

Université de Sherbrooke

Les β -arrestines et les produits de glycation avancée régulent et modulent respectivement la contraction cellulaire induite par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G

Par
Elie Simard M.Sc.
Programme de pharmacologie

Mémoire/Thèse présenté(e) à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade philosophiae doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Octobre, 2014

Membres du jury d'évaluation
Morris Karmazyn, Physiology and Pharmacology, Schulich School of Medicine &
Dentistry, University of Western Ontario
Pedro-Miguel Geraldès, Médecine, Service d'endocrinologie
Gaétan Guillemette, Pharmacologie
Pedro D'Orléans-Juste, Pharmacologie
Michel Grandbois, Pharmacologie

© Elie Simard, 2014

RÉSUMÉ

Les β -arrestines et les produits de glycation avancée régulent et modulent respectivement la contraction cellulaire induite par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G

Par

Elie Simard, M.Sc.

Programmes de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La contraction cellulaire est une activité centrale dans plusieurs processus physiologiques. Entre autre, elle joue un rôle dans la régulation de la perméabilité vasculaire et de la pression artérielle. Il est également établi qu'une contraction anormale des cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) est souvent associée à l'hypertension et ses complications. Il est donc suggéré que l'étude des mécanismes impliqués dans la transduction de signaux menant à la contraction cellulaire et les mécanismes impliqués dans la régulation de celle-ci pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles potentielles afin d'envisager de nouveaux traitements pour cette maladie. Étant donné le rôle connu du système angiotensinergique dans l'activité contractile des VSMC et les nombreux indices suggérant une dérégulation de ce système dans le développement de l'hypertension; la présente thèse a été consacrée, dans un premier temps, à identifier de nouveaux mécanismes de signalisation impliqués dans la contraction cellulaire induite par l'angiotensine II. Ainsi, il est montré, pour la première fois, que les β -arrestines; des protéines adaptatrices impliquées dans la désensibilisation et la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G, participent à la contraction cellulaire associée à l'activation du récepteur de l'angiotensine de type 1, et ce, en exerçant des effets opposés sur la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Dans un second temps, étant donné qu'en condition diabétique une dysfonction vasculaire est observée et que cette dernière serait reliée à des changements dans le phénotype fonctionnel des VSMC; la deuxième partie de cette thèse traite des effets de l'exposition aux produits de glycation avancée (AGE) sur le phénotype et l'activité contractile des VSMC. En effet, les AGE, issus de la réaction entre les protéines et le glucose et dont la formation est particulièrement favorisée en contexte diabétique, pourraient être impliqués dans la dysfonction vasculaire observée. Ainsi, il est montré, pour la première fois, que l'exposition des VSMC aux AGE inhibe l'expression de leur phénotype contractile en affectant leurs propriétés mécaniques et diverses fonctions cellulaires telles que la signalisation, la contraction et l'organisation du cytosquelette. Dans un contexte plus large, cette thèse confirme également l'importance d'intégrer les approches biophysiques à la biologie cellulaire. En effet, les résultats obtenus par microscopie à force atomique sont uniques puisqu'ils offrent une nouvelle perspective concernant l'activité cellulaire *via* la caractérisation du phénotype mécanique de la cellule et la mesure de la contraction au niveau d'une seule cellule.

Mots clés : Angiotensine, AT1aR, β -arrestine, SII, AGE, RAGE, Diabète, VSMC, AFM.

SUMMARY

β -arrestins and advanced glycation end-products respectively regulate and modulate cell contraction induced by G protein coupled receptor activation.

By

Elie Simard, M.Sc.

Pharmacology program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Doctor degree diploma philosophiae doctor (Ph.D.) in pharmacology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Cell contraction plays a key role in a variety of physiological processes, among those; it regulates vascular permeability and blood pressure. It is known that abnormal contraction of vascular smooth muscle cells (VSMC) is often associated with hypertension and its complications. Therefore, it is suggested that studying mechanisms involved in signal transduction leading to cell contraction and mechanisms regulating the cell ability to contract may allow identifying new therapeutic targets in order to suggest new treatments for hypertension. Knowing the role of the angiotensin system in VSMC contractility and the numerous evidences suggesting a dysregulation of this system in the development of hypertension; this thesis first sought to identify new signaling mechanisms involved in cell contraction induced by angiotensin II. Therefore, it is shown here, for the first time, that β -arrestins; which are scaffolding proteins involved in the desensitisation and the signalling of protein G-coupled receptors, participate in cell contractile activity induced by angiotensin receptor type 1 activation by reciprocally regulating myosin activity through its light chain phosphorylation. Secondly, knowing that a vascular dysfunction is observed in diabetes which could be attributed to changes in VSCM functional phenotype; this thesis also investigated the effect of advanced glycation end-products (AGE) exposure on the contractile phenotype and function of VSMC. Indeed, AGE, which are the product of a reaction between proteins and glucose, are increased significantly in diabetes and are suspected to be involved in the vascular dysfunction observed in this metabolic disease. Therefore, it shown, for the first time, that AGE stimulation of the VSMC A7r5 interfere with the expression of their contractile phenotype by changing their mechanical properties and various cellular functions such as signal transduction, contraction and cytoskeletal organisation. Finally, this thesis also underlines the utility of integrating biophysical tools into studying cellular biology. Indeed, the various results obtained using atomic force microscopy are unique in a way that they provide new insights into studying cellular activity trough the measurement of single cell contraction and characterisation its mechanical phenotype.

Keywords: Angiotensin, AT1aR, β -arrestin, SII, AGE, RAGE, Diabetes, VSMC, A7r5, AFM.

TABLE DES MATIERES

Résumé	ii
Summary	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction	1
1.1 Le système cardiovasculaire	3
1.1.1 L'anatomie du système cardiovasculaire	3
1.1.2 Régulation du système cardiovasculaire.....	7
1.1.2.1 Les rôles vasopresseurs de l'angiotensine II et la vasopressine	8
1.1.3 L'hypertension	9
1.1.4 Le diabète	10
1.2 Les produits de glycation avancée	13
1.2.1 La formation des AGE.....	16
1.2.2 Les récepteurs des AGE	18
1.2.3 La signalisation associée à l'activation de RAGE.....	18
1.2.4 Les rôles physiopathologiques de RAGE	21
1.2.5 Les antagonistes de RAGE	22
1.3 La contraction cellulaire	23
1.3.1 Le rôle du calcium dans la contraction cellulaire	24
1.3.2 Le moteur actine-myosine et sa régulation.....	28
1.3.3 Le cytosquelette et son implication dans la contraction	30
1.4 L'angiotensine II, un régulateur de la contraction cellulaire	31
1.4.1 Les rôles physiopathologiques de la signalisation des β -arrestines.....	32
1.4.2 L'importance du concept de signalisation biaisée.....	33
1.5 La plasticité phénotypique des cellules du muscles lisses vasculaires	36
1.5.1 Signalisation impliquée dans le phénotype contractile	38
1.5.2 Signalisation impliquée dans le phénotype synthétique	38
Hypothèse et objectifs	40
Objectif #1 (Article 1).....	42

Objectif #2 (Article 2).....	42
Matériel et méthodes.....	44
2.1 Microscopie à force atomique	44
2.1.1 Mesure de contraction cellulaire en temps réel.....	46
2.1.2 Mesure de la rigidité cellulaire.....	48
Article 1	51
Article 2	87
Discussion.....	138
5.1 Contributions respectives des β-arrestines dans la réponse contractile induite par l'activation d'AT1aR.....	139
5.2 L'impact thérapeutique du rôle des β-arrestines dans la réponse contractile induite par l'activation d'AT1aR	141
5.3 L'inhibition du phénotype contractile des VSMC dépendante de l'activation de RAGE	142
5.4 Les effets de l'activation de RAGE sur la fonction contractile des VSMC.....	147
5.5 Les agonistes de RAGE et leurs impacts sur la signalisation cellulaire.....	149
5.6 Les antagonistes de RAGE et leur potentiel pharmacologique	150
Conclusions et perspectives.....	151
Liste des références	154

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Composantes tissulaires et cellulaires des vaisseaux sanguins	6
Figure 2. Exemples de structures d'AGE	15
Figure 3. Voies de synthèse des AGE.....	17
Figure 4. Voies de signalisation activées par RAGE.....	20
Figure 5. Rôle de la signalisation calcique dans la contraction cellulaire	27
Figure 6. Mécanismes de régulation de la phosphorylation de la myosine	29
Figure 7. Signalisation du récepteur AT1 de l'Ang II	35
Figure 8. Phénotypes des cellules du muscle lisse vasculaire	37
Figure 9. Représentation schématique d'un AFM	45
Figure 10. Mesure de la contraction cellulaire en temps réel par AFM dans une expérience typique	47
Figure 11. Mesure de rigidité cellulaire par AFM	50
Article 1, Figure 1. β -Arrestin-1 interacts with MYPT-1.....	61
Article 1, Figure 2. β -Arrestin-1 and 2 interact with MYPT-1.....	62
Article 1, Figure 3. β -Arrestin-1 and β -arrestin 2 have opposing role on MLC phosphorylation.	65
Article 1, Figure 4. Ang II and SII induce cell contraction detectable by AFM.	68
Article 1, Figure 5. β -Arrestin 1 and 2 are participating in Ang II-dependent cell contraction.	69
Article 1, Figure 6. SII acts as a biased agonist inducing contraction via both β -arrestin-1 and 2 activation.....	71
Article 1, Figure 7. Ang II and SII induce rVSMC migration.	72
Article 1, Figure 8. β -Arrestins are required for cell migration.....	74
Article 2, S1 Figure 1. <i>In vitro</i> glycation of HSA increases CML adducts.	103
Article 2, Figure 1. Expression levels of RAGE and V1R in A7r5 cells.....	105
Article 2, S3 Figure 2. RAGE activation affects MAPKs and AKT signaling.....	107
Article 2, Figure 2. RAGE stimulation increases NF- κ B activity.	109

Article 2, Figure 3. RAGE stimulation affects mRNA and protein levels of different key proteins involved in VSMC phenotype.	112
Article 2, Figure 4. RAGE stimulation changes cell mechanical properties and increases cell rigidity.....	114
Article 2, Figure 5. RAGE activation does not affect significantly basal myosin phosphorylation.	116
Article 2, Figure 6. RAGE activation increases V1R/Gq-dependent calcium signaling.	119
Article 2, Figure 7. RAGE stimulation changes myosin phosphorylation dependent on V1R activation.....	122
Article 2, S4 Figure 3. RAGE activation doesn't affect significantly AVP-induced cytoskeletal reorganisation.	123
Article 2, Figure 8. RAGE activation in VSMC interferes with their contractile phenotype and function.	129

LISTE DES TABLEAUX

Article 2, S2 Table 1. Primer sequences used for qRT-PCR.....98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACEI	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine <i>Angiotensin converting enzyme inhibitor</i>
AFM	Microscopie à force atomique <i>Atomic force microscopy</i>
AGE	Produits de glycation avancée <i>Advanced glycation end-products</i>
Akt	Protéine kinase B <i>Protein kinase B</i>
Ang II	Angiotensine II <i>Angiotensin II</i>
ARA	Antagoniste du récepteur à l'angiotensine <i>Angiotensin receptor antagonist</i>
AT1aR	Récepteur à l'angiotensine de type 1a <i>Angiotensin type 1a receptor</i>
AT1aR-293	Cellules HEK 293 surexprimant le récepteur AT1a <i>HEK 293 cells overexpressing AT1a receptor</i>
AVP	Arginine-vasopressine <i>Arginine-vasopressin</i>
BCA	Acide bicinchoninique <i>Bicinchoninic acid</i>
CAMK	Kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CML	Carboxyméthyl-Lysine <i>Carboxymethyl-Lysine</i>
DAG	Diglycéride <i>Diacylglycerol</i>
DMEM	Milieu Eagle modifié selon Dulbecco <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

