAD(P)H oxidase activity is associated with decreased expression of different subunits of NAD(P)H oxidase. To investigate this, the effect of dbcAMP on the expression of p47<sup>phox</sup>, Nox4 and p22<sup>phox</sup> proteins was examined in VSMC from SHR and WKY rats. As shown in Fig. 6, the expression of Nox4 and p47<sup>phox</sup> that was significantly enhanced by ~ 50% and 45% in VSMC from SHR compared to WKY rats, was attenuated in a concentration-dependent manner by dbcAMP and at 1mM, it was attenuated by 80% and 75% respectively. However, dbcAMP did not have any effect on the expression of Nox4 and p47<sup>phox</sup> proteins from WKY rats. On the other hand, the levels of p22<sup>phox</sup> were not different in the two groups of rats (data not shown).

### ***3.6 Implication of decreased levels of intracellular cAMP in enhanced phosphorylation of EGF-R and PDGF-R in VSMC from SHR***

Since EGF-R and PDGF-R transactivation by enhanced levels of vasoactive peptides in VSMC from SHR has been shown to contribute to the enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins (Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011), it was of interest

to examine if the decreased levels of intracellular cAMP increase the expression of G $\alpha$  proteins through the transactivation of EGF-R and PDGF-R. To test this, the effect of dbcAMP on the phosphorylation of EGF-R and PDGF-R were examined in VSMC from SHR and WKY rats using specific phospho-tyrosine antibodies. As shown in Fig. 7, phospho-specific-Tyr<sup>1173</sup>-EGF-R and phospho-specific-Tyr<sup>857</sup> detected a single band at 170 kDa and 190 kDa corresponding to EGF-R and PDGF-R respectively in VSMC from both SHR and WKY rats. However, the extent of EGF-R and PDGF-R phosphorylation was greater by ~ 45% and 50% respectively in VSMC from SHR compared to VSMC from WKY rats, whereas the expression of total EGF-R and PDGF-R was not altered in VSMC from SHR as compared to WKY. dbcAMP attenuated the increased phosphorylation of EGF-R and PDGF-R in a concentration-dependent manner and at 1mM, the enhanced phosphorylation of EGF-R and PDGF-R was inhibited to WKY control levels. However, this treatment did not have any significant effect on the phosphorylation of EGF-R and PDGF-R in VSMC from WKY rats.

### ***3.7. Implication of decreased levels of intracellular cAMP in enhanced phosphorylation of c-Src in VSMC from SHR***

Since c-Src is the upstream signaling molecule and contributes to the activation of EGF-R, it was desirable to examine if the enhanced activation of c-Src in VSMC from SHR is attributed to the decreased levels of intracellular cAMP. To test this, the effect of dbcAMP on the phosphorylation of c-Src was assessed in VSMC from SHR and WKY rats. Results shown in Fig. 8 indicate that the phosphorylation of Tyr<sup>418</sup> on c-Src was significantly augmented by ~75% in VSMC from SHR as compared to WKY rats. dbcAMP attenuated the enhanced phosphorylation of c-Src in a concentration-dependent manner and at 1 mM, it was completely restored to WKY levels.

### ***3.8. Implication of decreased intracellular levels of cAMP in ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR***

Since the phosphorylation of ERK1/2 has been reported to be increased in VSMC from SHR (Lappas, Daou et al. 2005), it was of interest to examine the contribution of decreased levels of intracellular cAMP in the augmented phosphorylation of ERK1/2 in VSMC from

SHR. To test this, the effect of dbcAMP was examined on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from SHR and the results are shown in Fig. 9. As reported earlier (Lappas, Daou et al. 2005), the phosphorylation of ERK1/2 was significantly augmented by ~ 40% in VSMC from SHR as compared to WKY. dbcAMP treatment attenuated the enhanced phosphorylation of ERK1/2 in a concentration-dependent manner and at 0.5mM, it was completely attenuated to control levels. However, this treatment did not have any significant effect on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from WKY rats.

#### 4. Discussion

We earlier showed that VSMC from SHR exhibit enhanced levels of  $G_{i\alpha}$  proteins (Anand-Srivastava 1992) and exaggerated cell growth (proliferation) (Li, Levesque et al. 2010) as compared to VSMC from WKY rats. The implication of enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 and oxidative stress in enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins and hyperproliferation has also been reported (Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011; Mbong and Anand-Srivastava 2012). However, in the present study, we report for the first time that the decreased levels of intracellular cAMP in VSMC of SHR may contribute to the enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins and enhanced proliferation through the transactivation of growth factor receptors.

We report that dbcAMP that augments the intracellular levels of cAMP, attenuated the enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins in VSMC from SHR to control levels. In addition, dbcAMP also inhibited the enhanced  $G_{i\alpha}$  functions as demonstrated by the attenuation of the enhanced inhibition of adenylyl cyclase by inhibitory hormones and FSK-stimulated adenylyl cyclase activity by GTP $\gamma$ S in VSMC from SHR. These results suggest that the decreased levels of intracellular cAMP in SHR may be responsible for the enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins and  $G_{i\alpha}$  functions. In this regard, dbcAMP was also shown to attenuate Ang II-induced enhanced expression of  $G_{i\alpha}$  proteins in VSMC (Li and Anand-Srivastava 2012). A role of cAMP in the regulation of proliferation of various cell types has been well documented. cAMP was shown to stimulate the cell proliferation of thyrocytes, hepatocytes, epithelial cells, Swiss 3T3 cells and keratinocytes, whereas it inhibits the proliferation of several cells including fibroblasts and smooth muscle cells (Pastan, Johnson et al. 1975; Dumont, Jauniaux et al. 1989; Cho-Chung 1990). In the present study, we report that the enhanced proliferation exhibited by VSMC from SHR may also be attributed to the decreased levels of intracellular cAMP, because augmenting the intracellular levels of cAMP by dbcAMP or forskolin, a cAMP elevating agent, attenuated the enhanced proliferation of VSMC of SHR as determined by thymidine incorporation as well as by counting the cell number. In addition, the studies showing that Ang II-stimulated total protein synthesis in rat aortic SMC was attenuated by the elevation of intracellular

cAMP levels (Giasson, Servant et al. 1997) further supports the implication of reduced levels of intracellular cAMP in enhanced protein synthesis.

We previously showed the implication of ERK1/2 in Ang II-induced enhanced expression of Gi $\alpha$ -2 and Gi $\alpha$ -3 protein and cell proliferation in A10 VSMC as well as in VSMC from SHR (Li, Lappas et al. 2007; Gomez Sandoval, Levesque et al. 2009; Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011). In the present study, we show that the signaling mechanism by which decreased levels of intracellular cAMP increased the expression of Gi proteins and cell proliferation of VSMC from SHR may involve the MAP kinase pathway, because dbcAMP, which inhibited enhanced expression of Gi proteins and enhanced proliferation, also attenuated the enhanced phosphorylation of ERK1/2. In this regard, cAMP elevating agents including isoproterenol, glucagon and forskolin have been reported to inhibit MAP kinase activity in adipocytes (Sevetson, Kong et al. 1993). In addition, PKA, the primary effector of cAMP signaling, was also shown to inhibit the MAPK/ERK cascade in many cell types including human arterial SMCs (Graves, Bornfeldt et al. 1993; Wu, Dent et al. 1993).

The implication of growth factor receptor activation in enhanced expression of Gi proteins and enhanced proliferation of VSMC from SHR has recently been shown (Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011). In this study, we report the enhanced activation of EGF-R and PDGF-R in VSMC from SHR may also be attributed to the decreased levels of intracellular cAMP because dbcAMP that increases the intracellular levels of cAMP attenuated the enhanced phosphorylation of EGF-R and PDGF-R. These results suggest that growth factors receptor activation may be the underlying mechanism through which decreased levels of intracellular cAMP enhanced the expression of Gi proteins and proliferation of VSMC in SHR. In this regard, the attenuation of PDGF-R activation by cAMP elevating agents has been shown by several investigators (Graves, Bornfeldt et al. 1993; Liu, Xu et al. 2011)

We also examined the upstream signaling mechanism activated by decreased levels of intracellular cAMP that lead to the transactivation of EGF-R and PDGF-R in VSMC from SHR. VSMC from SHR have been shown to exhibit enhanced levels of O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Lappas, Daou et al. 2005) and enhanced expression of different subunits of NAD(P)H oxidase such as

p47<sup>phox</sup> and Nox4 (Saha, Li et al. 2008). A role of reactive oxygen species (ROS) causing oxidative stress in growth factor receptor transactivation has been well established (Ushio-Fukai, Griending et al. 2001; Azar, Mehdi et al. 2006; Mbong and Anand-Srivastava 2012). We earlier reported the implication of increased oxidative stress in the transactivation of growth factors receptors in VSMC from SHR (Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011). In the present study, we demonstrate that the enhanced oxidative stress in VSMC from SHR that activate growth factor receptors is attributed to the decreased level of intracellular cAMP because increasing the intracellular levels of cAMP by dbcAMP attenuated the enhanced levels of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, enhanced activity of NAD(P)H oxidase and enhanced expression of p47<sup>phox</sup> and Nox4 protein in VSMC from SHR towards control WKY levels. The role of cAMP in attenuating oxidative stress induced by different interventions has been reported. Cholera toxin that increases intracellular cAMP levels as well as dibutyryl cAMP have been shown to decrease the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> stimulated by parathyroid hormone in bone resorbing osteoclasts (Berger, Horrocks et al. 1998). Similarly, the cAMP elevating agents such as forskolin, IBMX and dbcAMP were shown to decrease 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage in pancreatic  $\beta$  cells (Koh, Suh et al. 2005), whereas dbcAMP was shown to attenuate the production of ROS in granulocytes from normal healthy subjects (Nogueira-Machado, Lima e Silva et al. 2003). In addition, theophylline an inhibitor of cAMP phosphodiesterase was shown to inhibit cadmium-induced lipid peroxidation and oxidative stress in rat submandibular saliva (Abdollahi, Bahreini-Moghadam et al. 2003) as well as diabetes-induced oxidative stress in rats (Milani, Nikfar et al. 2005).

The intervening molecule between oxidative stress and growth factor receptor transactivation was shown to be c-Src because the enhanced phosphorylation of c-Src exhibited by VSMC from SHR was inhibited by N-acetylcysteine (NAC), a scavenger of O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011). We now report that the decreased levels of intracellular cAMP may also be responsible for the enhanced phosphorylation of c-Src in VSMC from SHR because elevating the levels of intracellular cAMP by dbcAMP attenuated the enhanced phosphorylation of c-Src to control levels.

In conclusion, we provide the first evidence that the decreased levels of intracellular cAMP in VSMC from SHR, through increasing oxidative stress, activate c-Src which enhances the activation of growth factor receptors such as EGF-R and PDGF-R. The transactivation of EGF-R and PDGF-R through enhanced activation of ERK1/2, increased the expression of  $G_{i\alpha}$  proteins and  $G_{i\alpha}$  functions in SHR, resulting in decreased levels of cAMP and thereby increasing vascular proliferation and vascular resistance which may contribute to the augmentation of blood pressure in SHR. The decreased levels of intracellular cAMP through the above mentioned signalling mechanisms may then further augment the expression of  $G_{i\alpha}$  proteins (Figure 10), suggesting that the intracellular cAMP through feed-back mechanism may play a regulatory role in the expression of  $G_{i\alpha}$  proteins and vascular proliferation in SHR. However, it needs to be investigated if the decreased levels of intracellular cAMP in SHR precede the augmentation of  $G_{i\alpha}$  protein expression. Nonetheless, it may be suggested that elevating the levels of cAMP in SHR may have protective effect against oxidative stress- induced vascular complications in hypertension.

**Source of fundings:** This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-53074)

**Conflict of interest:** None declared.



## References

1. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
2. Barlow, C.A., et al., *Excitation-transcription coupling in smooth muscle*. J Physiol, 2006. **570**(Pt 1): p. 59-64.
3. Giasson, E., M.J. Servant, and S. Meloche, *Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 26879-86.
4. Assender, J.W., et al., *Inhibition of proliferation, but not of Ca<sup>2+</sup> mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells*. Biochem J, 1992. **288 ( Pt 2)**: p. 527-32.
5. Neer, E.J., *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals*. Cell, 1995. **80**(2): p. 249-57.
6. Bray, P., et al., *Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(23): p. 8893-7.
7. Robishaw, J.D., M.D. Smigel, and A.G. Gilman, *Molecular basis for two forms of the G protein that stimulates adenylate cyclase*. J Biol Chem, 1986. **261**(21): p. 9587-90.
8. Itoh, H., et al., *Presence of three distinct molecular species of Gi protein alpha subunit. Structure of rat cDNAs and human genomic DNAs*. J Biol Chem, 1988. **263**(14): p. 6656-64.
9. Yatani, A., et al., *The G protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel is stimulated by three distinct Gi alpha-subunits*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 680-2.
10. Anand-Srivastava, M.B., *Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats. Relationship to adenylate cyclase inhibition*. Biochem J, 1992. **288 ( Pt 1)**: p. 79-85.
11. Thibault, C. and M.B. Anand-Srivastava, *Altered expression of G-protein mRNA in spontaneously hypertensive rats*. FEBS Lett, 1992. **313**(2): p. 160-4.

12. Kashihara, T., et al., *Chronic receptor-mediated activation of Gi/o proteins alters basal t-tubular and sarcolemmal L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity through phosphatases in heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012.
13. Anand-Srivastava, M.B., *Altered responsiveness of adenylate cyclase to adenosine and other agents in the myocardial sarcolemma and aorta of spontaneously-hypertensive rats*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(15): p. 3017-22.
14. Anand-Srivastava, M.B., S. Picard, and C. Thibault, *Altered expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins (Gi alpha) in spontaneously hypertensive rats*. Am J Hypertens, 1991. **4**(10 Pt 1): p. 840-3.
15. Anand-Srivastava, M.B., J. de Champlain, and C. Thibault, *DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins*. Am J Hypertens, 1993. **6**(1): p. 72-5.
16. Bohm, M., et al., *Desensitization of adenylate cyclase and increase of Gi alpha in cardiac hypertrophy due to acquired hypertension*. Hypertension, 1992. **20**(1): p. 103-12.
17. Ge, C., R. Garcia, and M.B. Anand-Srivastava, *Enhanced expression of G $\alpha$  protein and adenylyl cyclase signaling in aortas from 1 kidney 1 clip hypertensive rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(7): p. 739-46.
18. Marcil, J., C. Thibault, and M.B. Anand-Srivastava, *Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(3): p. 1009-22.
19. Marcil, J., J. de Champlain, and M.B. Anand-Srivastava, *Overexpression of Gi-proteins precedes the development of DOCA-salt-induced hypertension: relationship with adenylyl cyclase*. Cardiovasc Res, 1998. **39**(2): p. 492-505.
20. Li, Y. and M.B. Anand-Srivastava, *Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. Circ Res, 2002. **91**(3): p. 247-54.
21. Boumati, M., Y. Li, and M.B. Anand-Srivastava, *Modulation of ANP-C receptor signaling by arginine-vasopressin in A-10 vascular smooth muscle cells: role of protein kinase C*. Arch Biochem Biophys, 2003. **415**(2): p. 193-202.