EMEM	Milieu essentiel modifié selon Eagle <i>Eagle's modified essential medium</i>
ERK	Kinase régulée par les signaux extracellulaires <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	Sérum fœtal bovin <i>Fœtal bovine serum</i>
Fura-2/AM	Acétoxyméthyl ester de Fura-2 FURA-2-Acetoxymethyl ester
GFP	Protéine fluorescente verte <i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G <i>G-protein coupled receptor</i>
HBSS	Solution saline balancée selon Hank <i>Hank's balanced salt solution</i>
HSA	Albumine sérique humaine <i>Human serum albumin</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphate
JNK/SAPK	Kinase n-terminale de c-JUN/Protéine kinase activée par le stress <i>c-JUN N-terminal kinase/stress activated protein kinase</i>
NF- κ B	Facteur de transcription nucléaire kappa B <i>Nuclear factor kappa B</i>
MAPK	Kinase activée par les facteurs mitogéniques <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MLC	Chaîne légère de la myosine <i>Myosin light chain</i>
MLCK	Kinase des chaînes légères de la myosine <i>Myosin light chain kinase</i>
MLCP	Phosphatase des chaînes légères de la myosine <i>Myosin light chain phosphatase</i>
MRTF	Facteur de transcription apparenté à la myocardine <i>Myocardin related transcription factor</i>

MyoC	Myocardine <i>Myocardin</i>
MYPT-1	Sous-unité régulatrice de la phosphatase de la myosine <i>Myosin light chain phosphatase targeting subunit</i>
NEAA	Acides aminés non-essentiels <i>Non-essential amino acids</i>
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	Saline tamponnée au phosphate <i>Phosphate buffered saline</i>
PI3K	Phosphoinoside 3-kinase <i>Phosphoinoside 3-kinase</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKC	Protéine kinase C <i>Protein kinase C</i>
PP1C	Domaine catalytique de la phosphatase chaînes légères de la myosine <i>Catalytic domain of myosin light chain phosphatase</i>
RAGE	Récepteur des produits de glycation avancée <i>Receptor for advanced glycation end-products</i>
RAS	Système rénine-angiotensine <i>Renin-angiotensin system</i>
ROCE	Entrée calcique dépendante de l'activité réceptorielle <i>Receptor operated calcium entry</i>
ROCK	Kinase activée par Rho <i>Rho-activated kinase</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène <i>Reactive oxygen species</i>
RMSD	Écart quadratique moyen <i>Root-mean-square deviation</i>
rVSMC	Cellule du muscle lisse vasculaire de rat

	<i>Rat vascular smooth muscle cell</i>
SDS	Laurylsulfate de sodium <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Erreur standard moyenne <i>Mean standard error</i>
SII	[Sar1,Ile4,Ile8]-Angiotensine II <i>[Sar1,Ile4,Ile8]-Angiotensin II</i>
SM-22 α	Transg�line <i>Transgelin</i>
SM- α -actin	Actine alpha des muscles lisses <i>Smooth muscle alpha actin</i>
SM-MHC	Chaîne lourde de la myosine des muscles lisses <i>Smooth muscle myosin heavy chain</i>
SNA	Système nerveux autonome
SOCE	Entrée calcique dépendante de la réserve intracellulaire de calcium <i>Store operated calcium entry</i>
SRF	Facteur de réponse au sérum <i>Serum response factor</i>
TNBSA	Acide Trinitrobenz�nesulfonique <i>Trinitrobenzenesulfonic acid</i>
V1R	Récepteur de la vasopressine de type 1 <i>Vasopressin type 1 receptor</i>
VSMC	Cellule du muscle lisse vasculaire <i>Vascular smooth muscle cells</i>

INTRODUCTION

Environ 20 % des canadiens souffrent d'hypertension. Cette forte prévalence ainsi que le risque de complications associées à cette maladie représentent un problème majeur pour les soins de santé (Chobanian *et al.*, 2003; (Statistics Canada - Government of Canada, 2014-10-29)). Malgré des décennies de recherche visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'hypertension, l'origine précise de cette maladie demeure difficile à identifier. Ainsi, l'étude des mécanismes de régulation de la contraction cellulaire pourrait permettre d'identifier de nouvelles pistes de réflexion ou d'envisager de nouveaux traitements pour cette maladie.

La contraction cellulaire est une activité centrale dans plusieurs processus physiologiques. L'activité mécanique cellulaire joue un rôle dans la régulation de la perméabilité vasculaire ou de la pression artérielle (Tang et Anfinogenova, 2008). L'activité du moteur actine-myosine, qui est responsable de la contraction cellulaire, est également impliquée dans des événements tels que l'orientation des fibres de collagène produites par les fibroblastes et dans plusieurs activités cellulaires complexes comme la division, l'adhésion et la migration cellulaire (Kolodney *et al.*, 1999). Ainsi la régulation de la contraction et de la tension cellulaire est critique pour l'homéostasie des organes. Une contraction anormale des cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) est souvent associée à l'hypertension et ses complications telles que l'hypertrophie cardiaque, la dysfonction rénale et les accidents cérébraux vasculaires (de Gasparo *et al.*, 2000).

Parmi les hormones qui régulent la pression artérielle, on retrouve, entre autres, l'angiotensine II (Ang II), la vasopressine (AVP), l'urotensine et l'endothéline-1 qui stimulent la contraction des VSMC. Concernant l'Ang II, il est établi que l'activation exagérée du système rénine-angiotensine (RAS) est impliquée dans certains cas d'hypertension sévère (Lonn *et al.*, 1994). De plus, les individus atteints d'hypertension primaire répondent positivement à l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'angiotensine (ARA) ou d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEI) alors qu'ils ne

montrent pas une activité accrue du système RAS (Dahlof *et al.*, 2002; Hansson *et al.*, 1999). Ainsi, il est suggéré qu'une dérégulation dans le système RAS au niveau de la signalisation impliquée dans la contraction cellulaire, serait à l'origine de l'hypertension.

Plusieurs études suggèrent également que des anomalies au niveau vasculaire seraient à l'origine du développement de l'hypertension, car ces dernières seraient en mesure d'affecter les mécanismes impliqués dans la régulation de la résistance périphérique (Brenner *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2003). Il est suggéré que l'origine de ces défauts pourrait être causée par une sensibilité des cellules vasculaires à divers stimuli physiopathologiques ayant comme conséquence la modulation de leur phénotype. Cette modulation serait causée par l'activation de différentes voies de signalisation qui modifieraient le profil d'expression de différents gènes liés à leurs phénotypes et leurs fonctions.

En condition diabétique, il est connu que l'hyperglycémie chronique est associée au dysfonctionnement vasculaire (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Il est suggéré que les produits de glycation avancée (AGE), issus de la réaction entre les protéines et le glucose, et, dont la formation est favorisée en contexte diabétique, pourraient être responsables de cette dysfonction. Ainsi, le dysfonctionnement vasculaire serait causé par l'activation des récepteurs des produits de glycation avancée (RAGE) (Bailey *et al.*, 1995) inhibant ainsi l'expression de gènes impliqués dans le phénotype contractile des VSMC. En effet, en condition diabétique, il est établi que les VSMC subissent un revirement phénotypique du type contractile vers un type sécrétoire et synthétique associé à une prolifération accrue (Etienne *et al.*, 1998; Pandolfi *et al.*, 2003).

La présente thèse de doctorat vise, dans un premier temps, à identifier de nouveaux mécanismes de signalisation impliqués dans la régulation de la contraction cellulaire induite par l'Ang II et, dans un second temps, à démontrer que la signalisation RAGE en condition pathologique altère la fonction contractile des cellules vasculaires.

1.1 Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est constitué du cœur, des vaisseaux sanguins et d'un volume important de sang, soit près de cinq litres chez l'adulte (Davy *et al.*, 1994). Le système cardiovasculaire est responsable de transporter l'oxygène, les nutriments, les hormones ainsi que les déchets métaboliques à travers l'organisme. Il permet également le transport des cellules immunitaires et anticorps chargés d'éliminer les pathogènes et débris cellulaires. Finalement, il permet le transport des plaquettes et globules rouges qui participent à la réparation des vaisseaux. Ainsi le système cardiovasculaire possède 3 principales fonctions : le transport du matériel, la protection et la régulation de l'homéostasie de l'organisme.

1.1.1 L'anatomie du système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est alimenté par le cœur, une pompe musculaire, qui permet le flot continu du sang à travers l'organisme. Le cœur est constitué de 4 chambres: soit les oreillettes et ventricules gauches et droits. Le système cardiovasculaire est formé de deux systèmes circulatoires: la circulation pulmonaire et la circulation systémique aussi appelés respectivement petite et grande circulation. L'aorte et la veine cave retrouvées au niveau du cœur forment respectivement le début et la fin dans la grande circulation, alors que l'artère et les veines pulmonaires agissent de même pour la petite circulation.

La circulation pulmonaire permet le transport du sang pauvre en oxygène provenant du ventricule droit du cœur vers les poumons afin de permettre son réapprovisionnement en oxygène par les échanges gazeux pulmonaires avant de retourner dans l'oreillette gauche du cœur. La circulation systémique transporte le sang riche en oxygène provenant du ventricule gauche du cœur vers tous les organes et tissus de l'organisme. La circulation systémique permet également de récupérer les déchets métaboliques provenant de l'activité cellulaire des tissus et organes et retourne le sang riche en dioxyde de carbone au niveau de l'oreillette droite du cœur.

Le réseau vasculaire permet l'irrigation des organes et les vaisseaux qui le forme sont retrouvés sous une variété de tailles (**Figure 1**). Ces derniers sont constitués de la lumière, où le sang circule, et d'une paroi qui peut être formée d'une ou plusieurs couches cellulaires et tissulaires en fonction de la proximité du cœur ou des organes. Tous les vaisseaux sanguins sont constitués d'une monocouche cellulaire tapissant la lumière : l'endothélium. Les cellules endothéliales qui constituent cet endothélium agissent en tant que barrière semi-perméable et elles maintiennent l'homéostasie vasculaire en sécrétant divers facteurs tels que la prostacycline, la thrombomoduline, le sulfate d'héparine, l'activateur de plasminogène de type tissulaire ou le monoxyde d'azote qui préviennent, *via* différents mécanismes, la coagulation sanguine spontanée et stimulée par les forces mécaniques générées par le flot sanguin (Sumpio *et al.*, 2002).

Il existe trois grandes classes de vaisseaux sanguins : les artères, les capillaires et les veines. Les artères sont les vaisseaux qui transportent le sang provenant du cœur, alors que les veines transportent le sang qui se dirige vers le cœur. Dans l'arbre vasculaire, les artérioles et les veinules sont les vaisseaux de petit calibre qui alimentent la microcirculation formée des capillaires. Les capillaires permettent les échanges entre le sang et les cellules; n'étant formés que de cellules endothéliales et de péricytes. Ils sont suffisamment petits pour permettre la diffusion de gaz et des petites molécules tout en permettant de conserver les cellules sanguines à l'intérieur des vaisseaux.

Les artères et artérioles sont exposées aux plus grandes variations de pression sanguine puisqu'ils transportent le sang qui est expulsé du cœur. Pour soutenir cette pression, les vaisseaux du système artériel sont constitués d'une paroi riche en fibres élastiques et cellules musculaires conférant à ces vaisseaux une résistance accrue aux forces exercées par la contraction cardiaque et le flot sanguin (Cyron et Humphrey, 2014). C'est la contraction et la relaxation du muscle lisse vasculaire du système artériel qui régule le flot sanguin : la contraction des VSMC permet de diminuer le flot sanguin ce qui entraîne une augmentation de la tension sur les vaisseaux. De cette manière, la tension musculaire permet de contrôler la perfusion des organes en fonction des besoins de l'organisme.

Les veines et veinules ne sont exposées qu'à de faibles forces de pression. En effet, le système artériel et la microcirculation absorbent l'essentiel des variations de pression générées par la contraction du cœur. Ainsi, les veines sont plus minces, moins élastiques et possèdent moins de cellules musculaires que les vaisseaux retrouvés dans le système artériel. En fait, les veines dépendent principalement du contrôle du tonus veineux par le système nerveux sympathique, de la gravité, de l'inertie et de la contraction des muscles squelettiques pour exercer leur fonction qui est d'assurer le retour du sang au niveau du cœur. Les valves retrouvées au niveau des veines assurent l'unidirectionalité du flot sanguin, soit, vers le cœur.

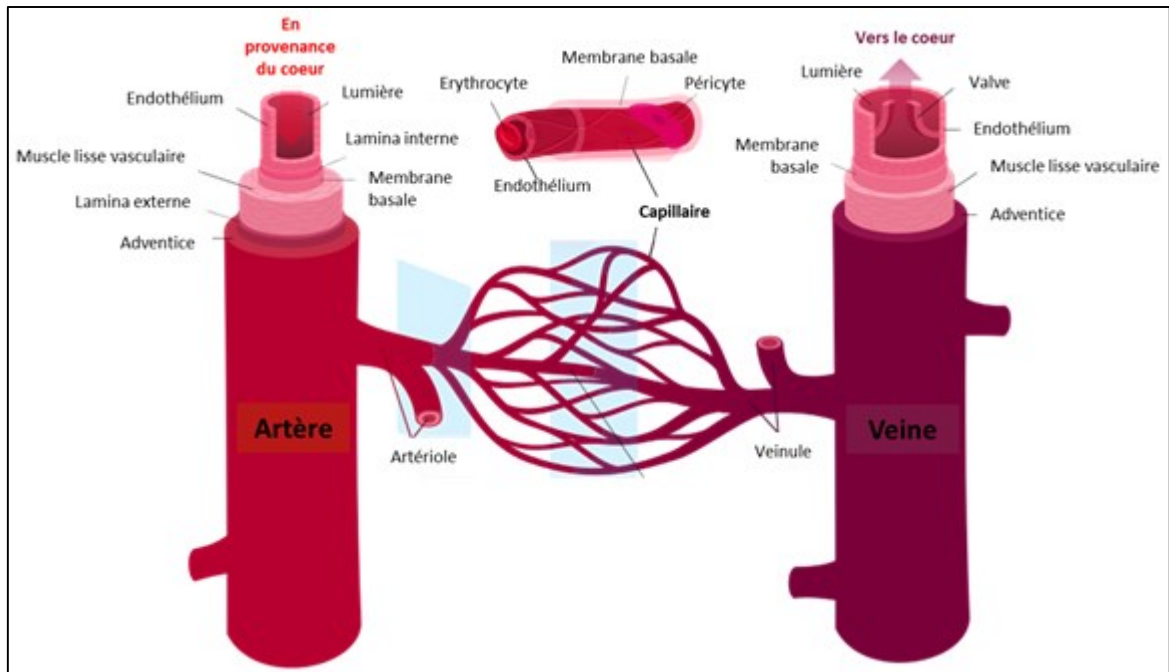


Figure 1. Composantes tissulaires et cellulaires des vaisseaux sanguins

Schéma illustrant les composantes principales de l'arbre vasculaire. On retrouve les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines. Les artérioles et les veinules sont de petit calibre et alimentent la microcirculation formée des capillaires. Les vaisseaux du système artériel sont constitués de tuniques (Lamina externe et interne) riches en fibres élastiques (collagène, élastine et laminine) entourant le muscle lisse vasculaire prééminent.

Adapté de http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_vessel#mediaviewer/File:Blood_vessels.svg; sous licence ouverte.

1.1.2 Régulation du système cardiovasculaire

La pression sanguine peut être contrôlée de diverses façons au niveau du système cardiovasculaire. Plusieurs hormones ainsi que certains signaux en provenance du système nerveux autonome (SNA) mènent à une augmentation de la force ou le rythme de contraction du cœur ce qui a pour conséquence d'augmenter la pression artérielle. Le volume sanguin, dont le contrôle dépend de l'activité rénale, affecte également la pression artérielle : un volume de sang plus grand et confiné dans un système circulatoire à dimension constante exerce d'avantage de pression sur ce système. Au niveau des vaisseaux, des hormones telles que l'Ang II et l'AVP ainsi que l'activité sympathique du SNA peuvent induire la contraction des VSMC et augmenter de la pression artérielle. De façon opposée, l'action de certaines hormones comme la bradykinine et l'activité parasympathique du SNA favorisent la relaxation des VSMC, induisent une vasodilatation et contribuent à diminuer la tension artérielle.

Tel que mentionné, les VSMC forment la couche cellulaire active mécaniquement du système vasculaire, et, sont responsables de réguler la pression artérielle et la distribution du volume sanguin (Tang et Anfinogenova, 2008). Une perte du contrôle de l'activité mécanique de ces cellules peut entraîner, entre autre, de l'hypertension et des complications telles que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale et des maladies cérébrovasculaires (de Gasparo *et al.*, 2000). Également, il est important de noter qu'une diminution de l'élasticité des vaisseaux du système artériel pouvant être causée, entre autre, par l'athérosclérose, contribue à augmenter la pression artérielle et favorise le développement de l'hypertension artérielle (Cecelja et Chowienczyk, 2012). De façon similaire, chez les individus diabétiques, où la glycation des protéines et la formation d'AGE sont augmentés, ces derniers pourraient être en partie responsables du développement de l'hypertension (Singh *et al.*, 2001) puisque les AGE, en favorisant la réticulation des protéines, affecteraient la rigidité de la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins. Ainsi, il est suggéré que les propriétés mécaniques cellulaires et tissulaires pourraient jouer un rôle dans le développement de l'hypertension.

1.1.2.1 Les rôles vasopresseurs de l'angiotensine II et la vasopressine

Plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), tel que le récepteur à l'angiotensine II de type 1a (AT1R) sont impliqués dans la régulation de la contraction cellulaire et de la pression artérielle (Mehta et Griendling, 2007). L'Ang II, l'agoniste du récepteur AT1R, est un vasoconstricteur puissant bien connu pour sa contribution dans le développement de maladies cardiovasculaires (Kim et Iwao, 2000).

L'Ang II est produite à partir de son précurseur l'angiotensinogène qui doit subir une première hydrolyse par la rénine afin de former l'angiotensine I. Cette dernière sera de nouveau hydrolysée en Ang II par l'ACE. En physiologie, les éléments qui entraînent une diminution de la pression artérielle (ex. baisse de la pression sanguine ou du volume sanguin) entraînent la relâche de rénine au niveau des reins afin d'augmenter la production d'Ang II et rétablir l'homéostasie vasculaire. L'Ang II atteint cet objectif de diverses façons: en induisant la contraction des VSMC (Mehta et Griendling, 2007) et en augmentant la production d'aldostérone réduisant ainsi l'excrétion du sodium et de l'eau par le rein ce qui augmente le volume sanguin.

D'ailleurs, le système angiotensinergique est l'une des principales cibles pharmacologiques dans le contrôle de l'hypertension artérielle. En effet, les ACEI (Captopril, Enalapril) ou les ARA (Losartan, Candesartan) sont parmi les médicaments les plus prescrits pour traiter l'hypertension essentielle (Gupta et Guptha, 2010).

La vasopressine, aussi connu sous les appellations arginine vasopressine (AVP) et hormone antidiurétique (ADH), participe à la régulation de la pression sanguine via ses effets positifs sur le volume sanguin et le tonus vasculaire (Holmes *et al.*, 2004). De façon similaire à l'Ang II, les effets de l'AVP se manifestent via l'activation de ses récepteurs qui sont également des GPCR. L'AVP régule le volume sanguin en favorisant la rétention d'eau au niveau des tubules collecteurs des néphrons rénaux via l'activation de son récepteur de type 2 (V2R). Pour ce faire, l'AVP augmente la perméabilité des tubules collecteurs pour l'eau en induisant la translocation des canaux aqueux de type aquaporine (Holmes *et al.*, 2004). L'AVP possède

également des effets modérés sur le tonus vasculaire et induisant la contraction des VSMC via l'activation de son récepteur de type 1 (V1R). Les récepteurs de type 3 (V3R) sont davantage impliqués dans la réponse au stress en induisant la relâche d'ACTH, de prolactine et d'endorphines (Holmes *et al.*, 2004).

L'AVP est sécrétée par l'hypophyse postérieure, mais synthétisée au niveau des neurones des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus. L'AVP est synthétisée à partir de son précurseur : la preproressophysine, qui est hydrolysé en AVP et autres peptides (neurophysine et glycopeptide) à l'intérieur des granules de sécrétion avant leur transport axonal vers l'hypophyse (Holmes *et al.*, 2004). Au niveau physiologique, plusieurs stimuli peuvent induire la relâche d'AVP. Ainsi, une augmentation de l'osmolarité, détectée par les osmorécepteurs de l'hypothalamus, et la baisse de pression artérielle, détectée par les barorécepteurs des veines, des oreillettes et de l'artère carotide; sont les principaux sécrétagogues de l'AVP (Holmes *et al.*, 2004).

1.1.3 L'hypertension

Tel que mentionné précédemment, l'hypertension est une condition médicale où la pression sanguine du système artériel est élevée de façon chronique. Chez l'individu sain, la pression systolique (pendant la contraction des ventricules) varie entre 100-140 mmHg alors que la pression diastolique (lorsque le cœur est au repos ou se dilate) varie entre 60-90 mmHg. L'hypertension est normalement diagnostiquée chez des individus possédant une pression systolique égale ou supérieure à 140 mmHg ou une pression diastolique égale ou supérieure à 90 mmHg (Padwal *et al.*, 2007).

Près de 90 à 95% des personnes souffrant d'hypertension sont atteints d'hypertension primaire ou dite essentielle. Cette dernière est d'ailleurs associée à une pression artérielle élevée sans condition médicale directe. L'hypertension secondaire, quant à elle, est causée par certaines conditions affectant, entre autres, les reins ou le système endocrinien. En plus d'exercer un stress un niveau cardiaque, de mener à l'insuffisance cardiaque et aux maladies coronariennes, l'hypertension est également un facteur de risque pour les accidents

vasculaires cérébraux, les anévrismes de l'aorte, les maladies artérielles périphériques obstructives, l'insuffisance rénale et la rétinopathie (Lewington *et al.*, 2002).

Bien que des changements dans les habitudes de vie (diète faible en sodium, perte de poids et augmentation de l'activité physique) représentent la première ligne de traitement, l'utilisation de médicaments pour contrôler l'hypertension demeure souvent nécessaire. Au Canada, l'utilisation de faibles doses de diurétiques de type thiazide, des bloqueurs de canaux calciques, des bloqueurs de récepteurs β -adrénergiques, des ACEI ou des ARA sont les différentes avenues thérapeutiques privilégiées pour le traitement de l'hypertension (Dasgupta *et al.*, 2014).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'augmentation de la résistance périphérique dans l'hypertension essentielle, toutefois cette dernière fait encore l'objet de recherche active. La plupart des données actuelles impliquent un débalancement des fonctions rénales. Ce débalancement serait principalement causé par des anomalies dans le système rénine-angiotensine et/ou le système nerveux autonome (Navar, 2010). Il est intéressant de noter que la dysfonction endothéliale et l'inflammation vasculaire pourraient également contribuer à l'augmentation de la résistance périphérique et aux dommages vasculaires associés à l'hypertension (Navar, 2010; Zieman *et al.*, 2005).

1.1.4 Le diabète

Les diabètes de type I et de type II sont des désordres métaboliques caractérisés par une hyperglycémie chronique. Plus particulièrement, l'incidence du diabète de type II ne cesse d'augmenter dans la population nord-américaine. Étant donné les diverses complications associées au diabète (insuffisance rénale, cécité et neuropathie périphérique et autres), cette maladie représente une préoccupation majeure pour la qualité de vie et la survie des individus (Forbes et Cooper, 2013). Cette pathologie est causée par le développement d'une résistance des tissus à l'insuline. Cette dernière joue un rôle majeur dans le contrôle du glucose dans l'organisme via l'inhibition de la glycogénolyse ou de la néoglucogénèse. L'insuline stimule également le transport du glucose dans les cellules adipeuses et musculaires ainsi que la

formation de réserves de glucose sous forme de glycogène. Différents facteurs peuvent influencer le développement du diabète de type II tels que les habitudes de vies et la sensibilité génétique des individus.