22. Palaparti, A., C. Ge, and M.B. Anand-Srivastava, *Angiotensin II enhances the expression of G $\alpha$  in A10 cells (smooth muscle): relationship with adenylyl cyclase activity*. Arch Biochem Biophys, 1999. **365**(1): p. 113-22.
23. Bassil, M. and M.B. Anand-Srivastava, *Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(7): p. 1162-73.
24. Bassil, M. and M.B. Anand-Srivastava, *Cyclic GMP modulates the expression of Gi protein and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells*. Cell Biochem Biophys, 2007. **47**(1): p. 99-108.
25. Boumati, M., Y. Li, and M.B. Anand-Srivastava, *Modulation of ANP-C receptor signaling by endothelin-1 in A-10 smooth muscle cells*. Arch Biochem Biophys, 2002. **401**(2): p. 178-86.
26. Anand-Srivastava, M.B., *Downregulation of atrial natriuretic peptide ANP-C receptor is associated with alterations in G-protein expression in A10 smooth muscle cells*. Biochemistry, 2000. **39**(21): p. 6503-13.
27. Saha, S., et al., *Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of G $\alpha$  protein*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(2): p. 336-44.
28. Anand-Srivastava, M.B., et al., *Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylyl cyclase in cultured vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. **108**(1): p. 213-9.
29. Li, Y., L.O. Levesque, and M.B. Anand-Srivastava, *Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(6): p. H1959-67.
30. Hashim, S., et al., *Streptozotocin-induced diabetes impairs G-protein linked signal transduction in vascular smooth muscle*. Mol Cell Biochem, 2002. **240**(1-2): p. 57-65.

31. Lappas, G., G.B. Daou, and M.B. Anand-Srivastava, *Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 2005. **23**(12): p. 2251-61.
32. Wu, R., et al., *Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats*. J Hypertens, 2001. **19**(4): p. 741-8.
33. Clark, C.J., et al., *Guanine nucleotide regulatory protein levels and function in spontaneously hypertensive rat vascular smooth-muscle cells*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1136**(3): p. 290-6.
34. Saha, S., Y. Li, and M.B. Anand-Srivastava, *Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2008. **86**(4): p. 190-8.
35. Chabrashvili, T., et al., *Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney*. Hypertension, 2002. **39**(2): p. 269-74.
36. Lodi, F., et al., *Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats*. Eur J Pharmacol, 2006. **544**(1-3): p. 97-103.
37. Zalba, G., et al., *Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2000. **35**(5): p. 1055-61.
38. Gomez Sandoval, Y.H. and M.B. Anand-Srivastava, *Enhanced levels of endogenous endothelin-1 contribute to the over expression of Gialpha protein in vascular smooth muscle cells from SHR: Role of growth factor receptor activation*. Cell Signal, 2011. **23**(2): p. 354-62.
39. Sandoval, Y.H., Y. Li, and M.B. Anand-Srivastava, *Transactivation of epidermal growth factor receptor by enhanced levels of endogenous angiotensin II contributes to the overexpression of Gialpha proteins in vascular smooth muscle cells from SHR*. Cell Signal, 2011. **23**(11): p. 1716-26.

40. Mbong, N. and M.B. Anand-Srivastava, *Hydrogen Peroxide Enhances the Expression of G $\alpha$  proteins in Aortic Vascular Smooth Cells: Role of Growth Factor Receptor Transactivation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012.
41. Li, Y. and M. Anand-Srivastava, *Implication of multiple signaling pathways in the regulation of angiotensin II-induced enhanced expression of G $\alpha$  proteins in vascular smooth muscle cells*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **in press**.
42. Cho-Chung, Y.S., *Role of cyclic AMP receptor proteins in growth, differentiation, and suppression of malignancy: new approaches to therapy*. Cancer Res, 1990. **50**(22): p. 7093-100.
43. Dumont, J.E., J.C. Jauniaux, and P.P. Roger, *The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation*. Trends Biochem Sci, 1989. **14**(2): p. 67-71.
44. Pastan, I.H., G.S. Johnson, and W.B. Anderson, *Role of cyclic nucleotides in growth control*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 491-522.
45. Li, Y., G. Lappas, and M.B. Anand-Srivastava, *Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of G $\alpha$  proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(4): p. H1922-30.
46. Gomez Sandoval, Y.H., L.O. Levesque, and M.B. Anand-Srivastava, *Contribution of epidermal growth factor receptor transactivation in angiotensin II-induced enhanced expression of G $\alpha$  protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells*. Can J Physiol Pharmacol, 2009. **87**(12): p. 1037-45.
47. Severson, B.R., X. Kong, and J.C. Lawrence, Jr., *Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10305-9.
48. Graves, L.M., et al., *Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10300-4.
49. Wu, J., et al., *Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate*. Science, 1993. **262**(5136): p. 1065-9.

50. Liu, L., et al., *Lentiviral-Mediated shRNA Silencing of PDE4D Gene Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-Induced Proliferation and Migration of Rat Aortic Smooth Muscle Cells*. *Stroke Res Treat*, 2011. **2011**: p. 534257.
51. Ushio-Fukai, M., et al., *Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(4): p. 489-95.
52. Azar, Z.M., M.Z. Mehdi, and A.K. Srivastava, *Activation of insulin-like growth factor type-1 receptor is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PKB phosphorylation in vascular smooth muscle cells*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006. **84**(7): p. 777-86.
53. Berger, C.E., B.R. Horrocks, and H.K. Datta, *cAMP-dependent inhibition is dominant in regulating superoxide production in the bone-resorbing osteoclasts*. *Journal of Endocrinology*, 1998. **158**(3): p. 311-8.
54. Koh, G., et al., *Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative damage in pancreatic beta-cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2005. **438**(1): p. 70-9.
55. Nogueira-Machado, J.A., et al., *Modulation of the reactive oxygen species (ROS) generation mediated by cyclic AMP-elevating agents or Interleukin 10 in granulocytes from type 2 diabetic patients (NIDDM): a PKA-independent phenomenon*. *Diabetes Metab*, 2003. **29**(5): p. 533-7.
56. Abdollahi, M., et al., *Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2003. **135C**(3): p. 331-6.
57. Milani, E., et al., *Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2005. **140**(2): p. 251-

## Figure legends

**Figure 1. Effect of various concentrations of dbcAMP on the levels of Gi $\alpha$ -2 and Gi $\alpha$ -3 proteins in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and WKY were incubated in the absence (control) or presence of dbcAMP (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) for 16 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against Gi $\alpha$ -2(A) and Gi $\alpha$ -3(B) as described in Materials and methods. The protein bands were quantified by densitometric scanning. The results are expressed as ratio of Gi protein/Dynein of WKY taken as 100%. Values are means $\pm$ SE of four separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs WKY ctl and #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs SHR ctl.

**Figure 2. Effect of dbcAMP on hormonal inhibition of adenylyl cyclase activity in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and age-matched WKY were incubated in the absence or presence of 0.5 mM of dbcAMP for 16 h. Membranes were prepared as described in Materials and methods. Adenylyl cyclase activity was determined in the presence of 10 $\mu$ M GTP $\gamma$ S alone, taken as 100%, or in combination with 10  $\mu$ M Angiotensin II (Ang II), 0,1  $\mu$ M [des(Glu<sup>18</sup>,Ser<sup>20</sup>,Gly<sup>22</sup>,Leu<sup>21</sup>) atrial natriuretic peptide<sub>4-23</sub>-NH<sub>2</sub>] (C-ANP<sub>4-23</sub>), or 50 $\mu$ M oxotremorine as described previously. Values are means $\pm$ SE of five separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs WKY ctl and #P<0.05, ###P<0.001 vs SHR ctl.

**Figure 3. Effect of dbcAMP on GTP $\gamma$ S-mediated inhibition of forskolin (FSK)-stimulated adenylyl cyclase activity in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and age-matched WKY were incubated in the absence or presence of 0.5 mM of dbcAMP for 16 h. Membranes were prepared as described in Materials and methods. Adenylyl cyclase activity was determined in these membranes in the presence of 100  $\mu$ M FSK alone, taken as 100%, and in presence of various concentrations of GTP $\gamma$ S (10<sup>-12</sup> to 10<sup>-7</sup> M) as described previously. Values are means $\pm$ SE of three separate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs WKY ctl and #P<0.05, ##P<0.01 vs SHR ctl.

**Figure 4. Effect of dbcAMP on thymidine incorporation and cell number in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and age-matched WKY were incubated in the absence or presence of 0.5 mM of dbcAMP and 100 $\mu$ M of forskolin for 16 h. Thymidine incorporation (A) and cell number (B) were determined as described in Materials and methods. Results are expressed as % of WKY control (taken as 100%). Values are means $\pm$ SE of four separate experiments. \*\*\*P<0.001 vs WKY ctl and ###P<0.001 vs SHR ctl.

**Figure 5. Effect of dbcAMP on superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production and NAD(P)H oxidase activity in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and WKY were incubated in the absence (control) or presence of dbcAMP (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) for 16 h and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production (A) and oxidase activity (B) were determined as described in Materials and methods. The results are expressed as percentage of CTL, taken as 100%. Values are means $\pm$ SE of three separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs WKY ctl and #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs SHR ctl.

**Figure 6. Effect of various concentrations of dbcAMP on the levels of Nox 4 and p47<sup>phox</sup> proteins in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and WKY were incubated in the absence or presence of dbcAMP (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) for 16 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against Nox 4 (A) and p47<sup>phox</sup> (B) as described in Materials and methods. The protein bands were quantified by densitometric scanning. The results are expressed as ratio of Nox 4/Dynein and p47<sup>phox</sup>/Dynein of WKY taken as 100%. Values are means $\pm$ SE of five separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs WKY ctl and #P<0.05, ##P<0.01 vs SHR ctl.

**Figure 7. Effect of various concentrations of dbcAMP on EGF-R and PDGF-R phosphorylation in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and WKY were incubated in the absence (control) or presence of dbcAMP (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) for 16 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against phosphorylated EGF-R (A) and PDGF-R (B) as described in Materials and methods. The protein bands were quantified by densitometric



scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means±SE of four separate experiments. \*P<0.05 vs WKY ctl and #P<0.05 vs SHR ctl.

**Figure 8. Effect of various concentrations of dbcAMP on c-Src phosphorylation in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and WKY were incubated in the absence or presence of dbcAMP (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) for 16 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against phosphorylated c-Src as described in Materials and methods. The protein bands were quantified by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means±SE of five separate experiments. \*\*\*P<0.001 vs WKY ctl and ##P<0.01, ###P<0.001 vs SHR ctl.

**Figure 9. Effect of various concentrations of dbcAMP on ERK1/2 phosphorylation in VSMC from 12-weeks old SHR and age-matched WKY.** VSMC from SHR and WKY were incubated in the absence (control) or presence of dbcAMP (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) for 16 h. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using specific antibodies against phosphorylated ERK1/2 as described in Materials and methods. The protein bands were quantified by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means±SE of four separate experiments. \*\*P<0.01 vs WKY ctl and #P<0.05, ##P<0.01 vs SHR ctl.

**Figure 10.** Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which decreased intracellular cAMP in VSMC from SHR increase the expression of  $G\alpha$ -2 and  $G\alpha$ -3 proteins and cellular proliferation in VSMC from SHR

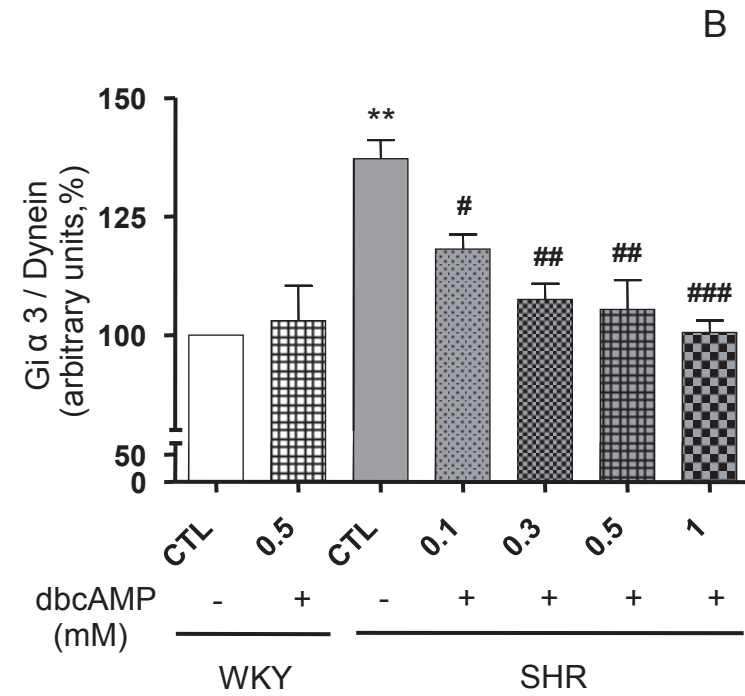
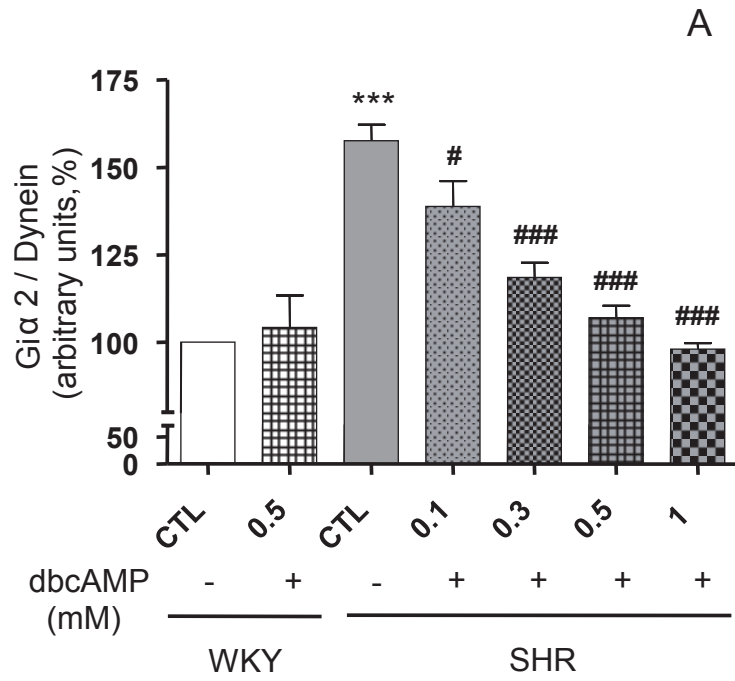
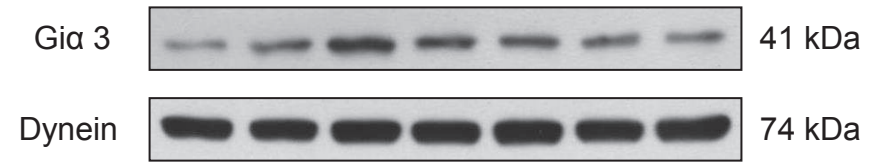
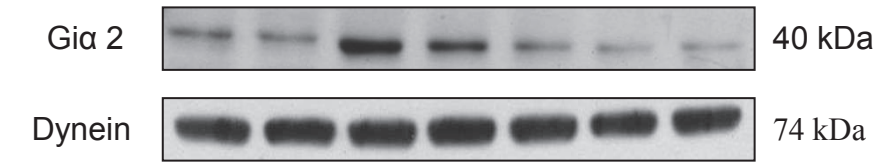