Le diagnostic du diabète est basé sur une hyperglycémie récurrente ou persistante pouvant être démontrée de diverses façons : une concentration de glucose plasmatique à jeun supérieure ou égale à 7.0 mmol/l, une concentration plasmatique de glucose supérieure ou égale à 11.1 mmol/l deux heures après un charge de glucose de 75g (test de tolérance au glucose), la démonstration de symptômes associés à de l'hyperglycémie et des taux plasmatiques de glucose supérieurs ou égaux à 11.1 mmol/l mesurés de façon récurrente ou une mesure de l'hémoglobine glyquée (Hb A1C) supérieure ou égale à 6.5% (Vijan, 2010).

Le traitement et la prévention du diabète de type II repose principalement sur une diète saine, l'absence de tabagisme et le maintien d'un poids santé. Le diabète de type II peut également être traité à l'aide de diverses médications, et ce, combiné ou non à la prise d'insuline. On retrouve, entre autre, les sulfonylurés (e.g. glyburide et glizipide) qui stimulent la relâche d'insuline par les cellules bêta pancréatiques via l'inhibition de leurs canaux potassiques dépendants de l'ATP. Également, les biguanines (e.g. metformine) diminuent la résistance à l'insuline via un mécanisme d'action au niveau du foie qui n'est pas encore complètement connu. Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase (e.g. acarbose et voglibose) diminuent l'absorbance du glucose au niveau du petit intestin et l'expression des enzymes responsables de la digestion des sucres complexes. Finalement, les thiazolidinediones (e.g. pioglitazone et rosiglitazone) réduisent également la résistance à l'insuline en activant le récepteur PPAR- γ présent au niveau des tissus adipeux et des muscles (Phung *et al.*, 2011).

Il est intéressant de noter qu'au centre des complications associées au diabète, les dommages observés seraient causés par des pertes d'intégrité structurelle et fonctionnelle de la macro et microcirculation (Safar et Lacolley, 2007). D'ailleurs, selon l'agence de santé publique du Canada, en 2010, près des deux tiers des canadiens souffrant de diabète étaient également atteints d'hypertension (Campbell *et al.*, 2011). Toutefois, les mécanismes responsables du développement de l'hypertension dans ces individus demeurent encore à être élucidés. La

recherche intense dans ce domaine a permis de mettre en lumière plusieurs hypothèses reliant diabète et hypertension; telles que les problèmes vasculaires engendrés par l'obésité, l'inflammation, le stress oxydatif et la résistance à l'insuline (Cheung et Li, 2012). Au niveau mécanistique, il est connu que la condition diabétique est caractérisée par l'apparition d'une inflammation diffuse et modérée qui se manifeste dans des niveaux plus élevés de marqueurs inflammatoires locaux ou circulants tels que la protéine C réactive et l'interleukine-6 (Cheung et Li, 2012). Or, au niveau vasculaire, les processus inflammatoires sont connus pour induire la dysfonction endothéliale, interférer avec le phénotype et la fonction des VSMC et induire des dommages vasculaires.

D'ailleurs, l'activité locale accrue du RAS observée chez les individus atteints de diabète, pourrait être également à l'origine de l'induction de la dysfonction vasculaire et le développement de l'hypertension chez ces individus. En effet, l'activation du récepteur AT-1 par l'Ang II au niveau des cellules vasculaires est connue pour son rôle dans l'induction du stress oxydatif et l'initiation de l'inflammation vasculaire. En effet, l'activation d'AT1R stimule l'activité des oxydases du NADH et du NADPH et des voies de signalisation associées à ROCK, PKC et des MAPK. De plus, elle stimule l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires tel que NF- κ B favorisant ainsi la production de ROS et de cytokines proinflammatoires telle que l'interleukine-6 (Jesmin *et al.*, 2010). Il est également connu que l'augmentation locale du système RAS interfère avec l'activité protectrice du récepteur activé par les proliférateurs du peroxydase au niveau vasculaire. Il a été montré que l'Ang II, *via* l'activation d'AT1R, interfère avec l'expression vasculaire des ARNm et des niveaux protéiques des récepteurs de type alpha et gamma (Chawla *et al.*, 2001).

D'un autre côté, il est connu que les conditions d'hyperglycémie chronique associées au diabète sont responsables du dysfonctionnement vasculaire (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Également, dans ces conditions, une réaction lente et délétère entre les protéines et le glucose est favorisée : soit la formation des produits de glycation avancée (AGE). Ces AGE peuvent former des liens covalents entre les protéines ou des modifications sur les protéines pouvant ainsi activer le récepteur des produits de glycation avancée (RAGE) (Bailey *et al.*, 1995). Ainsi, la formation des AGE a été

récemment mise en cause dans certaines pathologies impliquant les vaisseaux, les tendons, l'os, la peau et le cristallin (Yan *et al.*, 2003). Il est donc suggéré que l'hyperglycémie chronique en contexte diabétique entraîne la dysfonction vasculaire via une augmentation dans la formation des AGE et l'activation chronique de RAGE chez les cellules vasculaires.

En effet, l'exposition de cellules endothéliales aux AGE augmente la perméabilité endothéliale en diminuant le nombre de jonctions communicantes et en induisant la réorganisation et la contraction de leur cytosquelette (Wang *et al.*, 2012). De tels changements dans la tension cellulaire et l'état du cytosquelette sont connus pour participer à l'augmentation de la rigidité de l'endothélium et des vaisseaux et mise en cause dans la dysfonction endothéliale et l'hypertension (Reddy *et al.*, 2002). De façon similaire, il est établi qu'une contraction anormale des VSMC peut mener à l'hypertension et ses complications (de Gasparo *et al.*, 2000). Toutefois, le rôle des AGE dans la régulation de la contraction des VSMC demeure à être déterminé.

1.2 Les produits de glycation avancée

Puisque cette thèse porte entre autre sur les effets vasculaires des AGE, il est important de présenter l'origine de ces modifications et la signalisation cellulaire associée à ces molécules. Ainsi, lors de la formation des AGE, les amines primaires des protéines réagissent de façon non-enzymatique avec le glucose, ses produits d'auto oxydation ou les différents intermédiaires de la glycolyse. Plusieurs types de AGE ont été identifiés à ce jour : carboxyméthyl-lysine (CML), carboxyéthyl-lysine (CEL), Pyrraline, Pentoside, etc. (Takeuchi *et al.*, 2000). De plus, les lipides et l'ADN peuvent également être glyqués et d'autres sucres comme le fructose et le ribose peuvent produire des AGE (Singh *et al.*, 2001). À ce jour, les mécanismes de formation de ces AGE ont été étudiés en exposant des protéines comme l'albumine au glucose ou différents intermédiaires de la glycolyse (Takeuchi *et al.*, 2000). Ainsi, En fonction de l'intermédiaire utilisé, on obtient les AGE-1 à -5. Par exemple, CEL, AGE-2 et AGE-4 sont les produits de réaction de la glycolyse alors que CML, AGE-3 et AGE-5 sont les produits de réaction de l'oxydation du glucose. La réaction de Maillard, impliquant l'interaction directe du glucose avec les protéines, engendre les AGE suivants :

CEL, CML, AGE-1, AGE-3, AGE-4 et AGE-5. À cause de leur variété structurelle, les AGE possèdent différentes propriétés physicochimiques. Tel que montré en **Figure 2**, certains AGE peuvent former des liens covalents entre les protéines (GOLD, MOLD, Pentosidine) alors que d'autres sont des modifications libres des chaînes latérales des lysines ou des arginines (CEL, CML, Imidazolones).

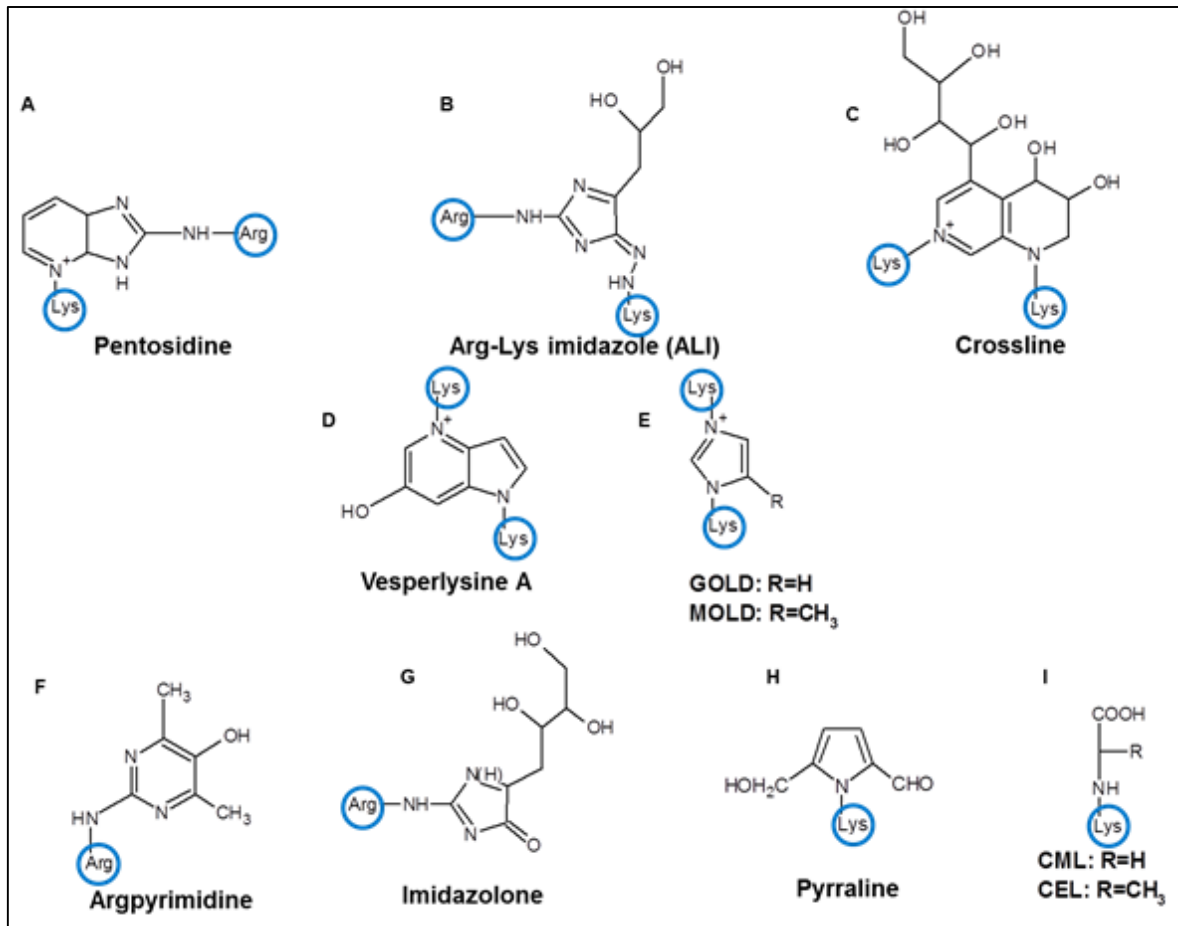


Figure 2. Exemples de structures d'AGE

Diverses structures connues des AGE ont été identifiées à ce jour. Certains AGE (F, G, H et I) sont des modifications libres sur les acides aminés Lysine et Arginine et peuvent agir comme modifications post-traductionnelles ou activer le récepteur RAGE. D'autres AGE (A, B, C, D et E) peuvent former des liens entre les amines primaires des protéines et former des liens intra et intermoléculaires favorisant la réticulation des protéines.