Figure 1

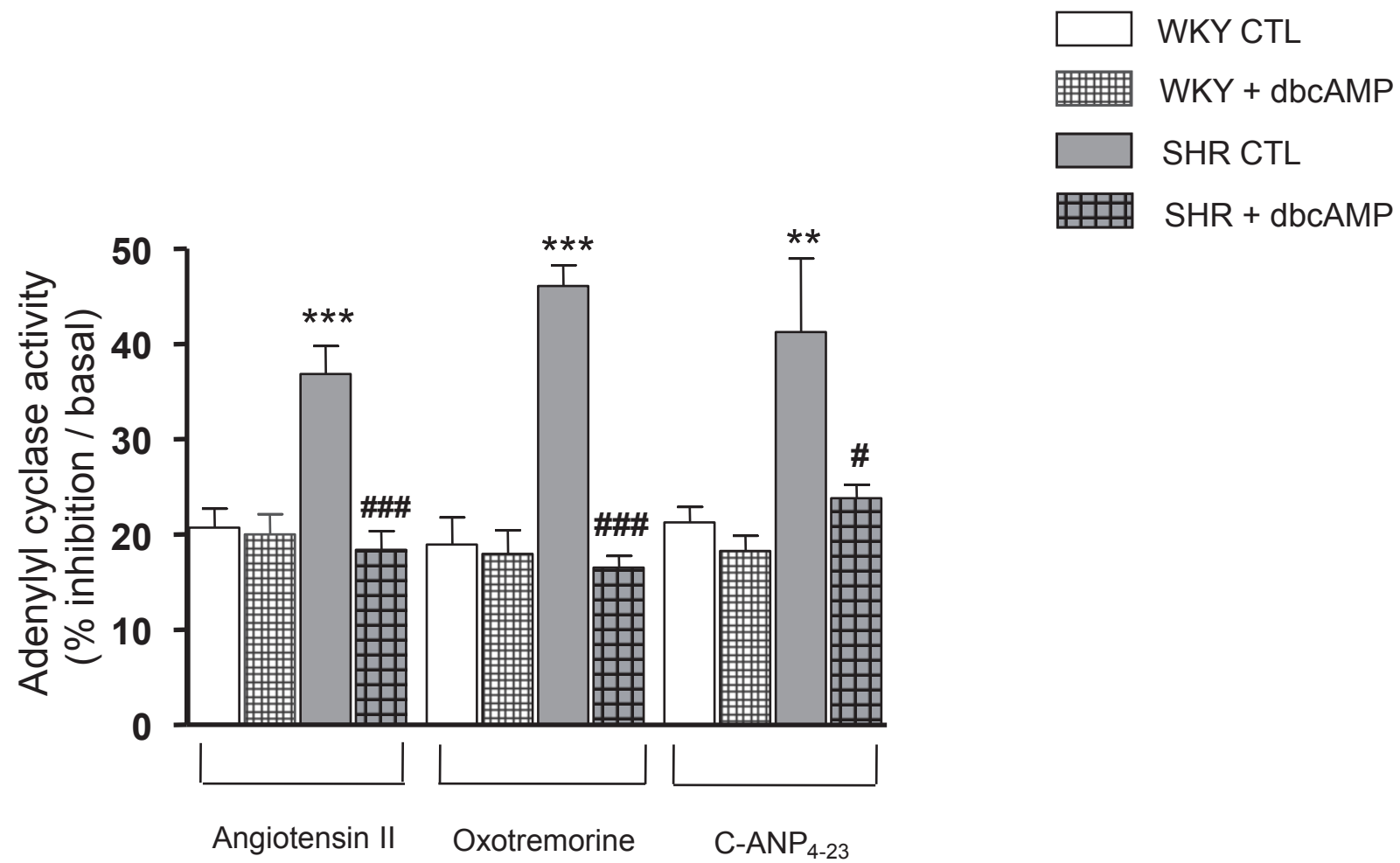


Figure 2

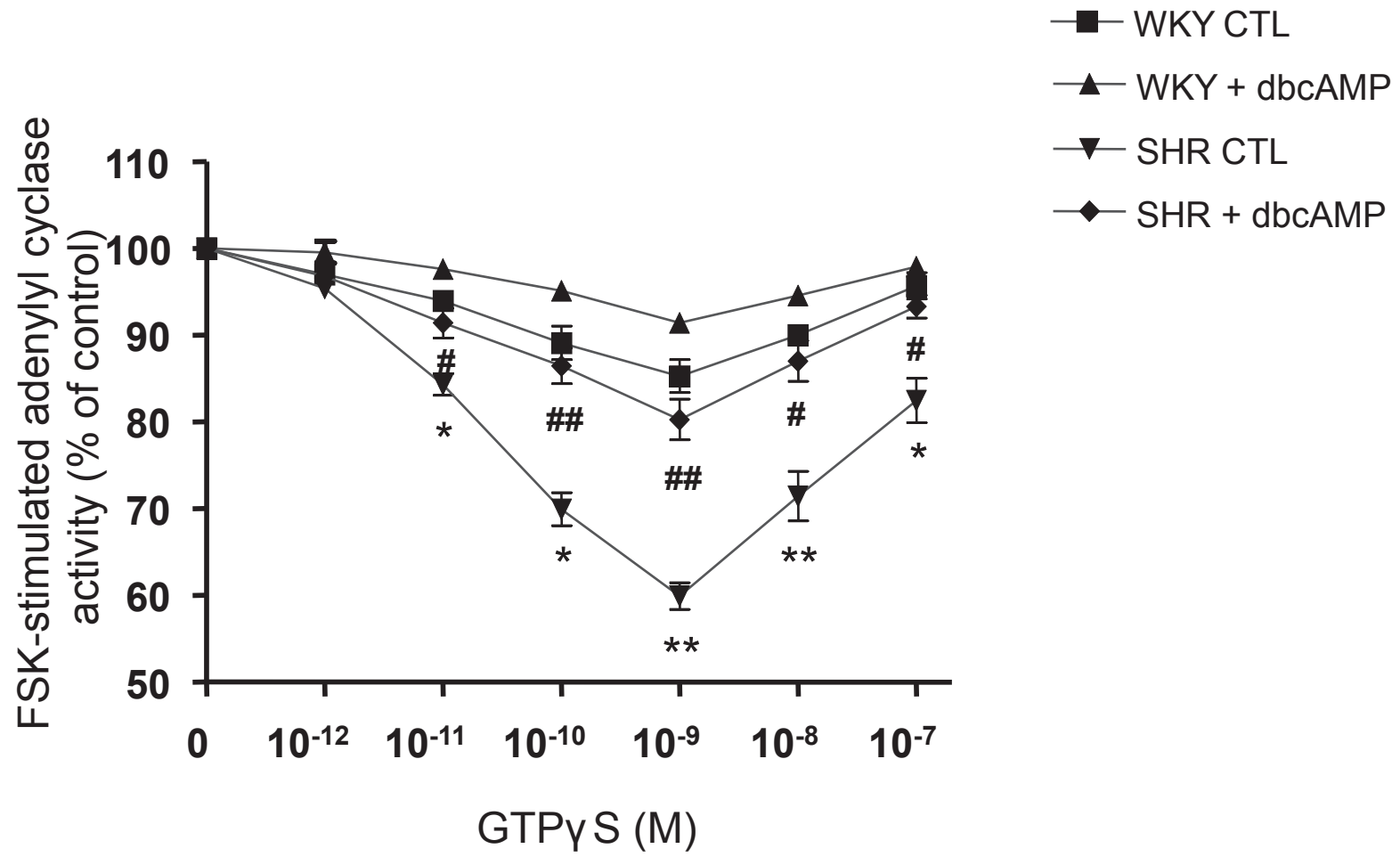


Figure 3

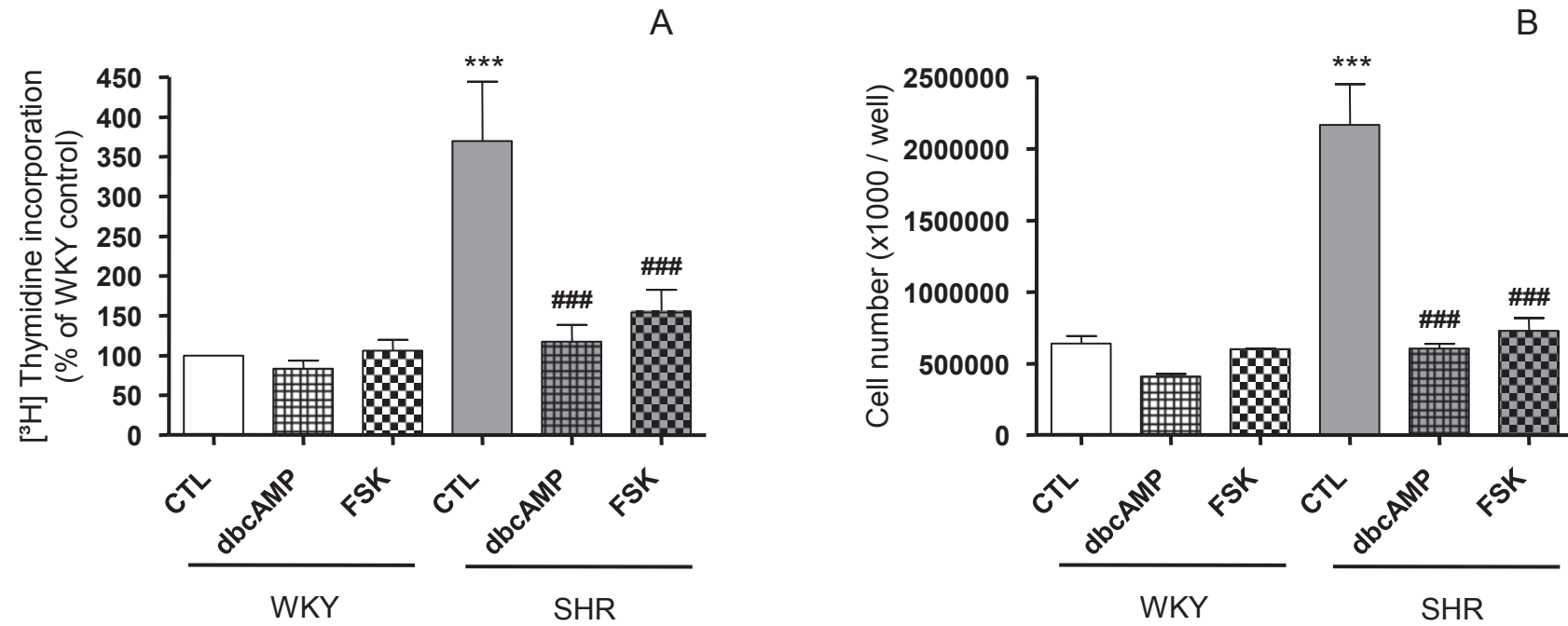
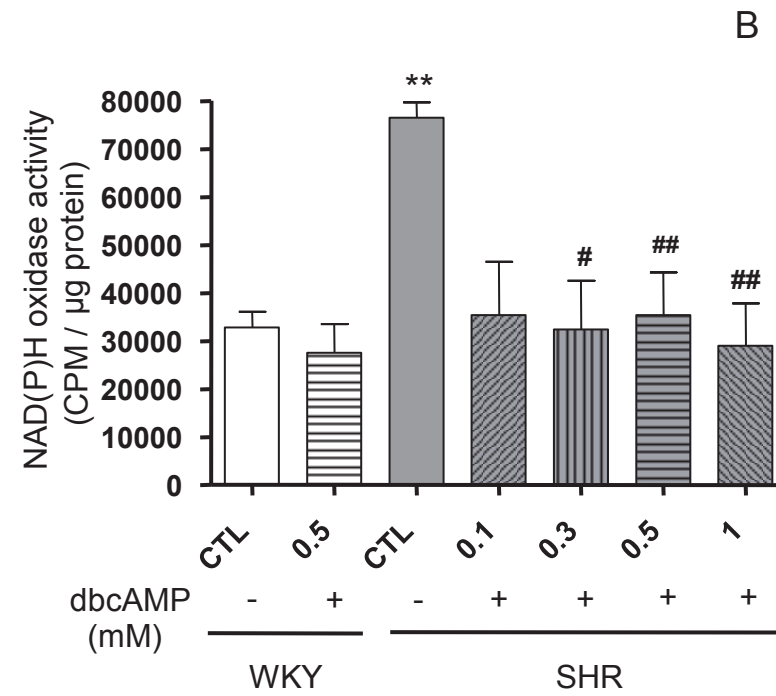
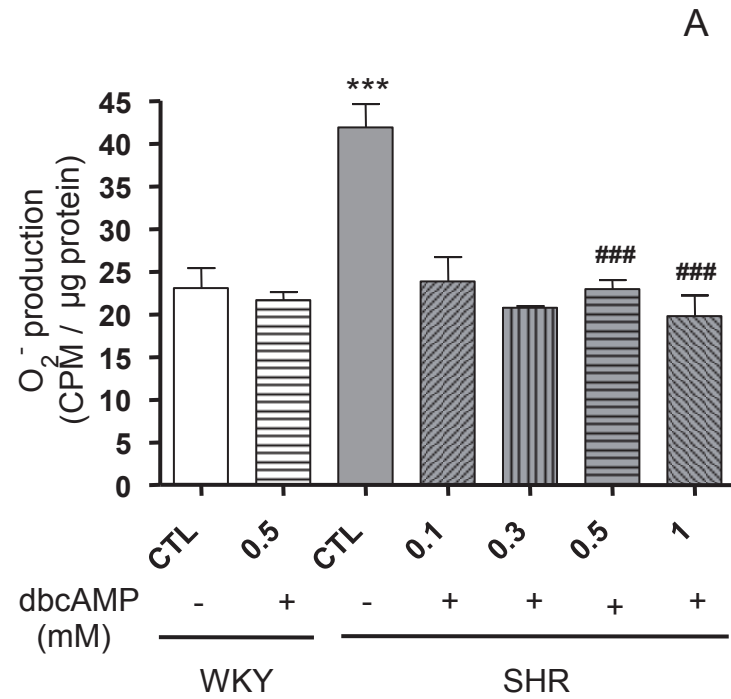
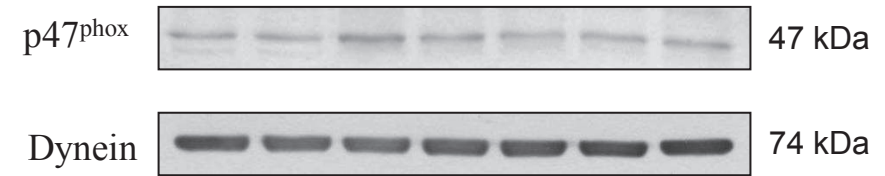
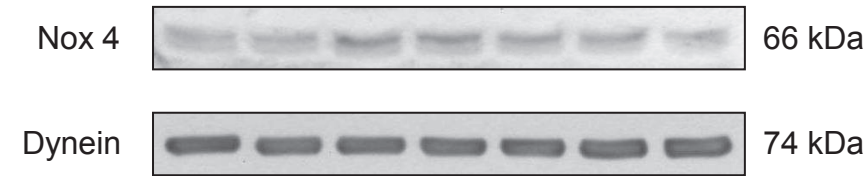


Figure 4



$\mu$

Figure 5



A

B

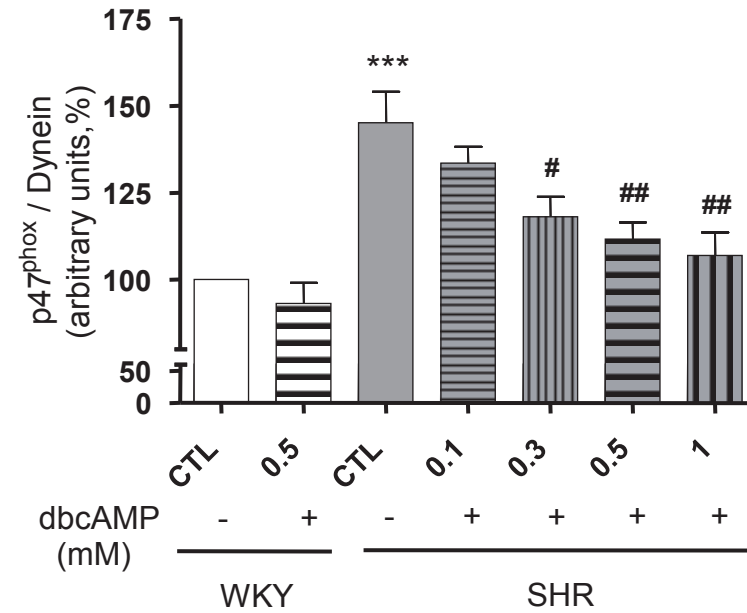
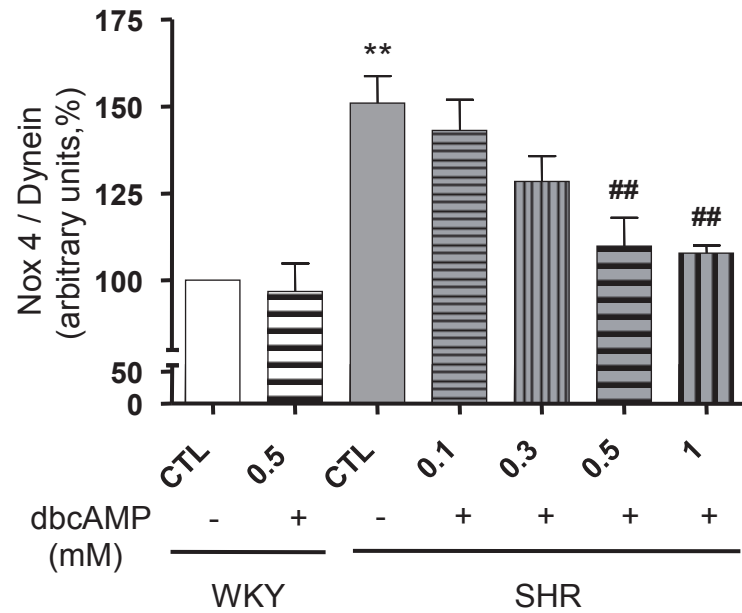


Figure 6

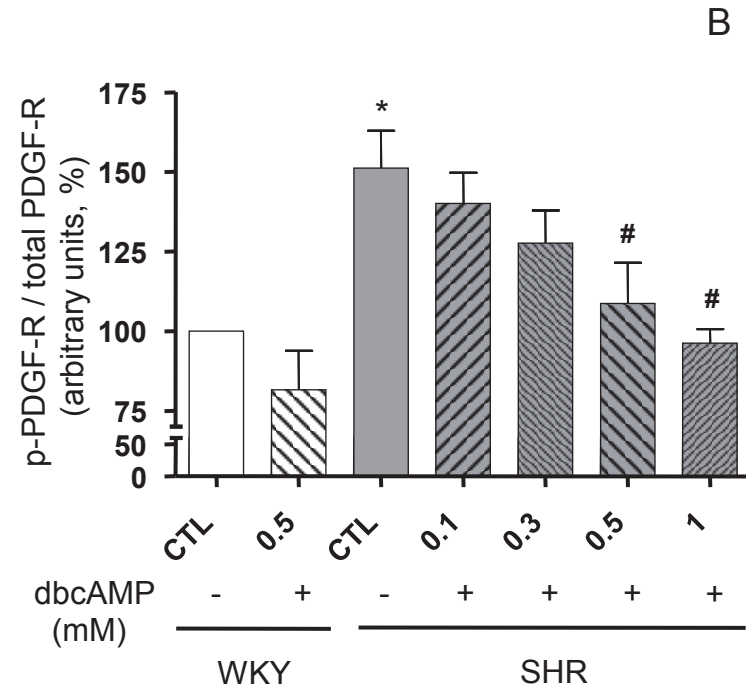
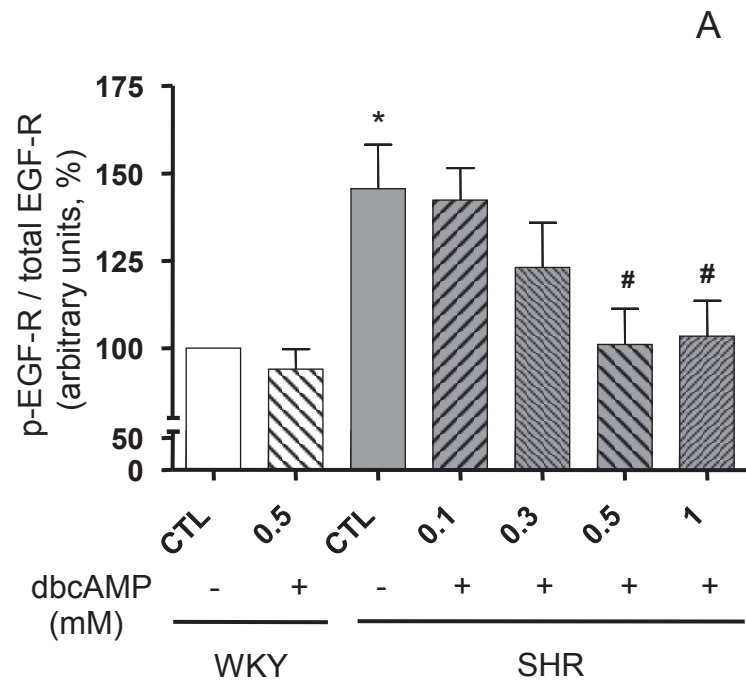
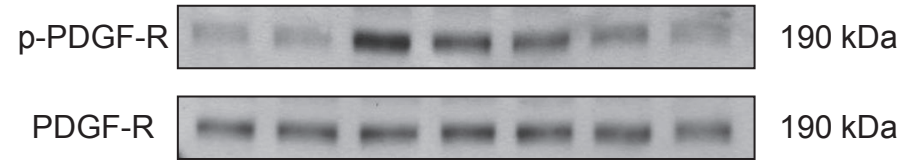
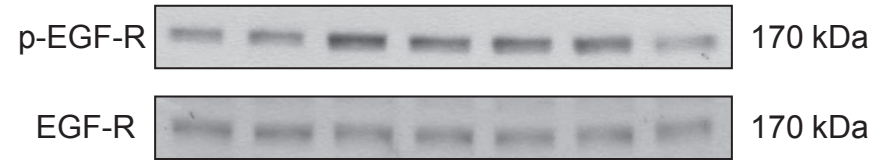


Figure 7



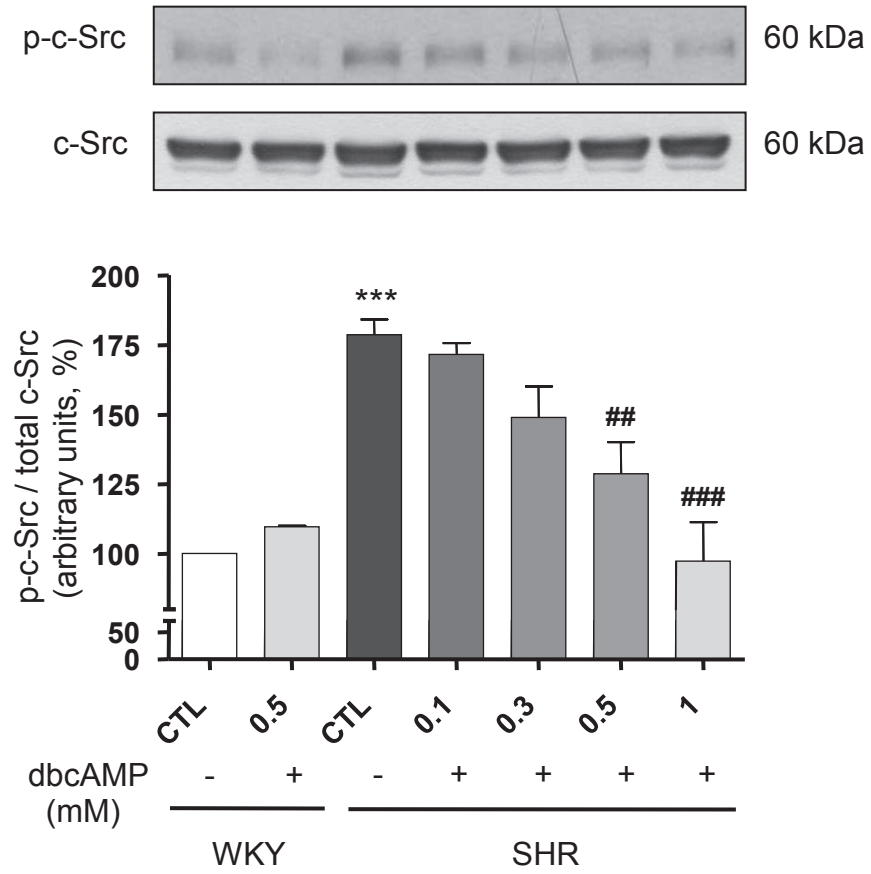


Figure 8

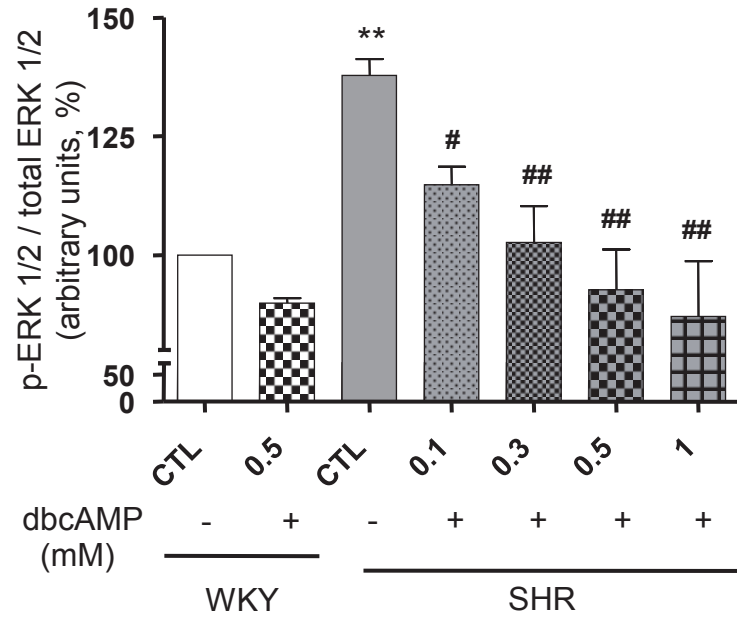
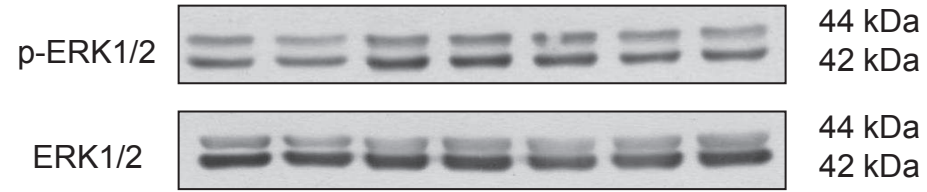


Figure 9

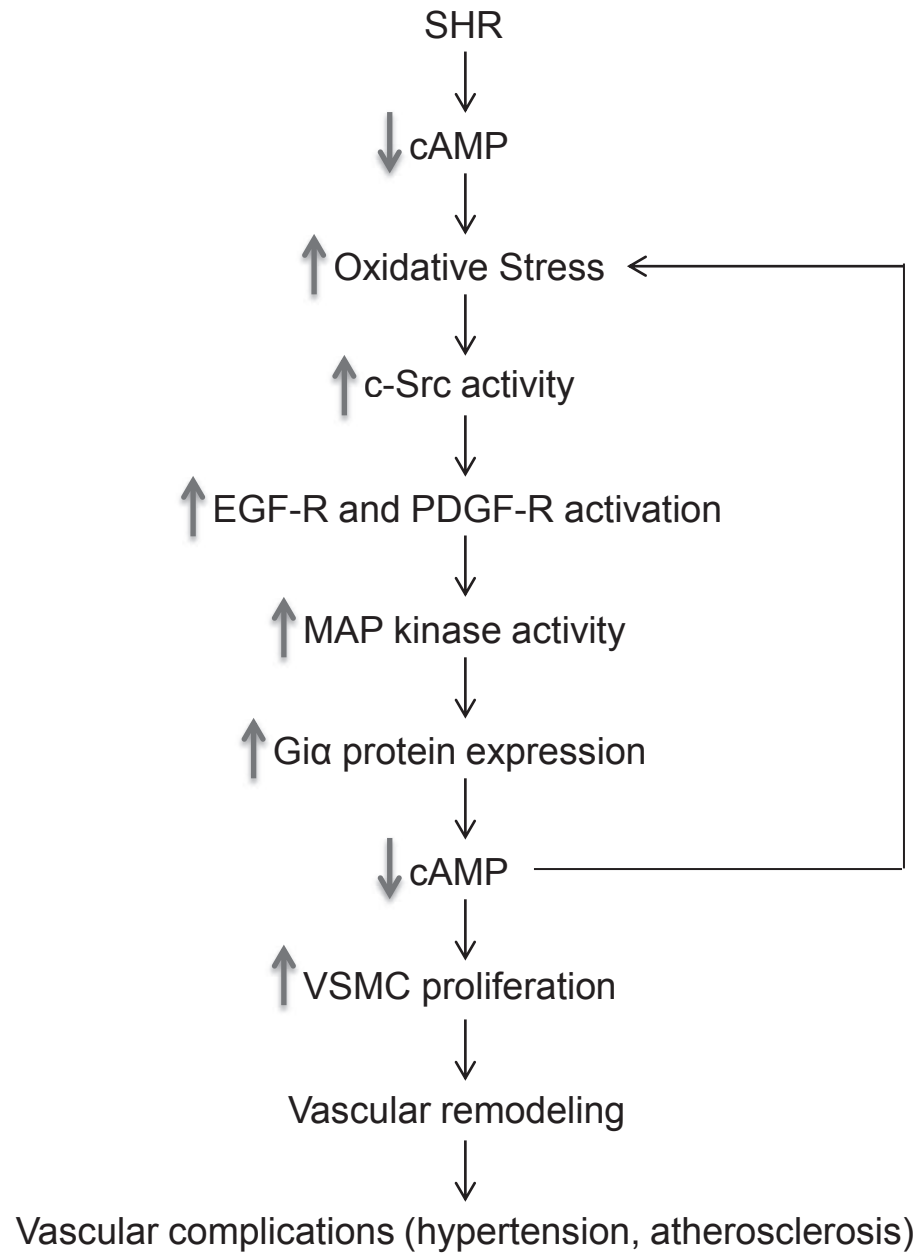


Figure 10

## **CHAPITRE 3**

# **DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

## 1 DISCUSSION

L'élévation de la résistance totale des vaisseaux sanguins périphériques joue un rôle primordial dans l'augmentation de la pression artérielle et le développement de la maladie hypertensive (Guyton, Coleman et al. 1972). La cause du renforcement de la résistance périphérique a été attribuée aux plusieurs facteurs dont les changements structuraux dans les vaisseaux sanguins (Folkow, Hallback et al. 1973), les anomalies dans les mouvements du calcium (Vanhoutte and Leusen 1981) et les aberrations dans le métabolisme des nucléotides cycliques (Amer 1975). L'augmentation de la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire est un élément clé dans la pathophysiologie de la réorganisation structurale des vaisseaux et est à l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires dont la resténose, l'athérosclérose et l'hypertension (Liu, Roubin et al. 1989; Libby and Tanaka 1994; Intengan and Schiffrin 2000). Les CMLV des rats spontanément hypertendus (SHR), un modèle génétique d'hypertension artérielle, manifestent un taux de prolifération élevé par rapport au CMLV des rats témoins (WKY). (Resink, Scott-Burden et al. 1987; Paquet, Baudouin-Legros et al. 1989; Li Y 2005)