1.2.1 La formation des AGE

La formation des AGE est un processus lent qui comprend 3 étapes clés (**Figure 3**). Les deux premières étapes mènent aux produits de glycation précoces (Base de Schiff et Produit d'Amadori) retrouvés principalement chez les protéines de demi-vie courte ou intermédiaire telles que l'hémoglobine ou l'albumine. D'ailleurs, la mesure de niveau de glycation précoce de ces protéines est utilisée fréquemment afin de suivre le contrôle de la glycémie chez les individus atteints de diabète (Goldstein *et al.*, 2004). Les AGE sont retrouvés davantage sur les protéines structurales de durée de vie prolongée tel que le collagène. Le taux de formation des AGE est, contrairement aux produits précoces, indépendant de la concentration en glucose, mais dépend de la durée de l'hyperglycémie et du temps du renouvellement des protéines. Toutefois, en condition diabétique, les premières étapes de formation des AGE montrent une réversibilité limitée qui est causée par l'hyperglycémie chronique. Dans ces conditions, la concentration des AGE devient proportionnelle à la glycémie sur de longues périodes. De plus, les AGE sont difficilement détruits par les cellules, contrairement aux produits précoces. En effet, le protéasome n'a aucun effet sur les AGE et ceux-ci peuvent s'accumuler dans la cellule, entraîner un dysfonctionnement métabolique et la mort cellulaire (Moheimani *et al.*, 2010). Les AGE formés au niveau extracellulaire peuvent également activer leur récepteur (RAGE) et modifier l'activité de différentes voies de signalisation intracellulaire. Il est important de souligner que ce ne sont pas tous les AGE qui peuvent lier et/ou activer le récepteur RAGE (Horiuchi *et al.*, 2003; Kislinger *et al.*, 1999). Plus précisément, il est rapporté que les structures d'AGE libres comme les CML sont associées à l'activation du récepteur RAGE. Il demeure que les AGE n'activant pas RAGE peuvent s'accumuler et présenter une certaine toxicité et nuire au métabolisme cellulaire comme il a été montré dans la maladie d'Alzheimer (DeGroot *et al.*, 2001).

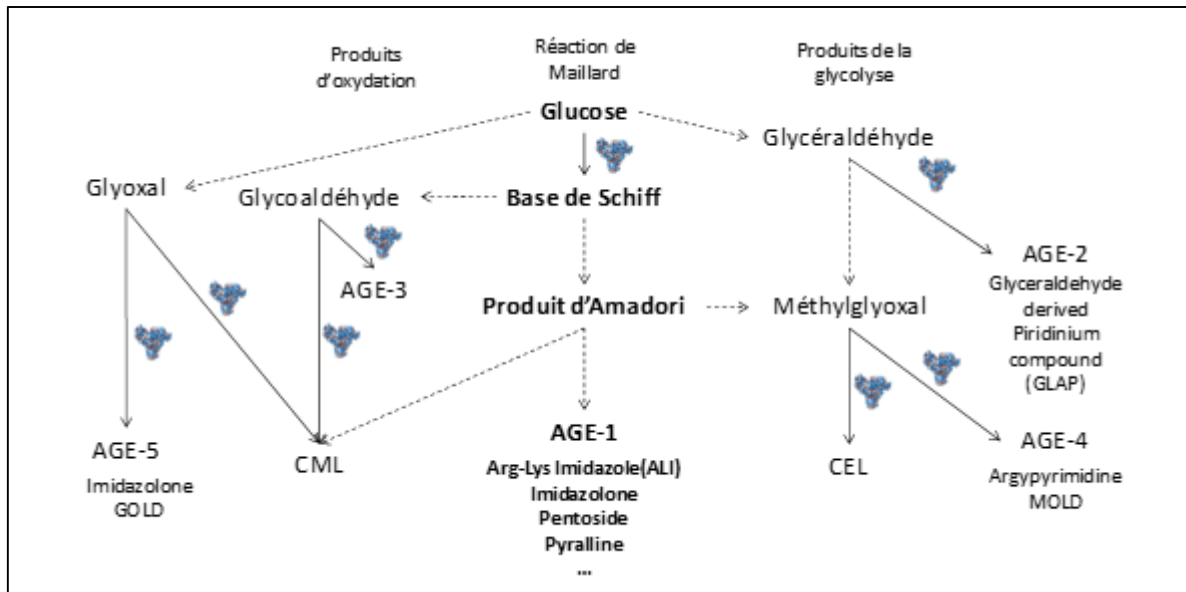


Figure 3. Voies de synthèse des AGE

Les AGE sont principalement issus de la réaction entre les protéines et le glucose. Toutefois, certains produits de la glycolyse (glycéraldéhyde ou méthylglyoxal) ou d'oxydation du glucose (glyoxal ou glycoaldéhyde) sont en mesure de former des AGE. Également, lors de la réaction de Maillard, la base de Schiff et le produit d'Amadori peuvent se scinder et former respectivement les molécules hautement réactives que sont le glyoxal et le glycoaldéhyde. Les AGE1 et CML sont les formes les plus couramment rencontrées et caractérisées.

1.2.2 Les récepteurs des AGE

RAGE est un récepteur de type immunoglobuline exprimé, entre autres, chez les cellules endothéliales, musculaires lisses et les cellules des tissus à base de collagène (Neeper *et al.*, 1992). En plus de certains types de AGE comme les CML, il a également été montré que les protéines HMGB1 (Amphoterin), S100B, S100A7 (psoriasin), S100A15 (koebnerisin), S100P, Amyloide- β , Mac-1 et les phosphatidylserines sont aussi capables d'activer RAGE à divers degrés (Fritz, 2011). En plus d'être exprimé à la membrane cellulaire, RAGE existe également sous forme soluble. Cette dernière serait impliquée dans la neutralisation et l'élimination des AGE. Deux mécanismes sont responsables de réguler l'expression des formes solubles du récepteur : soit un épissage alternatif de l'ARNm codant pour la forme pleine longueur de RAGE, ou, l'hydrolyse du récepteur exprimé à la surface cellulaire par les métalloprotéases ADAM10/MMP9 (Zhang *et al.*, 2008). D'autres récepteurs des AGE ont été aussi identifiés : SR-A (Macrophage scavenger receptor Type I and II), OST-48 (Oligo saccharyl transferase-4 ou AGE-R1), 80 K-H phosphoprotein (Protein kinase C substrate ou AGE-R2), Galectin-3 (AGE-R3), LOX-1 (Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1) et CD-36. Toutefois, ces derniers seraient impliqués dans la clairance et l'élimination des AGE plutôt que dans l'activation de voies de signalisation cellulaires (Horiuchi *et al.*, 2003).

1.2.3 La signalisation associée à l'activation de RAGE

Tel que montré à la **Figure 4**, l'activité de RAGE est associée à l'activation des petites protéines G Cdc42, Rac et Ras membres de la famille Rho (Hall, 1998). D'ailleurs, l'activation de Rho est principalement impliquée dans la formation des fibres de stress et la contraction actine-myosine indépendante du calcium. Rac est impliqué dans la formation des lamellipodes et Cdc42 dans celle des filipodes (Schmitz *et al.*, 2000). Également l'activation de RAGE induit la signalisation dépendante des protéines de la famille des MAPK (ERK, SAPK/JNK et p38), Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT et JAK/STAT (Goldin *et al.*, 2006). Cette signalisation est responsable de l'activation de facteurs de transcription tel que NF- κ B qui est associé à la transcription de multiples gènes pro-inflammatoires ainsi que

différentes protéines d'adhésion cellulaire. L'activation de RAGE provoque aussi un important stress oxydatif cellulaire (Yan *et al.*, 1994) via la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) qui favorise également l'activation de NF- κ B. Il est important de mentionner que l'expression de RAGE est sous le contrôle d'une boucle positive de renforcement: plus il est stimulé, plus il est exprimé (Fiuza *et al.*, 2003). Ainsi, ce dernier pourrait être un joueur potentiel dans le maintien de l'inflammation chronique en condition diabétique.

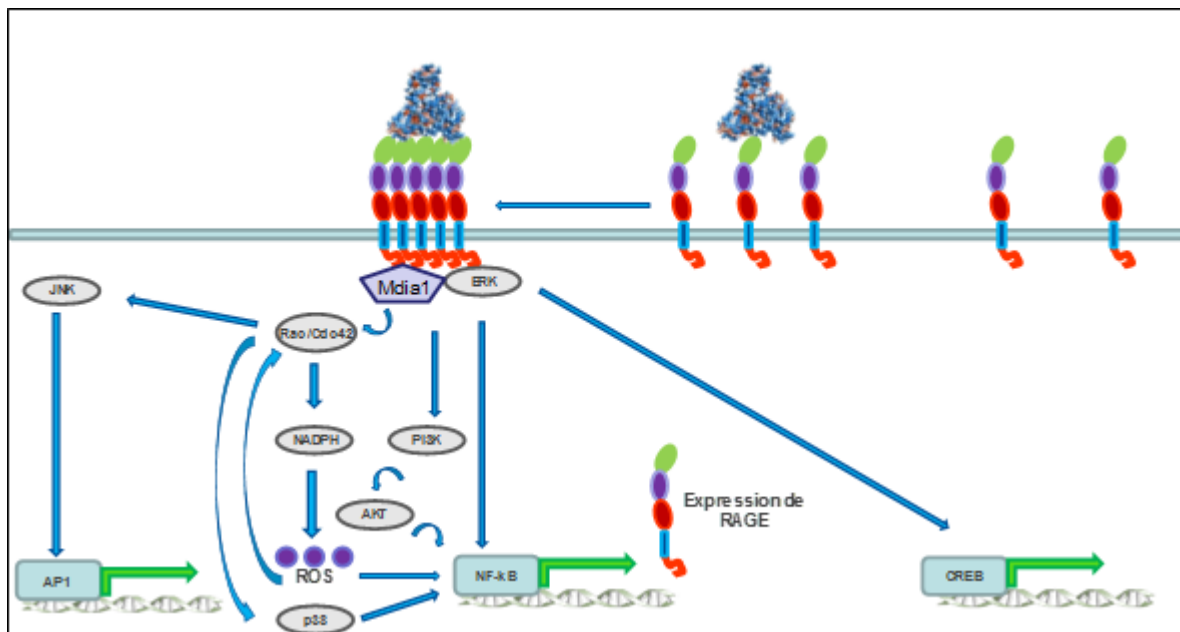


Figure 4. Voies de signalisation activées par RAGE

La liaison des AGE à leur récepteur RAGE entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation telles que PI3K/AKT et ERK 1/2. Ce dernier, permet la translocation des facteurs de transcription CREB et NF- κ B au niveau nucléaire affectant le profil d'expression génétique de la cellule exposée. Les petites protéines G Rac et Cdc42 sont également activées via la protéine adaptatrice mDia1. À leur tour Rac et Cdc42 sont en mesure de stimuler les MAPK JNK et P38 qui sont impliquées respectivement dans l'activité des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Ce dernier est régulé positivement par les ROS produits lors de l'activité de l'enzyme NADPH également activée par les petites protéines G Rac et Cdc42. Il est intéressant de mentionner que ces dernières sont également régulées positivement par les ROS entraînant une boucle de renforcement positive.

1.2.4 Les rôles physiopathologiques de RAGE

À l'exception du stage embryonnaire où RAGE est exprimé de façon constitutive, RAGE est exprimé faiblement chez l'adulte (Brett *et al.*, 1993). Chez les cellules adultes différenciées on le retrouve, entre autre, au niveau des cardiomyocytes, des neurones, des cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales et musculaires lisses du système vasculaire (Brett *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1993). Tel que mentionné précédemment, chez l'adulte, l'expression de RAGE est régulée par l'accumulation de ses ligands ou la présence soutenue de médiateurs de l'inflammation puisque son expression est renforcée par son effecteur principal le facteur de transcription NF- κ B (Huttunen *et al.*, 1999). Il est intéressant de mentionner que RAGE est toutefois exprimé de façon constitutive chez l'adulte au niveau de la peau et des poumons. Néanmoins, la fonction de RAGE au niveau de ses organes demeure encore à être identifiée (Ostendorp *et al.*, 2007).