Les protéines Gi, des protéines hétérotrimériques assemblées aux récepteurs couplées aux protéines G (RCPG) et dont le rôle est d'inhiber l'adénylate cyclase (AC) et la synthèse de l'AMPc sont augmentées dans les CMLV des SHR (Anand-Srivastava 1992), dans les modèles expérimentaux d'hypertension (Anand-Srivastava, de Champlain et al. 1993) ainsi que dans les fibroblastes cutanés des individus hypertendus (Baritono, Ceolotto et al. 2004). L'inhibition des protéines Gi avec la toxine pertussique dans les rats SHR préhypertendus a retardé le développement de l'hypertension (Li and Anand-Srivastava 2002) ainsi qu'a diminué la résistance périphérique totale dans les SHR avec l'hypertension établie (Berg, Degerman et al. 2009). Le traitement des CMLV des SHR avec la toxine pertussique a aussi renversé leur taux de prolifération accru vers le niveau des SMLV des rats témoins (Li Y 2005). Le niveau d'AMPc est apparu plus faible dans les CMLV des SHR (Anand-Srivastava 1992) et l'effet de l'isoprotérénol sur l'accumulation d'AMPc a été diminué dans les lymphocytes des individus hypertendus (Yoshikawa, Fukuda et al. 1994). Dans cette étude, nous montrons que le niveau réduit d'AMPc dans les CMLV des SHR peut contribuer à l'augmentation de l'expression des protéines Gi et à la prolifération accrue à travers la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance.

Nos résultats montrent que dans les CMLV des SHR le niveau des  $G_{i\alpha-2}$  et  $G_{i\alpha-3}$  est augmenté d'environ 55% et 45% respectivement par rapport aux rats témoins et le traitement avec du dibutyryladénosine 3',5'-monophosphate cyclique (dbcAMP), un analogue de l'AMPc perméable à la membrane cellulaire diminue d'une manière dépendante de la concentration l'expression accrue des  $G_{i\alpha-2}$  et  $G_{i\alpha-3}$  jusqu'au niveau de WKY. Par contre, le traitement avec du dbcAMP n'a eu aucun effet sur l'expression des protéines  $G_i$  dans les rats témoins. Pour relier l'expression et les fonctions des protéines  $G_i$ , nous avons étudié les effets inhibiteurs de l'Ang II, l'oxotremorine et le C-ANP<sub>4-23</sub> ainsi que l'inhibition de l'activité de l'AC stimulée par la forskoline (FSK) par des concentrations basses de GTP $\gamma$ S. Dans les CMLV des SHR, l'inhibition de l'AC par l'Ang II, l'oxotremorine et le C-ANP<sub>4-23</sub> est augmentée d'environ 100% comparativement aux CMLV des WKY. Un traitement au dbcAMP renverse cette inhibition pour atteindre le niveau des cellules contrôles. De plus, en présence du GTP $\gamma$ S, l'activité de l'AC induite par la forskoline est inhibée de façon plus accrue dans les CMLV de SHR par rapport aux WKY et cela est renversé par le dbcAMP. Ces résultats nous suggèrent que le niveau intracellulaire réduit d'AMPc peut être responsable de l'augmentation de l'expression et des fonctions des protéines  $G_i$  dans les CMLV des rats SHR. D'autres études appuient également cette hypothèse. Ces études ont démontré que l'augmentation de l'expression des protéines  $G_i$  induite par l'Ang II ainsi que la synthèse protéique totale stimulée par l'Ang II dans les CML de l'aorte de rat sont diminuées par l'augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc (Giasson, Servant et al. 1997; Li and Anand-Srivastava 2012)

Le rôle de l'AMPc dans la prolifération des cellules est bien documenté dans la littérature. Il a été démontré que l'AMPc augmente la prolifération des thyrocytes, des hépatocytes, des cellules épithéliales et des keratinocytes tandis qu'il diminue la prolifération d'autres types de cellules parmi lesquelles sont les cellules du muscle lisse et les fibroblastes (Pastan, Johnson et al. 1975; Dumont, Jauniaux et al. 1989; Cho-Chung 1990). L'inhibition de la prolifération cellulaire par l'AMPc a été attribuée à l'activation des MAP kinases dépendantes de Ras (Cook and McCormick 1993; Wu, Dent et al. 1993). Dans la présente étude, nous avons démontré que l'augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc par le dbcAMP et la forskoline atténue la prolifération accrue des CMLV de SHR déterminée par l'incorporation de la thymidine ainsi que par le décompte

du nombre des cellules. Nos résultats sont en accord avec les études d'autres chercheurs qui ont également signalé l'inhibition de la synthèse des protéines stimulée par l'Ang II via l'élévation du niveau intracellulaire d'AMPc dans les CML de l'aorte de rat, sans affecter le taux de synthèse protéique de base (Giasson, Servant et al. 1997).

Nous voulons également déterminer les mécanismes intracellulaires responsables de la diminution de l'expression et des fonctions des protéines Gi ainsi que les mécanismes qui contribuent au rôle antiprolifératif de l'AMPc. Ces processus apparaissent être associés à l'activation de la voie de la MAP kinase parce que le dbcAMP, qui inhibe l'expression augmentée des protéines Gi et la prolifération accrue des CMLV des SHR, atténue également la phosphorylation plus importante d'ERK1/2 d'une manière dépendante de la concentration. L'implication d'ERK1/2 dans l'augmentation de l'expression des protéines Gi et de la prolifération des CMLV a été antérieurement démontrée (Li, Lappas et al. 2007; Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011). De plus, le PKA, l'effecteur principal de la signalisation de l'AMPc, a empêché l'activation de la cascade MAPK/ERK dans de nombreux types cellulaires y compris les CML artérielles humaines (Cook and McCormick 1993; Graves, Bornfeldt et al. 1993; Severson, Kong et al. 1993). En outre, l'inhibition de la phosphodiesterase 3A, une enzyme qui dégrade l'AMPc, a supprimé la prolifération des CMLV murines via l'inhibition de la signalisation de la MAPK (Begum, Hockman et al. 2011).

Nous avons précédemment démontré que le blocage d'EGF-R, IGF-1R et de PDGF-R par des inhibiteurs spécifiques et l'empêchement de la synthèse d'EGF-R par le siRNA ont restauré l'expression augmentée des protéines Gi et la prolifération accrue des CMLV de SHR jusqu'au niveau contrôle, ce qui suggère l'implication des récepteurs des facteurs de croissance dans l'expression augmentée de protéines Gi et la prolifération accrue des cellules musculaires lisses vasculaires de SHR (Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011). Les résultats de cette étude révèlent que l'augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc par le dbcAMP rétablit d'une manière dépendante de la concentration la phosphorylation plus importante d'EGF-R et de PDGF-R dans les CMLV de SHR vers le niveau de rat contrôle. Ce constat suggère le rôle de la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance dans les mécanismes sous-jacents par lesquels le niveau intracellulaire diminué d'AMPc augmente l'expression des protéines

Gi et la prolifération des CMLV de SHR. Ces résultats sont en accord avec les études d'autres chercheurs qui ont également fait état de l'atténuation de l'activité de PDGF-R, FGF-R et EGF-R par des agents qui augmentent le niveau d'AMPc (Barbier, Poppleton et al. 1999; Bayatti and Engele 2002; Liu, Xu et al. 2011).

Nous avons également examiné les mécanismes de signalisation intracellulaire qui conduisent à la transactivation d'EGF-R et de PDGF-R dans les CMLV de SHR. Nous avons signalé plus tôt que l'augmentation du stress oxydatif intracellulaire est impliquée dans la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance dans les CMLV (Mbong and Anand-Srivastava 2012). Les résultats de cette étude montrent que l'augmentation du niveau d'AMPc intracellulaires via le dbcAMP atténue le niveau plus élevé d' $O_2^-$  dans les CMLV de SHR vers les niveaux de WKY, ce qui suggère l'implication de la baisse du niveau intracellulaire d'AMPc dans l'augmentation du stress oxydatif dans les CMLV de SHR. En outre, dbcAMP a également normalisé l'expression renforcée des protéines p47<sup>phox</sup> et Nox4 et l'augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase dans les CMLV de SHR vers le niveau des cellules contrôles. Nos résultats sont en accord avec les études d'autres groupes de recherche qui ont démontré que l'augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc diminue le stress oxydatif induit par le cadmium dans la salive submandibulaire de rat et que les inhibiteurs de la phosphodiesterase diminuent le stress oxydatif induit par le diabète (Abdollahi, Bahreini-Moghadam et al. 2003; Milani, Nikfar et al. 2005).

Des études antérieures ont également montré la contribution du stress oxydatif dans la phosphorylation du c-Src induite par l'Ang II dans les CMLV (Ushio-Fukai, Griendling et al. 2001). Le rôle du c-Src dans l'activation de PDGF-R et d'IGF-1R ainsi que dans l'augmentation de l'expression des protéines Gi et de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires de SHR a également été signalé (Li, Levesque et al. 2010; Gomez Sandoval and Anand-Srivastava 2011; Sandoval, Li et al. 2011). Nos résultats montrent que le dbcAMP atténue d'une manière dépendante de la concentration la phosphorylation accrue de c-Src vers les niveaux de WKY en suggérant l'implication de la baisse du niveau intracellulaire d'AMPc dans la phosphorylation accrue de c-Src.

En conclusion, nous fournissons la première preuve que le niveau intracellulaire réduit d'AMPc dans les CMLV de SHR, à travers l'augmentation du stress oxydatif, stimule le c-Src et, par conséquent, augmente l'activité d'EGF-R et de PDGF-R. L'activation



intensifiée d'EGF-R et de PDGF-R, via le renforcement de l'activation d'ERK1/2 augmente l'expression et les fonctions des protéines Gi, résultant en une diminution du niveau intracellulaire d'AMPc. La conséquence de la diminution du taux intracellulaire d'AMPc et l'augmentation de la prolifération vasculaire et de la résistance vasculaire, sont des facteurs qui peuvent contribuer à l'augmentation de la pression artérielle chez les rats SHR. Même si les protéines Gi sont en amont de l'AMPc dans la voie de signalisation de l'adénylate cyclase/AMPc et inhibent la production de ce messenger second, il y a d'autres mécanismes qui contrôlent la production de l'AMPc, tels que l'AC soluble stimulée par le bicarbonate, les phosphodiesterases et l'inhibition de l'AC membranaire par les tyrosine kinases d'une manière indépendante des protéines Gi. Il est possible qu'une fonction défectueuse d'un de ces mécanismes provoque la diminution du niveau intracellulaire d'AMPc avant que les protéines Gi commencent à augmenter. Des études supplémentaires pour vérifier cette hypothèse sont nécessaires.

## 2 CONCLUSIONS

Nous avons démontré que le traitement des CMLV des rats SHR avec du dbcAMP, un analogue de l'AMPc perméable à la membrane, a diminué d'une manière dose-dépendante l'expression des protéines  $G_{i\alpha-2}$  et  $G_{i\alpha-3}$  ainsi que la prolifération accrue des CMLV des rats SHR. La diminution de l'expression des protéines Gi après le traitement avec le dbcAMP s'est traduite aussi par une diminution des fonctions médiées par les protéines Gi. De plus, le dbcAMP a réduit d'une manière dépendante de la concentration le taux de phosphorylation des PDGF-R et EGF-R ainsi que le taux de phosphorylation d'ERK1/2 qui sont élevés dans les CMLV des rats SHR. L'effet du dbcAMP sur les récepteurs de facteurs de croissance pourrait être accompli à travers une diminution de leur activation par le stress oxydatif augmenté dans le CMLV des SHR, car dbcAMP a diminué d'une manière dépendante de concentration l'expression des sous-unités de la NAD(P)H oxydase, le Nox4 et le  $p47^{\text{phox}}$  ainsi que l'activité de la NAD(P)H oxydase et la production d' $O_2^-$ . Le taux d'expression élevé du c-Src est aussi diminué d'une manière dépendante de concentration par le dbcAMP dans les CMLV des SHR. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc diminue l'expression et les fonctions des protéines Gi ainsi

que la prolifération accrue des CMLV des SHR en diminuant la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance par le stress oxydatif et par une régulation négative de l'activité de la voie signalétique de la MAP kinase.

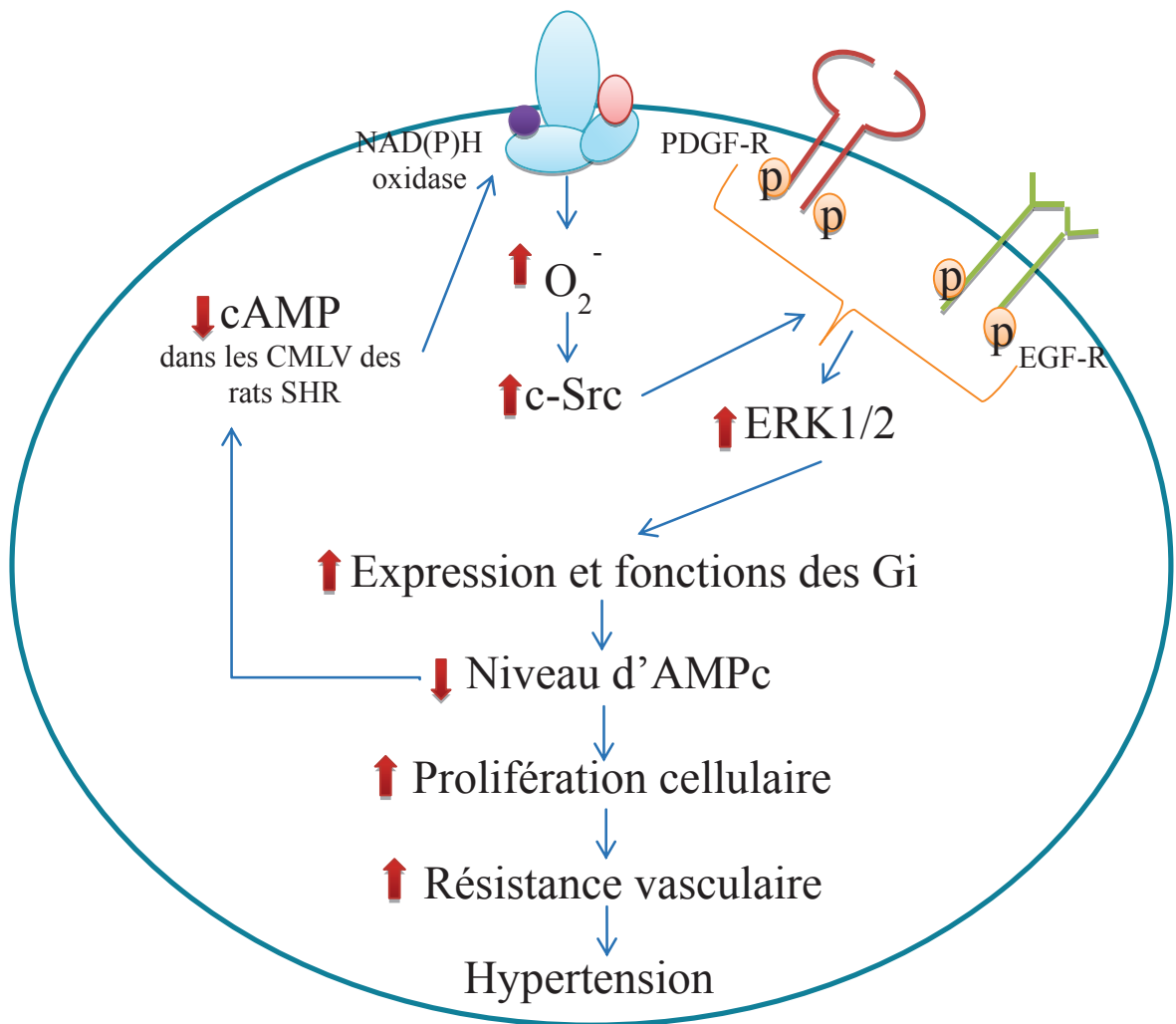


Figure 3.1: Schéma intégratif des conclusions

### 3 PERSPECTIVES

Cette recherche a mis en lumière le rôle de l'AMPc dans l'expression et les fonctions des protéines Gi ainsi que dans la prolifération des CMLV associée au remodelage vasculaire et à l'hypertension artérielle. Plusieurs points restent cependant à être éclaircis. Premièrement, on voudrait savoir le moment quand ce mécanisme de feedback négatif s'active. Est-il le mécanisme principal qui déclenche l'augmentation des protéines Gi ou c'est un mécanisme auxiliaire qui s'active plus tard quand l'expression de ces protéines est déjà haute et qui aide à maintenir cette augmentation. On sait que les protéines Gi qui inhibent l'AC liée à la membrane sont un des facteurs importants qui diminuent le niveau intracellulaire d'AMPc. Mais, outre cela, il y a d'autres éléments qui régulent les taux d'AMPc tels que les phosphodiésterases, l'AC soluble activée par le bicarbonate, l'activation ou l'inhibition de l'AC liée à la membrane par les tyrosine kinases indépendamment des protéines G (Buck, Sinclair et al. 1999; Tan, Kelvin et al. 2001; Adderley, Sprague et al. 2010; Tresguerres, Levin et al. 2011). Il se peut que le niveau d'AMPc dans les CMLV des SHR diminue avant que les protéines Gi augmentent, et ce, à cause de l'hyperactivation des phosphodiésterases ou à cause de l'inhibition de l'AC soluble. Cette diminution du taux d'AMPc en augmentant le niveau des ERO et en transactivant les RFC pourrait provoquer une augmentation de la synthèse des protéines Gi qui à leur tour inhibent l'AC liée à la membrane et diminuent plus le taux d'AMPc intracellulaire créant ainsi un cercle vicieux qui maintient le niveau augmenté des protéines Gi. Pour tester cette hypothèse il faudrait mesurer le niveau d'AMPc dans les CMLV des SHR nouveau-nés et âgés d'une semaine avant que les protéines Gi commencent à augmenter, phénomène observé à l'âge de deux semaines chez les SHR (Marcil, Thibault et al. 1997). Si le taux d'AMPc s'avérera diminué à cet âge, il faudra tester l'activité des phosphodiésterases et de l'AC soluble dans cette catégorie de rats. De plus il faudrait étudier l'implication d'autres voies de signalisation dans la diminution de la surexpression des protéines Gi et de la prolifération accrue des CMLV par l'augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc. Dans cette étude nous avons montré l'implication des EGF-R, PDGF-R et celle de la voie signalétique d'ERK1/2, il serait toutefois intéressant de déterminer l'implication de la voie d'AKT/PI3-K. Des études menées par Mbong et Anand-Srivastava (Mbong and Anand-Srivastava 2012) ont indiqué l'implication de la voie

signalétique d'AKT dans l'augmentation de l'expression des protéines Gi et par la suite de la prolifération des CMLV induite par l'augmentation du stress oxydatif. Il faudrait tester l'effet des analogues de l'AMPc perméables à la membrane ou des stimulateurs directs ou indirects de l'adenylate cyclase sur la phosphorylation de l'AKT. De plus il serait pertinent d'examiner par quel effecteur l'AMPc accomplit son effet sur l'activité des récepteurs des facteurs de croissance. Il faudrait tester l'effet des antagonistes du PKA et de l'Epac sur la diminution de la phosphorylation d'EGF-R et du PDGF-R induite par l'augmentation du niveau d'AMPc.

Une expérience prometteuse serait d'essayer de corrélérer temporellement l'effet des stimulateurs d'AMPc sur la production d' $O_2^-$ , l'activité du c-Src et des récepteurs des facteurs de croissance. Ainsi, l'évidence de l'implication d' $O_2^-$  et du c-Src dans l'inhibition de l'activité des EGF-R et de PDGF-R par l'AMPc serait soutenue par une autre approche expérimentale.

Dans le but d'approfondir le rôle d'AMPc dans la prolifération cellulaire, il serait intéressant de déterminer son effet sur les protéines régulatrices du cycle cellulaire. De ce fait, il faudrait déterminer l'effet des analogues d'AMPc sur les composantes de la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire, comme par exemple le cdk2, le cdk4, le pRb et la cycline D1, car l'implication des protéines Gi a été démontrée dans l'augmentation de l'expression de ces protéines et dans l'augmentation du taux de prolifération par la suite.

Finalement, il serait pertinent d'étudier l'effet de l'AMPc sur l'expression des protéines Gi et sur la prolifération cellulaire avec des expériences effectuées *in vivo*, car des études récentes sur des souris ont démontré l'implication du niveau réduit d'AMPc dans le remodelage vasculaire et dans le développement de l'hypertension artérielle (Shahid, Shen et al. 2010; Hara, Sassi et al. 2011). L'infusion des stimulateurs d'AMPc à l'aide des minipompes permettrait d'étudier l'expression des protéines Gi ainsi que le taux de prolifération des CMLV et des cardiomyocytes des rats SHR. Il serait pertinent d'établir une parallèle entre l'augmentation de l'expression des protéines Gi, l'hypertension et le niveau d'AMPc, car on sait que le renforcement du niveau des protéines Gi et de leur fonction avec l'inhibition de l'activité de l'adenylate cyclase et la diminution de la production d'AMPc survient avant le développement de l'hypertension artérielle. Il serait

intéressant de déterminer si l'augmentation du niveau d'AMPc *in vivo* après le renforcement du niveau des protéines Gi mais avant le début du développement de l'hypertension est capable d'activer des mécanismes de feedback positif qui pourraient inhiber l'expression améliorée des protéines Gi et d'activer le fonctionnement de l'adénylate cyclase.

Des études ultérieures concernant les effets d'AMPc sur les CMLV et sur l'ensemble du corps seraient une piste intéressante dans le développement de nouveaux médicaments antihypertensifs.

## 4 BIBLIOGRAPHIE

- Abdollahi, M., A. Bahreini-Moghadam, et al. (2003). "Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 135C(3): 331-336.
- Adderley, S. P., R. S. Sprague, et al. (2010). "Regulation of cAMP by phosphodiesterases in erythrocytes." Pharmacol Rep 62(3): 475-482.
- Adelstein, R. S. and E. Eisenberg (1980). "Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction." Annu Rev Biochem 49: 921-956.
- Ago, T., T. Kitazono, et al. (2004). "Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase." Circulation 109(2): 227-233.
- Alberts, B. (2002). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.
- Amano, M., M. Ito, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem 271(34): 20246-20249.
- Amer, M. S. (1975). "Cyclic nucleotides in disease; on the biochemical etiology of hypertension." Life Sci 17(7): 1021-1038.
- Amer, M. S., A. W. Gomoll, et al. (1974). "Aberrations of cyclic nucleotide metabolism in the hearts and vessels of hypertensive rats." Proc Natl Acad Sci U S A 71(12): 4930-4934.
- Anand-Srivastava, M. B. (1988). "Altered responsiveness of adenylate cyclase to adenosine and other agents in the myocardial sarcolemma and aorta of spontaneously-hypertensive rats." Biochem Pharmacol 37(15): 3017-3022.
- Anand-Srivastava, M. B. (1992). "Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats. Relationship to adenylate cyclase inhibition." Biochem J 288 ( Pt 1): 79-85.
- Anand-Srivastava, M. B. (1996). "G-proteins and adenylyl cyclase signalling in hypertension." Mol Cell Biochem 157(1-2): 163-170.
- Anand-Srivastava, M. B. (2000). "Downregulation of atrial natriuretic peptide ANP-C receptor is associated with alterations in G-protein expression in A10 smooth muscle cells." Biochemistry 39(21): 6503-6513.
- Anand-Srivastava, M. B., J. de Champlain, et al. (1993). "DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins." Am J Hypertens 6(1): 72-75.
- Anand-Srivastava, M. B., D. J. Franks, et al. (1982). "Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun 108(1): 213-219.
- Anand-Srivastava, M. B., S. Picard, et al. (1991). "Altered expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins (Gi alpha) in spontaneously hypertensive rats." Am J Hypertens 4(10 Pt 1): 840-843.

- Andrae, J., R. Gallini, et al. (2008). "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine." Genes Dev 22(10): 1276-1312.
- Asano, M., K. Masuzawa, et al. (1988). "Evidence for reduced beta-adrenoceptor coupling to adenylate cyclase in femoral arteries from spontaneously hypertensive rats." Br J Pharmacol 94(1): 73-86.
- Assender, J. W., K. M. Southgate, et al. (1992). "Inhibition of proliferation, but not of Ca<sup>2+</sup> mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells." Biochem J 288 ( Pt 2): 527-532.
- Azar, Z. M., M. Z. Mehdi, et al. (2006). "Activation of insulin-like growth factor type-1 receptor is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PKB phosphorylation in vascular smooth muscle cells." Can J Physiol Pharmacol 84(7): 777-786.
- Azumi, H., N. Inoue, et al. (1999). "Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries." Circulation 100(14): 1494-1498.
- Babior, B. M., J. D. Lambeth, et al. (2002). "The neutrophil NADPH oxidase." Arch Biochem Biophys 397(2): 342-344.
- Bae, Y. S., S. W. Kang, et al. (1997). "Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation." J Biol Chem 272(1): 217-221.
- Bae, Y. S., J. Y. Sung, et al. (2000). "Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem 275(14): 10527-10531.
- Baillie, G. S. and M. D. Houslay (2005). "Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes." Curr Opin Cell Biol 17(2): 129-134.
- Barbier, A. J., H. M. Poppleton, et al. (1999). "Transmodulation of epidermal growth factor receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase." J Biol Chem 274(20): 14067-14073.
- Baritono, E., G. Ceolotto, et al. (2004). "Abnormal regulation of G protein alpha(i2) subunit in skin fibroblasts from insulin-resistant hypertensive individuals." J Hypertens 22(4): 783-792.
- Barlow, C. A., P. Rose, et al. (2006). "Excitation-transcription coupling in smooth muscle." J Physiol 570(Pt 1): 59-64.
- Barnes, P. J. and S. F. Liu (1995). "Regulation of pulmonary vascular tone." Pharmacol Rev 47(1): 87-131.
- Bassil, M. and M. B. Anand-Srivastava (2006). "Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells." Free Radic Biol Med 41(7): 1162-1173.

- Bassil, M. and M. B. Anand-Srivastava (2007). "Cyclic GMP modulates the expression of Gi protein and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells." Cell Biochem Biophys 47(1): 99-108.
- Bayatti, N. and J. Engele (2002). "Cyclic AMP differentially regulates the expression of fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors in cultured cortical astroglia." Neuroscience 114(1): 81-89.
- Begum, N., S. Hockman, et al. (2011). "Phosphodiesterase 3A (PDE3A) deletion suppresses proliferation of cultured murine vascular smooth muscle cells (VSMCs) via inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling and alterations in critical cell cycle regulatory proteins." J Biol Chem 286(29): 26238-26249.
- Berg, T., E. Degerman, et al. (2009). "Increased cAMP signaling can ameliorate the hypertensive condition in spontaneously hypertensive rats." J Vasc Res 46(1): 25-35.
- Berger, C. E., B. R. Horrocks, et al. (1998). "cAMP-dependent inhibition is dominant in regulating superoxide production in the bone-resorbing osteoclasts." Journal of Endocrinology 158(3): 311-318.
- Bergsten, E., M. Uutela, et al. (2001). "PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor." Nat Cell Biol 3(5): 512-516.
- Berne, R. M. and M. N. Levy (2001). Cardiovascular physiology. St. Louis, MO, Mosby.
- Berridge, M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." Nature 361(6410): 315-325.
- Berry, C., C. A. Hamilton, et al. (2000). "Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries." Circulation 101(18): 2206-2212.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature 415(6868): 198-205.
- Bers, D. M. (2008). "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes." Annu Rev Physiol 70: 23-49.
- Bohm, M., P. Gierschik, et al. (1992). "Desensitization of adenylate cyclase and increase of Gi alpha in cardiac hypertrophy due to acquired hypertension." Hypertension 20(1): 103-112.
- Bohm, M., I. Morano, et al. (1991). "Contribution of cAMP-phosphodiesterase inhibition and sensitization of the contractile proteins for calcium to the inotropic effect of pimobendan in the failing human myocardium." Circ Res 68(3): 689-701.
- Bolen, J. B., R. B. Rowley, et al. (1992). "The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction." Faseb Journal 6(15): 3403-3409.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2002). "Glucose and reactive oxygen species." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5(5): 561-568.



- Boron, W. F. and E. L. Boulpaep (2005). Medical physiology : a cellular and molecular approach. Philadelphia, Pa., Elsevier Saunders.
- Boumati, M., Y. Li, et al. (2002). "Modulation of ANP-C receptor signaling by endothelin-1 in A-10 smooth muscle cells." Arch Biochem Biophys 401(2): 178-186.
- Boumati, M., Y. Li, et al. (2003). "Modulation of ANP-C receptor signaling by arginine-vasopressin in A-10 vascular smooth muscle cells: role of protein kinase C." Arch Biochem Biophys 415(2): 193-202.
- Brandes, R. P. and J. Kreuzer (2005). "Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation." Cardiovasc Res 65(1): 16-27.
- Bray, P., A. Carter, et al. (1986). "Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein." Proc Natl Acad Sci U S A 83(23): 8893-8897.
- Bridges, T. M. and C. W. Lindsley (2008). "G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms." ACS Chem Biol 3(9): 530-541.
- Buck, J., M. L. Sinclair, et al. (1999). "Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A 96(1): 79-84.
- Busse, R., G. Edwards, et al. (2002). "EDHF: bringing the concepts together." Trends Pharmacol Sci 23(8): 374-380.
- Buxton, I. L. and L. L. Brunton (1983). "Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes." J Biol Chem 258(17): 10233-10239.
- Callera, G. E., R. M. Touyz, et al. (2003). "ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension." Hypertension 42(4): 811-817.
- Carretero, O. A. and S. Oparil (2000). "Essential hypertension. Part I: definition and etiology." Circulation 101(3): 329-335.
- Chabrashvili, T., A. Tojo, et al. (2002). "Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney." Hypertension 39(2): 269-274.
- Channon, K. M. and T. J. Guzik (2002). "Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors." J Physiol Pharmacol 53(4 Pt 1): 515-524.
- Chatziantoniou, C., X. Ruan, et al. (1993). "Interactions of cAMP-mediated vasodilators with angiotensin II in rat kidney during hypertension." American Journal of Physiology 265(6 Pt 2): F845-852.
- Cheng, G., Z. Cao, et al. (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." Gene 269(1-2): 131-140.
- Cho-Chung, Y. S. (1990). "Role of cyclic AMP receptor proteins in growth, differentiation, and suppression of malignancy: new approaches to therapy." Cancer Res 50(22): 7093-7100.