En plus de son rôle suspecté dans les complications vasculaires associées au diabète, plusieurs études ont montré que l'expression de RAGE est impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires suggérant ainsi un rôle de ce récepteur dans l'induction et le maintien des processus inflammatoires (Bierhaus *et al.*, 2006; Clynes *et al.*, 2007). En effet, la présence de RAGE a été identifiée au niveau de plusieurs cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation chronique tels que les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes et les cellules dendritiques (Chen *et al.*, 2008; Gebhardt *et al.*, 2008). Même si la participation de RAGE a été identifiée dans les processus d'inflammation aiguë et chronique, les mécanismes reliant RAGE à l'un ou l'autre de ces processus demeurent toujours à être clairement identifiés.

L'activation de RAGE a été impliquée dans le développement de plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose (Basta *et al.*, 2004), la maladie d'Alzheimer (Miller *et al.*, 2008), l'arthrite (Drinda *et al.*, 2005), les maladies respiratoires telles que le syndrome respiratoire aiguë et l'asthme (Milutinovic *et al.*, 2012; Reynolds *et al.*, 2010) ; et le sepsis (Liliensiek *et al.*, 2004). Grâce au développement de souris RAGE $-/-$, l'implication de RAGE a pu être confirmée dans plusieurs de ces pathologies. Ainsi, il a été montré que l'implication de RAGE

a été confirmée dans un modèle d'athérosclérose. En effet chez les animaux RAGE *-/-* ayant subi une lésion artérielle, il a été montré que ces derniers présentaient une diminution significative de l'expansion néointimale pouvant être corrélée avec une diminution de la prolifération et de la migration des VSMC (Sakaguchi *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que l'accumulation d'amyloïde- β , au niveau des neurones issus de souris RAGE *-/-* ou de souris de type sauvage traités avec la forme soluble de RAGE, était diminuée. Ainsi, cet avantage concédait aux neurones une protection contre la dysfonction mitochondriale normalement associée avec l'accumulation d'amyloïde- β dans la maladie d'Alzheimer (Takuma *et al.*, 2009). Également, la délétion de RAGE diminuait la mortalité induite par hypoxie et les caractéristiques associées au syndrome respiratoire aigu induit par hypoxie (Reynolds *et al.*, 2010). Dans un modèle d'asthme induit par la poussière d'acarien ou par l'ovalbumine, il a été montré que la délétion de RAGE chez la souris permettait de prévenir le remodelage des voies respiratoires l'infiltration des éosinophiles et l'hypersensibilisation des voies respiratoires à ces agents (Milutinovic *et al.*, 2012). Finalement, dans un modèle de sepsis murin, un taux de survie supérieur a été observé chez les souris RAGE *-/-* comparativement aux contrôles de type sauvage (Liliensiek *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter, qu'à ce jour aucune étude n'a confirmé le rôle de RAGE dans les complications cardiovasculaires associées au diabète dans le modèle RAGE *-/-*.

1.2.5 Les antagonistes de RAGE

À ce jour, il n'existe pas d'antagonistes connus pour bloquer l'interaction entre RAGE et les AGE, toutefois, quelques molécules ont été développées dans le but de bloquer l'interaction entre ce récepteur et d'autres ligands connus tels que HMGB1, la famille des protéines S100 et l'amyloïde- β . Il a été rapporté, entre autre, que l'administration d'un peptide correspondant aux acides aminés 150-183 de la partie c-terminale de HMGB1 bloque l'interaction entre RAGE et HMGB1. De plus l'administration de ce peptide a été en mesure d'inhiber la migration et la transmigration de cellules cancéreuses du poumon et la progression du cancer du poumon dans un modèle animal (Huttunen *et al.*, 2002). De façon similaire, le RAP, ou *RAGE Antagonist Peptide*, est un peptide dérivé de la protéine S100P qui agit comme antagoniste compétitif pour les ligands S100P, S1004A et HMGB-1 envers RAGE. Sa

découverte est basée sur l'identification d'un domaine conservé entre S100P et HMGB1 qui est impliqué dans la reconnaissance de RAGE. D'ailleurs, il a été montré que l'administration de RAP *in vivo* diminue la signalisation NF- κ B associée à RAGE et la croissance des tumeurs gliales chez la souris (Arumugam *et al.*, 2012).

Finalement, le FPS-ZM1, découvert par le groupe de Deane *et al.*, est un composé contenant une amine tertiaire découvert à partir d'un criblage d'une banque de molécules visant à inhiber la liaison de l'amyloïde- β à RAGE. En effet, il est connu que l'activation de RAGE au niveau du système nerveux central entraîne l'inflammation et de la mort neuronale (Deane *et al.*, 2012). Ainsi, cette molécule montrant une toxicité très faible et perméable à la barrière hématoencéphalique lie avec une haute affinité le domaine variable de RAGE et bloque l'interaction entre RAGE et ses ligands amyloïde- β , la famille des protéines S100 et HGMB1. D'ailleurs, dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, l'administration de FPS-ZM1 diminue la formation de plaques amyloïdes et rétablit les paramètres cognitifs chez les animaux traités (Deane *et al.*, 2012). À ce jour, la plupart des études cliniques visant RAGE ont été réalisées dans le but de prévenir la progression de la maladie d'Alzheimer. Malheureusement, les PF-04494700 (Sabbagh *et al.*, 2011), TTP488 (Burstein *et al.*, 2014) ou TTP4000 (Lue *et al.*, 2009), bien que sécuritaires, n'ont pas eu des effets significatifs dans le traitement de cette maladie.

1.3 La contraction cellulaire

Puisque les travaux présentés dans cette thèse portent sur les mécanismes de régulation de la contraction cellulaire, il est important de présenter les différents éléments impliqués dans cette activité. Ainsi, la contraction des cellules est principalement initiée et régulée par l'activation de récepteurs exprimés à leur surface. Il est également connu que l'application de forces mécaniques sur la cellule peut induire leur contraction via l'activation de voies de signalisation liées aux intégrines (de Rooij *et al.*, 2005). Également, la dépolarisation membranaire des cellules excitables, causée par l'arrivée d'un potentiel d'action ou

l'ouverture de canaux ioniques sensibles aux forces mécaniques, peut induire la contraction cellulaire (Webb, 2003).

Il existe différents modèles d'étude de la contraction cellulaire. Ainsi, la contraction des fibroblastes est particulièrement intéressante dans l'étude des mécanismes de réparation des blessures (Valero *et al.*, 2014). La contraction des cellules musculaires lisse d'origine vasculaire, permet d'étudier les mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation de la pression artérielle (Abou-Saleh *et al.*, 2013). Également, l'utilisation de modèles cellulaires simples comme les cellules embryonnaires humaines du rein (HEK293) ou les cellules ovarienne de hamster chinois (CHO) sont des modèles intéressants, car ces dernières peuvent facilement être génétiquement altérées afin d'augmenter ou diminuer l'expression de récepteurs, de protéines ou d'enzyme spécifiques pouvant être potentiellement impliquées dans la contraction cellulaire (Boccellino *et al.*, 2000; Cuerrier *et al.*, 2009; Simard *et al.*, 2013).

La régulation de la contraction dans les cellules dépend principalement de la phosphorylation des chaînes légères (20 kDa) de la myosine (MLC). La phosphorylation de la myosine permet l'interaction entre le cytosquelette d'actine et le moteur cellulaire qu'est la myosine (Unbekandt et Olson, 2014). D'ailleurs, la phosphorylation de MLC est le marqueur biochimique couramment utilisé pour mesurer la contraction cellulaire. Une fois activée, la myosine est en mesure d'osciller entre deux conformations grâce à son activité ATPase. Dans un premier temps, elle peut lier l'actine et dans un second temps elle subit un changement conformationnel majeur qui génère la force nécessaire pour entraîner le glissement de l'actine et la contraction cellulaire (Unbekandt et Olson, 2014).

1.3.1 Le rôle du calcium dans la contraction cellulaire

Le calcium joue un rôle central dans la contraction cellulaire bien qu'il soit possible d'induire la contraction de façon indépendante du calcium, entre autre, via l'activation de Rho (Saiman *et al.*, 2013). Le calcium joue deux rôles principaux : favoriser l'interaction entre l'actine et la myosine, et, activer la myosine. Le calcium remplit ces rôles via son interaction avec la calmoduline, une protéine de 17 kDa activée par l'augmentation des concentrations de

calcium cytosolique. Une fois activé, le complexe calcium/calmoduline peut interagir avec des protéines comme la caldesmone, la tropomyosine ou la calponine présentes sur l'actine afin de les déloger et favoriser l'interaction entre l'actine et la myosine (Roman *et al.*, 2014). Toutefois, le rôle principal du complexe calcium/calmoduline réside dans sa capacité d'activer la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). En effet, la MLCK est responsable de la contraction cellulaire dépendante du calcium via la phosphorylation de la MLC et l'activation subséquente du moteur actine-myosine (Hong *et al.*, 2011).

L'augmentation du calcium cytosolique dépend de la relâche du calcium contenu dans la réserve intracellulaire de calcium (respectivement le réticulum endoplasmique et sarcoplasmique chez la cellule non musculaire et musculaire) et de l'entrée du calcium extracellulaire via différents types de canaux (Striggow et Ehrlich, 1996). De façon typique (**Figure 5**), la relâche des réserves intracellulaire de calcium peut se faire via l'effet d'agonistes tels que l'Ang II et l'AVP qui, en activant leurs récepteurs couplés aux protéines Gαq/11, vont induire l'activation de la phospholipase C. Cette dernière hydrolyse le lipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en deux puissants seconds messagers : l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et le diacylglycerol (DG). La liaison de l'IP3 à ses récepteurs-canaux situés sur le réticulum entraîne la relâche des réserves intracellulaire de calcium vers le cytosol (Striggow et Ehrlich, 1996).

L'augmentation du calcium cytosolique peut également dépendre de l'activation de récepteurs-canaux (entrée ROC) retrouvés au niveau de la membrane plasmique de certains types cellulaires. Ainsi les récepteurs NMDA et AMPA du glutamate ou les TRPV ou TRPM, activés respectivement par le chaud et le froid, permettent l'entrée du calcium extracellulaire lorsque activés (Urena *et al.*, 2013). Chez la cellule excitable, la dépolarisation membranaire peut également permettre l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (entrée VOC) retrouvés au niveau de la membrane plasmique cellulaire (Urena *et al.*, 2013). Chez la cellule non-excitable, bien que présents également chez la cellule musculaire, l'ouverture des canaux dépendants des réserves de calcium (entrée SOC) retrouvés sur la membrane plasmique est principalement responsables de l'entrée du calcium extracellulaire (Birnbaumer, 2009). Ainsi, la diminution des réserves intracellulaire de calcium, détectée par

les protéines STIM1 et STIM2, permet l'ouverture de canaux tels qu'Orai1, assurant ainsi le maintien des concentrations élevées de calcium cytosolique nécessaire à la contraction cellulaire (Potier et Trebak, 2008). D'ailleurs il a été montré que l'entrée de calcium dépendante des SOC joue un rôle direct dans la contraction cellulaire, entre autre au niveau de la contractilité des cardiomyocytes (Nguyen *et al.*, 2013). Les excédents de calcium seront quant à eux expulsés de la cellule via l'activité de la pompe calcique dépendante de l'ATP retrouvée à la membrane plasmique (PMCA) et l'échangeur sodium/calcium. Finalement, le remplissage ultérieur des réserves intracellulaires de calcium est coordonné par la pompe calcique dépendante de l'ATP retrouvée au niveau du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique (SERCA).

Il est intéressant de noter que le calcium, conjointement avec le DAG, active la protéine kinase C (PKC) qui, de façon générale, favorise la contraction cellulaire en phosphorylant diverses protéines qui régulent l'interaction entre l'actine et la myosine ainsi que l'activité de cette dernière. De plus, la PKC peut phosphoryler les canaux calciques sensibles au voltage VOCC et ainsi diminuer leur seuil d'activation de façon à faciliter leur ouverture et l'entrée de calcium extracellulaire.