- Clark, C. J., G. Milligan, et al. (1992). "Guanine nucleotide regulatory protein levels and function in spontaneously hypertensive rat vascular smooth-muscle cells." Biochim Biophys Acta 1136(3): 290-296.
- Clemens, R. E. and K. K. Griendling (2006). "Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells." Cardiovasc Res 71(2): 216-225.
- Coffer, P. J., J. Jin, et al. (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J 335 ( Pt 1): 1-13.
- Cohen, S. (1960). "Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the Mouse Salivary Gland and Its Neuro-Cytotoxic Antiserum." Proc Natl Acad Sci U S A 46(3): 302-311.
- Cohen, S. (1962). "Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal." J Biol Chem 237: 1555-1562.
- Cohen, S., G. Carpenter, et al. (1980). "Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity." J Biol Chem 255(10): 4834-4842.
- Conti, M. A. and R. S. Adelstein (1981). "The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem 256(7): 3178-3181.
- Cook, S. J. and F. McCormick (1993). "Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf." Science 262(5136): 1069-1072.
- Cooper, D. M. (2003). "Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP." Biochem J 375(Pt 3): 517-529.
- Cooper, J. A. and B. Howell (1993). "The when and how of Src regulation." Cell 73(6): 1051-1054.
- Cross, A. R. and A. W. Segal (2004). "The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems." Biochim Biophys Acta 1657(1): 1-22.
- Crossthwaite, A. J., S. Hasan, et al. (2002). "Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca(2+) and PI3-kinase." J Neurochem 80(1): 24-35.
- Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." Nature 379(6565): 557-560.
- Davies, K. J. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects." J Biol Chem 262(20): 9895-9901.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, et al. (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature 396(6710): 474-477.
- Di Fusco, F., S. Hashim, et al. (2000). "Volume overload cardiac hypertrophy exhibits decreased expression of g(s)alpha and not of g(i)alpha in heart." Am J Physiol Cell Physiol 279(4): C990-998.

- Diederich, D., J. Skopec, et al. (1994). "Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide." Hypertension 23(6 Pt 2): 957-961.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev 82(1): 47-95.
- Dubey, R. K., E. K. Jackson, et al. (1995). "Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors." J Clin Invest 96(1): 141-149.
- Dumont, J. E., J. C. Jauniaux, et al. (1989). "The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation." Trends Biochem Sci 14(2): 67-71.
- Eguchi, S., P. J. Dempsey, et al. (2001). "Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK." J Biol Chem 276(11): 7957-7962.
- Eguchi, S., H. Iwasaki, et al. (1999). "Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt." J Biol Chem 274(52): 36843-36851.
- Ferguson, K. M., M. B. Berger, et al. (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." Mol Cell 11(2): 507-517.
- Fischmeister, R. (2006). "Is cAMP good or bad? Depends on where it's made." Circ Res 98(5): 582-584.
- Folkow, B., M. Hallback, et al. (1973). "Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension, studied in man and in spontaneously hypertensive rats." Circ Res 32: Suppl 1:2-16.
- Follin-Arbelet, V., P. O. Hofgaard, et al. (2011). "Cyclic AMP induces apoptosis in multiple myeloma cells and inhibits tumor development in a mouse myeloma model." BMC Cancer 11: 301.
- Force, T. and J. V. Bonventre (1998). "Growth factors and mitogen-activated protein kinases." Hypertension 31(1 Pt 2): 152-161.
- Forman, H. J. and M. Torres (2002). "Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling." Am J Respir Crit Care Med 166(12 Pt 2): S4-8.
- Freeman, B. A. and J. D. Crapo (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury." Lab Invest 47(5): 412-426.
- Fridovich, I. (1974). "Editorial: Superoxide radical and the bactericidal action of phagocytes." N Engl J Med 290(11): 624-625.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters." J Biol Chem 272(30): 18515-18517.

- Galle, J., C. Lehmann-Bodem, et al. (2000). "CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O<sub>2</sub>(<sup>-</sup>) formation." Nephrol Dial Transplant 15(3): 339-346.
- Ge, C., R. Garcia, et al. (2006). "Enhanced expression of G $\alpha$  protein and adenylyl cyclase signaling in aortas from 1 kidney 1 clip hypertensive rats." Can J Physiol Pharmacol 84(7): 739-746.
- Giasson, E., M. J. Servant, et al. (1997). "Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem 272(43): 26879-26886.
- Gilbertson, D. G., M. E. Duff, et al. (2001). "Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor." J Biol Chem 276(29): 27406-27414.
- Gilkeson, G. S., J. S. Mudgett, et al. (1997). "Clinical and serologic manifestations of autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice lacking nitric oxide synthase type 2." J Exp Med 186(3): 365-373.
- Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem 56: 615-649.
- Gomez Sandoval, Y. H. and M. B. Anand-Srivastava (2011). "Enhanced levels of endogenous endothelin-1 contribute to the over expression of G $\alpha$  protein in vascular smooth muscle cells from SHR: Role of growth factor receptor activation." Cell Signal 23(2): 354-362.
- Gomez Sandoval, Y. H., L. O. Levesque, et al. (2009). "Contribution of epidermal growth factor receptor transactivation in angiotensin II-induced enhanced expression of G $\alpha$  protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells." Can J Physiol Pharmacol 87(12): 1037-1045.
- Gomperts, B. D., P. E. R. Tatham, et al. (2002). Signal transduction. San Diego, Calif., Academic Press.
- Graves, L. M., K. E. Bornfeldt, et al. (1993). "Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A 90(21): 10300-10304.
- Griendling, K. K. (2004). "Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system." Heart 90(5): 491-493.
- Griendling, K. K. (2006). "NADPH oxidases: new regulators of old functions." Antioxid Redox Signal 8(9-10): 1443-1445.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, et al. (1994). "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." Circ Res 74(6): 1141-1148.

- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(10): 2175-2183.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res 86(5): 494-501.
- Griendling, K. K. and M. Ushio-Fukai (2000). "Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling." Regul Pept 91(1-3): 21-27.
- Guyton, A. C., T. G. Coleman, et al. (1972). "Circulation: overall regulation." Annu Rev Physiol 34: 13-46.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2000). Textbook of medical physiology. Philadelphia, Saunders.
- Haga, J. H., Y. S. Li, et al. (2007). "Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells." J Biomech 40(5): 947-960.
- Hammacher, A., K. Mellstrom, et al. (1989). "Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer." EMBO J 8(9): 2489-2495.
- Han, D., F. Antunes, et al. (2003). "Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol." J Biol Chem 278(8): 5557-5563.
- Hara, Y., Y. Sassi, et al. (2011). "Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice." J Clin Invest 121(7): 2888-2897.
- Hashim, S., Y. Li, et al. (2006). "Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G $\alpha$  protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways." Am J Physiol Heart Circ Physiol 291(6): H3144-3153.
- Hashim, S., Y. Y. Liu, et al. (2002). "Streptozotocin-induced diabetes impairs G-protein linked signal transduction in vascular smooth muscle." Mol Cell Biochem 240(1-2): 57-65.
- Heldin, C. H., U. Eriksson, et al. (2002). "New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens." Arch Biochem Biophys 398(2): 284-290.
- Heldin, C. H., A. Ostman, et al. (1998). "Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors." Biochim Biophys Acta 1378(1): F79-113.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev 79(4): 1283-1316.
- Hendriks-Balk, M. C., S. L. Peters, et al. (2008). "Regulation of G protein-coupled receptor signalling: focus on the cardiovascular system and regulator of G protein signalling proteins." Eur J Pharmacol 585(2-3): 278-291.
- Hepler, J. R. and A. G. Gilman (1992). "G proteins." Trends Biochem Sci 17(10): 383-387.
- Hohler, B., B. Holzapfel, et al. (2000). "NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells." Histochem Cell Biol 114(1): 29-37.

- Hollmann, M. W., D. Strumper, et al. (2005). "Receptors, G proteins, and their interactions." Anesthesiology 103(5): 1066-1078.
- Horowitz, A., C. B. Menice, et al. (1996). "Mechanisms of smooth muscle contraction." Physiol Rev 76(4): 967-1003.
- Houslay, M. D. and D. R. Adams (2003). "PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization." Biochem J 370(Pt 1): 1-18.
- Hu, Y., G. Bock, et al. (1998). "Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress." Faseb Journal 12(12): 1135-1142.
- Huang, C. L., E. Kuo, et al. (2008). "WNK kinases and essential hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens 17(2): 133-137.
- Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2000). "Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants." Hypertension 36(3): 312-318.
- Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2001). "Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis." Hypertension 38(3 Pt 2): 581-587.
- Itoh, H., R. Toyama, et al. (1988). "Presence of three distinct molecular species of Gi protein alpha subunit. Structure of rat cDNAs and human genomic DNAs." J Biol Chem 263(14): 6656-6664.
- Iwasaki, H., S. Eguchi, et al. (2000). "Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor." Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(2): H521-529.
- Kanakaraj, P., S. Raj, et al. (1991). "Ligand-induced interaction between alpha- and beta-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation." Biochemistry 30(7): 1761-1767.
- Kashihara, T., T. Nakada, et al. (2012). "Chronic receptor-mediated activation of Gi/o proteins alters basal t-tubular and sarcolemmal L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity through phosphatases in heart failure." Am J Physiol Heart Circ Physiol.
- Kaupp, U. B. and R. Seifert (2002). "Cyclic nucleotide-gated ion channels." Physiol Rev 82(3): 769-824.
- Kazlauskas, A. and J. A. Cooper (1989). "Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins." Cell 58(6): 1121-1133.
- Kelly, J. D., B. A. Haldeman, et al. (1991). "Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation." J Biol Chem 266(14): 8987-8992.
- Kerrick, W. G. and P. E. Hoar (1981). "Inhibition of smooth muscle tension by cyclic AMP-dependent protein kinase." Nature 292(5820): 253-255.

- Klages, S., D. Adam, et al. (1994). "Ctk: a protein-tyrosine kinase related to Csk that defines an enzyme family." Proc Natl Acad Sci U S A 91(7): 2597-2601.
- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, et al. (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." EMBO J 15(19): 5314-5325.
- Kobsar, A., S. Heeg, et al. (2008). "Cyclic nucleotide-regulated proliferation and differentiation vary in human hematopoietic progenitor cells derived from healthy persons, tumor patients, and chronic myelocytic leukemia patients." Stem Cells Dev 17(1): 81-91.
- Koh, G., K. S. Suh, et al. (2005). "Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative damage in pancreatic beta-cells." Arch Biochem Biophys 438(1): 70-79.
- Kohler, N. and A. Lipton (1974). "Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity." Exp Cell Res 87(2): 297-301.
- Korner, P. I., A. Bobik, et al. (1989). "Resistance control in hypertension." J Hypertens Suppl 7(4): S125-134; discussion S135.
- Korsgaard, N., C. Aalkjaer, et al. (1993). "Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension." Hypertension 22(4): 523-526.
- Krauss, G. (2003). Biochemistry of signal transduction and regulation. Weinheim Great Britain, Wiley-VCH.
- Landmesser, U., S. Dikalov, et al. (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." J Clin Invest 111(8): 1201-1209.
- Lappas, G., G. B. Daou, et al. (2005). "Oxidative stress contributes to the enhanced expression of G $\alpha$  proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." J Hypertens 23(12): 2251-2261.
- Lariviere, R., G. Thibault, et al. (1993). "Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats." Hypertension 21(3): 294-300.
- Lassegue, B. and R. E. Clempus (2003). "Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285(2): R277-297.
- Lassegue, B. and K. K. Griendling (2004). "Reactive oxygen species in hypertension; An update." Am J Hypertens 17(9): 852-860.
- Laursen, J. B., S. Rajagopalan, et al. (1997). "Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension." Circulation 95(3): 588-593.
- Lee, D. C., S. E. Fenton, et al. (1995). "Transforming growth factor alpha: expression, regulation, and biological activities." Pharmacol Rev 47(1): 51-85.
- Leevers, S. J., B. Vanhaesebroeck, et al. (1999). "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage." Curr Opin Cell Biol 11(2): 219-225.

- Lehoux, S. and A. Tedgui (1998). "Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall." Hypertension 32(2): 338-345.
- Leu, T. H. and M. C. Maa (2003). "Functional implication of the interaction between EGF receptor and c-Src." Front Biosci 8: s28-38.
- Li, J. M. and A. M. Shah (2002). "Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells." J Biol Chem 277(22): 19952-19960.
- Li, L., G. D. Fink, et al. (2003). "Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension." Circulation 107(7): 1053-1058.
- Li, L., J. J. Galligan, et al. (2003). "Vasopressin induces vascular superoxide via endothelin-1 in mineralocorticoid hypertension." Hypertension 41(3 Pt 2): 663-668.
- Li, Y. and M. Anand-Srivastava (2012). "Implication of multiple signaling pathways in the regulation of angiotensin II-induced enhanced expression of G $\alpha$  proteins in vascular smooth muscle cells." Can J Physiol Pharmacol in press.
- Li, Y. and M. B. Anand-Srivastava (2002). "Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats." Circ Res 91(3): 247-254.
- Li Y, B. D. G., Anand-Srivastava MB. (2005). "Enhanced expression of G $\alpha$  protein in SHR contributes to enhanced proliferation of vascular smooth muscle cells: implication of MAPK/PI3K signaling pathways." Can J Cardiol 21(1556).
- Li, Y., G. Lappas, et al. (2007). "Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of G $\alpha$  proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(4): H1922-1930.
- Li, Y., L. O. Levesque, et al. (2010). "Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR." Am J Physiol Heart Circ Physiol 299(6): H1959-1967.
- Libby, P. and H. Tanaka (1994). "The pathogenesis of coronary arteriosclerosis ("chronic rejection") in transplanted hearts." Clin Transplant 8(3 Pt 2): 313-318.
- Lifton, R. P., A. G. Gharavi, et al. (2001). "Molecular mechanisms of human hypertension." Cell 104(4): 545-556.
- Linseman, D. A., C. W. Benjamin, et al. (1995). "Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem 270(21): 12563-12568.
- Liu, L., X. Xu, et al. (2011). "Lentiviral-Mediated shRNA Silencing of PDE4D Gene Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-Induced Proliferation and Migration of Rat Aortic Smooth Muscle Cells." Stroke Res Treat 2011: 534257.
- Liu, M. W., G. S. Roubin, et al. (1989). "Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia." Circulation 79(6): 1374-1387.