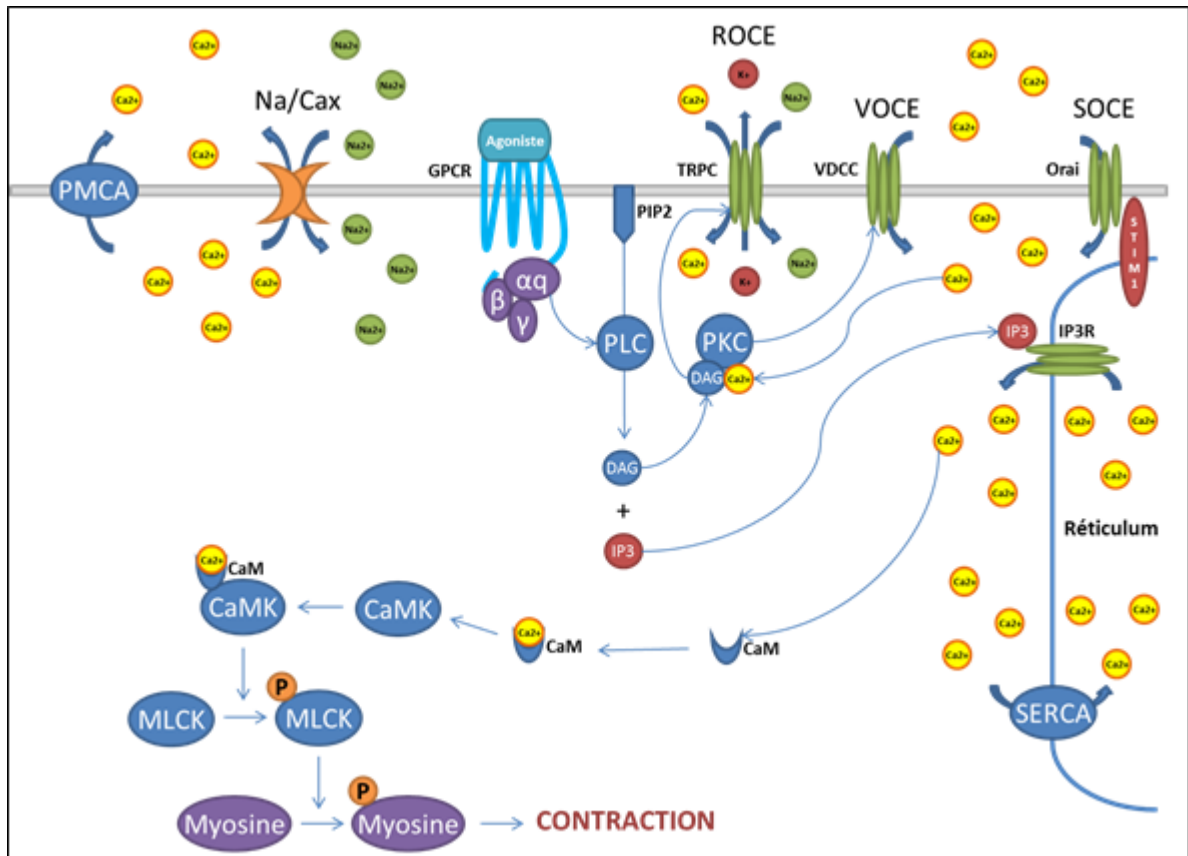


Figure 5. Rôle de la signalisation calcique dans la contraction cellulaire

Schéma illustrant la signalisation typique associée à la contraction cellulaire et mettant en évidence le rôle du calcium. Ainsi, l'activation d'un récepteur, typiquement un GPCR couplé à la protéine $G_{\alpha q/11}$ tel qu'AT1aR, ou la dépolarisation d'une cellule excitable entraînent l'augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation est en mesure d'activer la CaMK via son interaction avec le complexe calcium/calmoduline préformé. La kinase CaMK activée peut alors phosphoryler et activer la MLCK. Une fois phosphorylée par MLCK, la myosine est en mesure de lier les filaments d'actine et induire la contraction cellulaire.

1.3.2 Le moteur actine-myosine et sa régulation

Tel que mentionné précédemment, la myosine qu'elle soit d'origine musculaire ou non, est régulée via la phosphorylation de ses chaînes légères (Ikebe *et al.*, 1999). Cette phosphorylation peut être catalysée par la MLCK, mais également par l'activité de la kinase activée par Rho (ROCK) (Amano *et al.*, 1996). Par ailleurs, la déphosphorylation de MLC, qui entraîne l'inhibition de la contraction cellulaire, est sous le contrôle de la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP). Cette phosphatase est composée de trois sous-unités : un domaine phosphatase (PP1C), un domaine régulation et de liaison à la myosine (MYPT) et une chaîne légère de 20 kDa (ML20) de fonction encore inconnue (Hartshorne *et al.*, 1998).

Récemment, il a été proposé que la contraction cellulaire et la migration cellulaire dépendent d'une fine régulation de la myosine oscillant entre sa forme native et phosphorylée (Matsumura et Hartshorne, 2008). Ainsi ce cycle métabolique de phosphorylation de la MLC est régulé en partie par la MLCP, mais également par la protéine ROCK qui inhibe l'activité de MLCP en phosphorylant son domaine MYPT (**Figure 6**) (Lincoln, 2007). De surcroît, plusieurs autres kinases peuvent phosphoryler MYPT. Entre autres, on retrouve la kinase reliée aux intégrines (ILK), la kinase activée par p21 (PAK), la kinase contenant un domaine d'interaction de type glissière à leucine (ZIPK), la kinase impliquée dans la dystrophie myotonique (DMPK), raf-1 et la kinase relative à ZIP (Broustas *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2001; Muranyi *et al.*, 2001; Niirō *et al.*, 2003; Takizawa *et al.*, 2002). Finalement, la phosphorylation de la protéine CIP-17 par la PKC participe également à l'inhibition de la MLCP. Une fois phosphorylée, CIP-17 peut se lier au domaine PP1C de MLCP forçant son départ du complexe hétérotrimérique laissant MLCP dépourvue son domaine catalytique (Kolosova *et al.*, 2004).

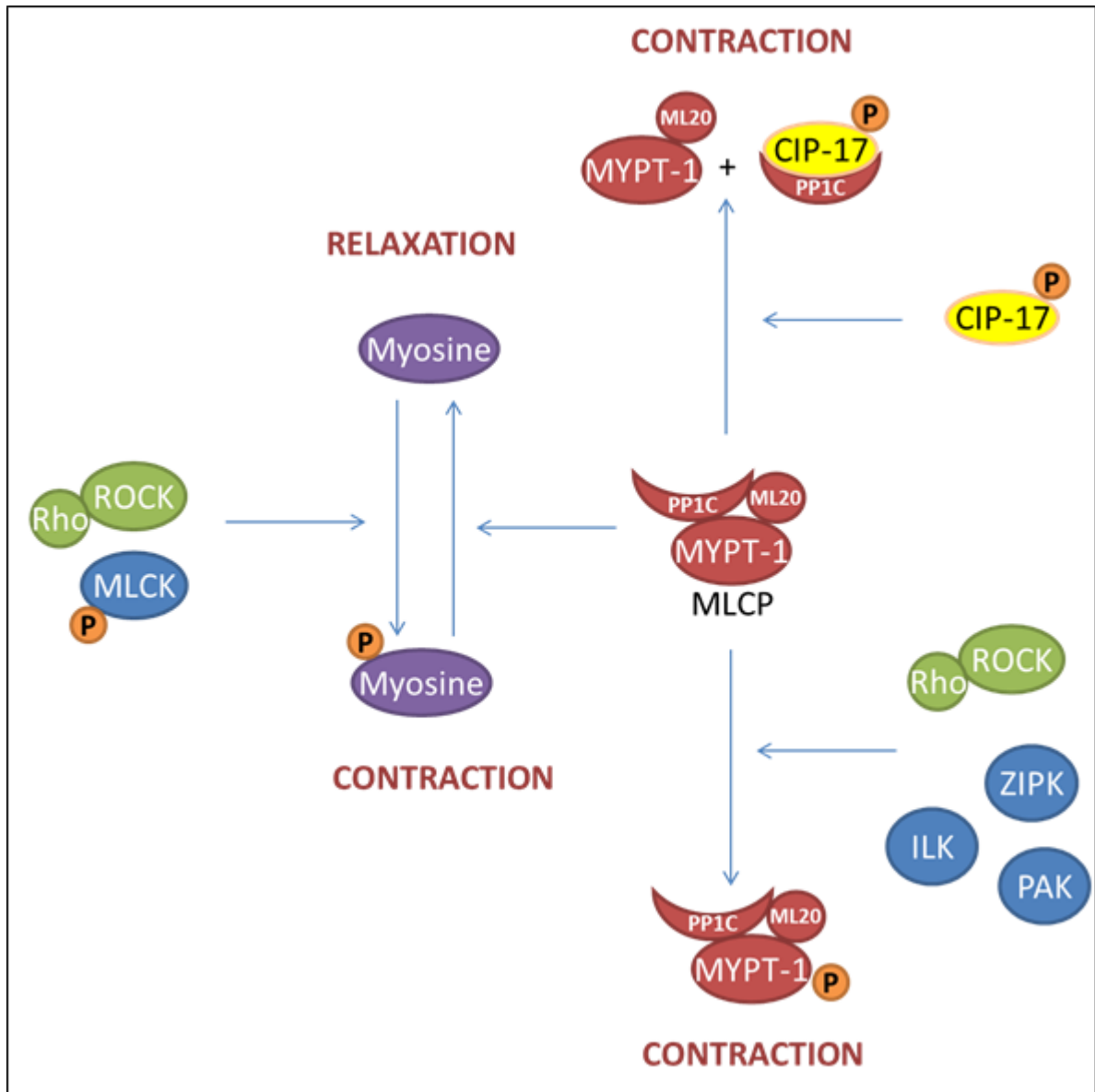


Figure 6. Mécanismes de régulation de la phosphorylation de la myosine

Schéma illustrant les différents mécanismes contrôlant la contraction cellulaire assurée par la phosphorylation de la myosine. La phosphorylation de la myosine par les kinases ROCK et MLCK favorise son interaction avec l'actine et induit la contraction cellulaire. D'un autre côté, l'activité de la MLCP inhibe la phosphorylation de la myosine ce qui favorise la relaxation cellulaire. L'inhibition de la MLCP via sa phosphorylation par des kinases telles que ROCK, ZIPK, ILK et PAK induisent la contraction cellulaire en favorisant l'état phosphorylé de la myosine. De façon similaire, l'interaction de CIP-17 phosphorylé par la PKC inhibe le domaine phosphatase de MLCP et induit la contraction cellulaire.

Il est intéressant de noter qu'en fonction du modèle cellulaire, l'implication relative de ROCK ou MLCK dans la contraction cellulaire peut varier. En effet, au niveau cellules musculaires, le rôle dominant de la voie calcium/calmoduline/MLCK dans la contraction cellulaire induite par l'activation d'AT1aR (Mehta et Griendling, 2007) a été montré à plusieurs reprises. Cependant, chez les fibroblastes et plusieurs autres types de cellules non excitables, la voie Rho A/ROCK semble être davantage associée à la contraction cellulaire (Emmert *et al.*, 2004; Kolodney *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002; Samarin *et al.*, 2007).

1.3.3 Le cytosquelette et son implication dans la contraction

En plus de la phosphorylation de MLC, la contraction cellulaire implique généralement une réorganisation et/ou un remodelage du cytosquelette. Bien que l'organisation du cytosquelette soit responsable de la morphologie cellulaire, elle influence également les paramètres mécaniques de la cellule tels que sa rigidité et sa capacité à générer des forces nécessaires pour la contraction ou la migration.