- Lodi, F., A. Cogolludo, et al. (2006). "Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats." Eur J Pharmacol 544(1-3): 97-103.
- Lugnier, C. (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents." Pharmacol Ther 109(3): 366-398.
- Luksha, L., S. Agewall, et al. (2009). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease." Atherosclerosis 202(2): 330-344.
- Luttrell, L. M., Y. Daaka, et al. (1999). "Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors." Curr Opin Cell Biol 11(2): 177-183.
- Lyle, A. N. and K. K. Griendling (2006). "Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species." Physiology (Bethesda) 21: 269-280.
- Marcil, J., J. de Champlain, et al. (1998). "Overexpression of Gi-proteins precedes the development of DOCA-salt-induced hypertension: relationship with adenylyl cyclase." Cardiovasc Res 39(2): 492-505.
- Marcil, J., C. Thibault, et al. (1997). "Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats." J Mol Cell Cardiol 29(3): 1009-1022.
- Mbong, N. and M. B. Anand-Srivastava (2012). "Hydrogen Peroxide Enhances the Expression of G $\alpha$  proteins in Aortic Vascular Smooth Cells: Role of Growth Factor Receptor Transactivation." Am J Physiol Heart Circ Physiol.
- McDonald, T. F., S. Pelzer, et al. (1994). "Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells." Physiol Rev 74(2): 365-507.
- Mehta, P. K. and K. K. Griendling (2007). "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system." Am J Physiol Cell Physiol 292(1): C82-97.
- Migliore, L. and F. Coppede (2002). "Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases." Mutat Res 512(2-3): 135-153.
- Mii, S., R. A. Khalil, et al. (1996). "Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells." American Journal of Physiology 270(1 Pt 2): H142-150.
- Milani, E., S. Nikfar, et al. (2005). "Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 140(2): 251-255.
- Miller, A. A., G. R. Drummond, et al. (2005). "NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries." Circ Res 97(10): 1055-1062.
- Mukherjee, S. P., R. H. Lane, et al. (1978). "Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents." Biochem Pharmacol 27(22): 2589-2594.

- Mulvany, M. J. (1991). "Are vascular abnormalities a primary cause or secondary consequence of hypertension?" Hypertension 18(3 Suppl): 152-57.
- Mulvany, M. J., U. Baandrup, et al. (1985). "Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector." Circ Res 57(5): 794-800.
- Muzaffar, S., J. Y. Jeremy, et al. (2003). "Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries." Thorax 58(7): 598-604.
- Nakamura, K., K. Fushimi, et al. (1998). "Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II." Circulation 98(8): 794-799.
- Neer, E. J. (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." Cell 80(2): 249-257.
- Nogueira-Machado, J. A., F. C. Lima e Silva, et al. (2003). "Modulation of the reactive oxygen species (ROS) generation mediated by cyclic AMP-elevating agents or Interleukin 10 in granulocytes from type 2 diabetic patients (NIDDM): a PKA-independent phenomenon." Diabetes Metab 29(5): 533-537.
- Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." Prog Biophys Mol Biol 83(2): 101-130.
- Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." Jpn Circ J 27: 282-293.
- Oudit, G. Y., H. Sun, et al. (2004). "The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease." J Mol Cell Cardiol 37(2): 449-471.
- Palaparti, A., C. Ge, et al. (1999). "Angiotensin II enhances the expression of G $\alpha$  in A10 cells (smooth muscle): relationship with adenylyl cyclase activity." Arch Biochem Biophys 365(1): 113-122.
- Paquet, J. L., M. Baudouin-Legros, et al. (1989). "Enhanced proliferating activity of cultured smooth muscle cells from SHR." Am J Hypertens 2(2 Pt 1): 108-110.
- Pastan, I. H., G. S. Johnson, et al. (1975). "Role of cyclic nucleotides in growth control." Annu Rev Biochem 44: 491-522.
- Pfitzer, G. (2001). "Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle." Journal of Applied Physiology 91(1): 497-503.
- Pohl, S. L., H. M. Krans, et al. (1971). "The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. VI. Evidence for a role of membrane lipids." J Biol Chem 246(14): 4447-4454.
- Prenzel, N., E. Zwick, et al. (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification." Breast Cancer Res 2(3): 184-190.

- Prigent, S. A. and N. R. Lemoine (1992). "The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands." Prog Growth Factor Res 4(1): 1-24.
- Ramanathan, S. and S. Shibata (1974). "Cyclic amp blood vessels of spontaneously hypertensive rat." Blood Vessels 11(5-6): 312-318.
- Randall, V. A., S. J. MacLennan, et al. (1996). "The effect of forskolin on 5-HT<sub>1</sub>-like and angiotensin II-induced vasoconstriction and cyclic AMP content of the rabbit isolated femoral artery." Br J Pharmacol 118(3): 627-634.
- Resink, T. J., T. Scott-Burden, et al. (1987). "Increased proliferation rate and phosphoinositide turnover in cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." J Hypertens Suppl 5(5): S145-148.
- Rey, F. E. and P. J. Pagano (2002). "The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(12): 1962-1971.
- Robishaw, J. D., M. D. Smigel, et al. (1986). "Molecular basis for two forms of the G protein that stimulates adenylate cyclase." J Biol Chem 261(21): 9587-9590.
- Rodbell, M., M. C. Lin, et al. (1974). "Evidence for interdependent action of glucagon and nucleotides on the hepatic adenylate cyclase system." J Biol Chem 249(1): 59-65.
- Roepstorff, K., L. Grovdal, et al. (2008). "Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer." Histochem Cell Biol 129(5): 563-578.
- Rubanyi, G. M. (1991). "Endothelium-derived relaxing and contracting factors." J Cell Biochem 46(1): 27-36.
- Rueckschloss, U., M. T. Quinn, et al. (2002). "Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(11): 1845-1851.
- Sagar, S., I. J. Kallo, et al. (1992). "Oxygen free radicals in essential hypertension." Mol Cell Biochem 111(1-2): 103-108.
- Saha, S., Y. Li, et al. (2008). "Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." Can J Physiol Pharmacol 86(4): 190-198.
- Saha, S., Y. Li, et al. (2008). "Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of G $\alpha$  protein." J Mol Cell Cardiol 44(2): 336-344.
- Saito, S., G. D. Frank, et al. (2002). "Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C- $\delta$  and c-Src." J Biol Chem 277(47): 44695-44700.
- Sandner, P., M. Kornfeld, et al. (1999). "Nitric oxide/cAMP interactions in the control of rat renal vascular resistance." Circ Res 84(2): 186-192.

- Sandoval, Y. H., Y. Li, et al. (2011). "Transactivation of epidermal growth factor receptor by enhanced levels of endogenous angiotensin II contributes to the overexpression of G $\alpha$  proteins in vascular smooth muscle cells from SHR." Cell Signal 23(11): 1716-1726.
- Sauzeau, V., H. Le Jeune, et al. (2000). "Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle." J Biol Chem 275(28): 21722-21729.
- Scaltriti, M. and J. Baselga (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." Clin Cancer Res 12(18): 5268-5272.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med 30(11): 1191-1212.
- Schramm, M., H. Feinstein, et al. (1972). "Epinephrine binding to the catecholamine receptor and activation of the adenylate cyclase in erythrocyte membranes (hormone receptor- -adrenergic receptor-cyclic AMP-turkey)." Proc Natl Acad Sci U S A 69(2): 523-527.
- Schramm, M. and Z. Selinger (1984). "Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system." Science 225(4668): 1350-1356.
- Sedeek, M. H., M. T. Llinas, et al. (2003). "Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension." Hypertension 42(4): 806-810.
- Seguchi, H., J. Nishimura, et al. (1996). "The mechanism of relaxation induced by atrial natriuretic peptide in the porcine renal artery." Br J Pharmacol 118(2): 343-351.
- Seifert, R. A., C. E. Hart, et al. (1989). "Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors." J Biol Chem 264(15): 8771-8778.
- Seki, T., H. Yokoshiki, et al. (1999). "Angiotensin II stimulation of Ca<sup>2+</sup>-channel current in vascular smooth muscle cells is inhibited by lavendustin-A and LY-294002." Pflugers Arch 437(3): 317-323.
- Sevetson, B. R., X. Kong, et al. (1993). "Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A 90(21): 10305-10309.
- Shahid, M., L. Shen, et al. (2010). "Impaired 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated signaling in immediate early responsive gene X-1-deficient vascular smooth muscle cells." Hypertension 56(4): 705-712.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." Nature 372(6503): 231-236.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med 320(14): 915-924.
- Strathmann, M. P. and M. I. Simon (1991). "G $\alpha$  12 and G $\alpha$  13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits." Proc Natl Acad Sci U S A 88(13): 5582-5586.

- Stuehr, D., S. Pou, et al. (2001). "Oxygen reduction by nitric-oxide synthases." J Biol Chem 276(18): 14533-14536.
- Stull, J. T., L. C. Hsu, et al. (1990). "Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle." J Biol Chem 265(27): 16683-16690.
- Suh, Y. A., R. S. Arnold, et al. (1999). "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1." Nature 401(6748): 79-82.
- Summy, J. M. and G. E. Gallick (2006). "Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage." Clin Cancer Res 12(5): 1398-1401.
- Sunahara, R. K., C. W. Dessauer, et al. (1996). "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 461-480.
- Sunahara, R. K. and R. Taussig (2002). "Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling." Mol Interv 2(3): 168-184.
- Suri, M. F. and A. I. Qureshi (2006). "Prehypertension as a risk factor for cardiovascular diseases." J Cardiovasc Nurs 21(6): 478-482; quiz 483-474.
- Surks, H. K. (2007). "cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms." Circ Res 101(11): 1078-1080.
- Surks, H. K., N. Mochizuki, et al. (1999). "Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha." Science 286(5444): 1583-1587.
- Sutherland, E. W. and T. W. Rall (1958). "Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles." J Biol Chem 232(2): 1077-1091.
- Szasz, T., K. Thakali, et al. (2007). "A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease." Exp Biol Med (Maywood) 232(1): 27-37.
- Takahashi, T., T. Taniguchi, et al. (1999). "Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells." American Journal of Physiology 276(6 Pt 2): H1927-1934.
- Tan, C. M., D. J. Kelvin, et al. (2001). "Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase." Biochemistry 40(6): 1702-1709.
- Taniyama, Y. and K. K. Griendling (2003). "Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms." Hypertension 42(6): 1075-1081.
- Tasken, K. and E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiol Rev 84(1): 137-167.
- Taussig, R. and A. G. Gilman (1995). "Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases." J Biol Chem 270(1): 1-4.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279(6): L1005-1028.

- Thibault, C. and M. B. Anand-Srivastava (1992). "Altered expression of G-protein mRNA in spontaneously hypertensive rats." FEBS Lett 313(2): 160-164.
- Tomita, H., M. Nazmy, et al. (2003). "Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation." Circ Res 93(1): 12-22.
- Tortora, G. J. and S. R. Grabowski (2003). Principles of anatomy and physiology. New York, Wiley.
- Touyz, R. M. (2000). "Oxidative stress and vascular damage in hypertension." Curr Hypertens Rep 2(1): 98-105.
- Touyz, R. M. (2004). "Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease." Braz J Med Biol Res 37(8): 1263-1273.
- Touyz, R. M. (2004). "Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?" Hypertension 44(3): 248-252.
- Touyz, R. M. and C. Berry (2002). "Recent advances in angiotensin II signaling." Braz J Med Biol Res 35(9): 1001-1015.
- Touyz, R. M., X. Chen, et al. (2002). "Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II." Circ Res 90(11): 1205-1213.
- Touyz, R. M., M. Cruzado, et al. (2003). "Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation." Can J Physiol Pharmacol 81(2): 159-167.
- Touyz, R. M., L. Y. Deng, et al. (1999). "Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases." J Hypertens 17(7): 907-916.
- Touyz, R. M., C. Deschepper, et al. (2002). "Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats." J Hypertens 20(6): 1127-1134.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol 122(4): 339-352.
- Tresguerres, M., L. R. Levin, et al. (2011). "Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase." Kidney International 79(12): 1277-1288.
- Triner, L., Y. Vulliemoz, et al. (1972). "Adenyl cyclase-phosphodiesterase system in arterial smooth muscle." Life Sci 11(17): 817-824.
- Tsutsui, M., H. Shimokawa, et al. (1994). "Endothelial Gi protein in human coronary arteries." Eur Heart J 15(9): 1261-1266.

- Ushio-Fukai, M., R. W. Alexander, et al. (1999). "Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem 274(32): 22699-22704.
- Ushio-Fukai, M., K. K. Griendling, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(4): 489-495.
- Ushio-Fukai, M., A. M. Zafari, et al. (1996). "p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem 271(38): 23317-23321.
- Van Riper, D. A., B. A. Weaver, et al. (1995). "Myosin light chain kinase phosphorylation in swine carotid artery contraction and relaxation." American Journal of Physiology 268(6 Pt 2): H2466-2475.
- Vanhoutte, P. M. and I. Leusen (1981). Vasodilatation. New York, Raven Press.
- Vecchione, C., E. Patrucco, et al. (2005). "Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma." J Exp Med 201(8): 1217-1228.
- Viedt, C., U. Soto, et al. (2000). "Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(4): 940-948.
- Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." Cell Mol Life Sci 59(9): 1428-1459.
- Voet, D. and J. G. Voet (2011). Biochemistry. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons.
- Voet, D., J. G. Voet, et al. (2008). Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level. Hoboken, NJ, Wiley.
- Wan, Y., T. Kurosaki, et al. (1996). "Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors." Nature 380(6574): 541-544.
- Wedgwood, S., R. W. Dettman, et al. (2001). "ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281(5): L1058-1067.
- Westermarck, B. and A. Wasteson (1976). "A platelet factor stimulating human normal glial cells." Exp Cell Res 98(1): 170-174.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev 79(1): 143-180.
- Wilson, E., Q. Mai, et al. (1993). "Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF." J Cell Biol 123(3): 741-747.
- Wu, J., P. Dent, et al. (1993). "Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate." Science 262(5136): 1065-1069.

- Wu, R., E. Millette, et al. (2001). "Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats." J Hypertens 19(4): 741-748.
- Wu, X., T. A. Haystead, et al. (1998). "Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase." J Biol Chem 273(18): 11362-11369.
- Xian, C. J. (2007). "Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth." Endocr Rev 28(3): 284-296.
- Xu, Q., Y. Liu, et al. (1996). "Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall." J Clin Invest 97(2): 508-514.
- Yatani, A., R. Mattera, et al. (1988). "The G protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel is stimulated by three distinct G<sub>i</sub> alpha-subunits." Nature 336(6200): 680-682.
- Yeaman, T. J. (2004). "A renaissance for SRC." Nat Rev Cancer 4(6): 470-480.
- Yokoyama, U., H. H. Patel, et al. (2008). "The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals." Proc Natl Acad Sci U S A 105(17): 6386-6391.
- Yoshikawa, H., K. Fukuda, et al. (1994). "Deficient activity of stimulatory nucleotide-binding regulatory protein in lymphocytes from patients with essential hypertension." Am J Hypertens 7(8): 713-716.
- Zalba, G., F. J. Beaumont, et al. (2000). "Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats." Hypertension 35(5): 1055-1061.
- Zalba, G., G. San Jose, et al. (2001). "Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase." Hypertension 38(6): 1395-1399.
- Zhou, R. H., T. S. Lee, et al. (2003). "Stent implantation activates Akt in the vessel wall: role of mechanical stretch in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(11): 2015-2020.