Il existe trois degrés d'organisation du cytosquelette : les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments. Les filaments intermédiaires sont de nature stable. Ils assurent la structure tridimensionnelle de la cellule, permettant l'ancrage des organelles et servant, entre autre, de composantes structurales pour la lamina nucléaire. Ils participent également dans certains types de jonctions cellulaires et à l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire. Les microtubules, quant à eux, sont formés de tubuline (α et β) et sont organisés par les centrosomes. Ils participent au transport cellulaire des vésicules et organelles qui sont associées à la kinésine et la dynamine (Fletcher et Mullins, 2010). Finalement, les microfilaments sont formés de polymères linéaires d'actine et sont responsables de la génération des forces de contraction dans la cellule via leur cycle d'assemblage et de dépolymérisation, et, via l'action de la myosine qui entraîne leur glissement (Cooke, 2004).

Ainsi, lors de la migration, le principal mécanisme de génération de force se fait via l'élongation de l'actine au front de migration, le désassemblage des microfilaments à

l'opposé et l'activité concomitante de la myosine (Le Clainche et Carlier, 2008). Le contrôle des structures d'actine est assuré par les petites protéines G membres de la famille Rho. Lors de la migration, Rac est impliqué dans la formation des lamellipodes alors que Cdc42 dans celle des filipodes (Schmitz *et al.*, 2000). Dans la contraction cellulaire, c'est la voie Rho qui est principalement impliqué dans la formation des fibres de stress et la contraction actomyosine indépendante du calcium via l'activation de ROCK. D'ailleurs, il existe plusieurs indices suggérant que la polymérisation de l'actine est également impliquée dans la contraction des VSMC (Bernard, 2007; Chen *et al.*, 2006; Maekawa *et al.*, 1999; Tsai et Jiang, 2006). En effet, c'est la balance entre les processus favorisant la polymérisation et le désassemblage des filaments d'actine qui détermine l'expansion ou la rétraction locale du cytosquelette (Grosse et Vartiainen, 2013). Ainsi lorsque ROCK est activé ce dernier active également la kinase LIM. Cette dernière inhibe à son tour l'activité de la cofiline, une protéine impliquée dans la dépolymérisation de l'actine (Bernard, 2007). La résultante: la polymérisation d'actine est favorisée et les fibres de stress nécessaires à la contraction cellulaire sont alors formées.

1.4 L'angiotensine II, un régulateur de la contraction cellulaire

Tel que mentionné précédemment, le système angiotensinergique joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et l'hypertension. Puisque cette thèse s'intéresse, entre autre au rôle de la signalisation d'AT1R dans la contraction cellulaire, il est important de revisiter la signalisation associée à l'activation de ce récepteur. Ainsi, l'Ang II exerce ses effets via deux GPCR : AT1R et AT2R. AT2R est un GPCR principalement exprimé au niveau fœtal dont l'expression est restreinte à quelques organes chez l'adulte tels que le cerveau, les glandes surrénales, le cœur, le myomètre et les ovaires. Toutefois, son expression peut être induite chez l'adulte au niveau des systèmes vasculaire et nerveux suite à une blessure ou lors de la guérison des plaies; suggérant un rôle de ce récepteur dans le remodelage tissulaire, la croissance et le développement (Hu et Lazar, 2000). À ce jour, sa signalisation est toujours peu caractérisée; toutefois, il a été rapporté que ce GPCR serait couplé à la protéine Gi et son activation serait responsable de contrôler l'activité de plusieurs phosphatases, de réguler le système monoxyde d'azote/guanosine monophosphate cyclique

et de stimuler la phospholipase A2 et la relâche d'acide arachidonique. De façon générale, les effets physiologiques d'AT2R seraient anti-prolifératifs et pro-apoptotiques et principalement dépendant de l'activité de phosphatases telles que SHP-1 et PP2A dont l'activité entraîne l'inhibition des MAPK ERK 1/2.

Les effets physiologiques et physiopathologiques de l'AngII au niveau vasculaire sont principalement associés à l'activation du récepteur de type 1. Ce dernier est couplé principalement aux protéines Gαq/11 et signale via ses effecteurs: la phospholipase C (PLC) et la protéine kinase C (PKC) (de Gasparo *et al.*, 2000). De plus, il a été montré qu'AT1aR est également couplé à la protéine Gα12/13 qui est responsable de l'activation de la petite protéine G Rho; connue pour son rôle dans la réorganisation du cytosquelette (Barnes *et al.*, 2005). Comme la plupart des GPCR, suivant l'activation d'AT1aR, les β-arrestines sont également recrutées afin de permettre sa désensibilisation via son endocytose par le recrutement de la clathrine et d'AP-2 (Goodman *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1999). Les β-arrestines agissent également comme protéines d'échafaudage (Goodman *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1999) pouvant induire l'activation de plusieurs autres voies de signalisation (Xiao *et al.*, 2007). Par exemple, les β-arrestines activent la voie des kinases activées par les protéines mitogéniques (MAPK) (Wei *et al.*, 2004).

1.4.1 Les rôles physiopathologiques de la signalisation des β-arrestines

Ainsi, les GPCR comme AT1aR activent une panoplie de voies de signalisation impliquant à la fois les protéines G et les β-arrestines. Il est intéressant de noter que des réponses biologiques spécifiques sont de plus en plus associées à des pathologies ou des voies de signalisation spécifiques. Parmi les nombreux effets associés aux β-arrestines, il est connu qu'une mutation dans l'arrestine visuelle est responsable de la maladie d'Ogushi, où les individus perdent la vision nocturne (Baylor et Burns, 1998). De façon similaire les signaux pro-apoptotiques associés à l'arrestine visuelle constitutivement active à cause d'une mutation au niveau des photorécepteurs seraient à l'origine de la dégénérescence rétinienne (retinitis pigmentosa) (Song *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007). Au niveau du système dopaminergique, la signalisation de β-arrestine-2 serait impliquée dans l'hyperactivité

locomotrice de la dopamine ce qui expliquerait les effets de certains antipsychotiques comme le lithium, car ce dernier inhiberait l'interaction entre la de β -arrestine-2 et la kinase AKT (Beaulieu *et al.*, 2008). Au niveau cardiovasculaire, la signalisation des β -arrestines associée à l'activation du récepteur AT1aR stimule, entre autre la prolifération des cardiomyocytes sans induire d'hypertrophie (Aplin *et al.*, 2007). De plus, cette même signalisation induit des effets inotropes (force de contraction) et lusitropes (relaxation cardiaque) positifs au niveau des cardiomyocytes (Rajagopal *et al.*, 2006). Toutefois, la signalisation β -arrestine d'AT1aR au niveau du cortex surrénalien favorise la production d'aldostérone ce qui peut contribuer au remodelage cardiaque et la progression de l'insuffisance cardiaque (Lymperopoulos *et al.*, 2009). Ces rôles associés à la signalisation des β -arrestines ne sont que quelques exemples parmi ceux rapportés dans la littérature. En effet, l'activité des β -arrestines indépendante de la signalisation des protéines G a été impliquée dans l'hypertrophie et l'hyperplasie des VSMC, le remodelage osseux, la réponse immunitaire, la chimiotaxie, la croissance tumorale, la migration cellulaire et la régulation du métabolisme (Luttrell et Gesty-Palmer, 2010). Finalement, au niveau cellulaire, il est intéressant de mentionner que malgré le lien établi entre les β -arrestines, l'activation de ROCK et le réarrangement du cytosquelette (Barnes *et al.*, 2005) aucune corrélation n'a encore été établie entre les β -arrestines, la régulation de la phosphorylation de MLC et la contraction cellulaire.

1.4.2 L'importance du concept de signalisation biaisée

Alors que les agonistes activent l'ensemble des voies de signalisations associées à leurs récepteurs, les ligands biaisés possèdent une sélectivité fonctionnelle. En effet, ces derniers activent de façon spécifique certaines voies de signalisations associées à leurs récepteurs. De façon générale, le degré d'activation des voies de signalisation est unique au ligand engagé sur le récepteur (Simmons, 2005). C'est d'ailleurs la découverte de plusieurs ligands biaisés tels que le [Sar¹, Ile⁴, Ile⁸]-Angiotensine II (SII) pour AT1aR, [D-Trp¹², Tyr³⁴]-PTH[7-34] pour le récepteur de l'hormone parathyroïdienne de type 1 ou ICI118551 pour le récepteur β_2 adrénergique (Luttrell et Gesty-Palmer, 2010) qui est à l'origine des principales percées associées aux effets cellulaires spécifiques des β -arrestines. Ainsi l'utilisation de tels ligands permet, d'une part, de mieux caractériser les effets biologiques de voies de signalisation

spécifiques associées à un récepteur. Dans ce contexte, le SII qui active de façon spécifique la voie des β -arrestines dépendante du récepteur AT1aR (Wei *et al.*, 2003) est un outil particulièrement intéressant utilisé dans cette thèse afin d'étudier la contribution des β -arrestines dans la contraction associée à l'activation de ce récepteur.

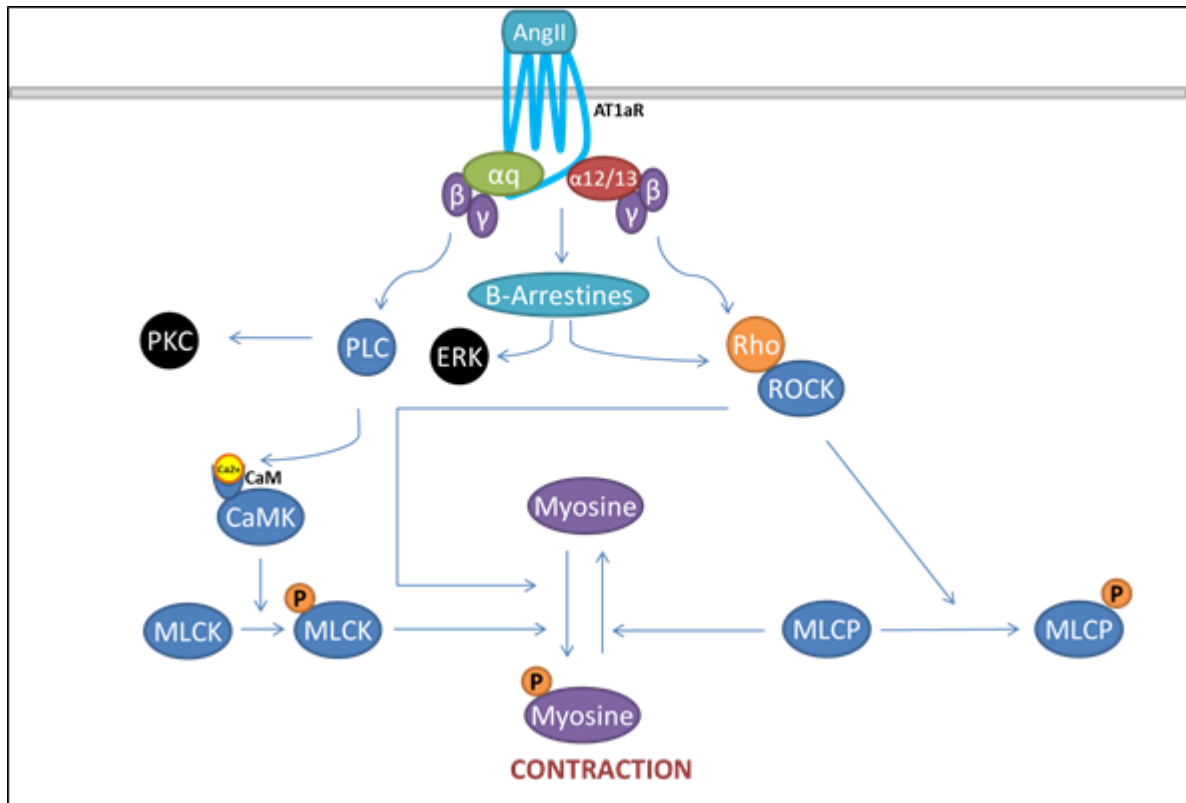


Figure 7. Signalisation du récepteur AT1 de l'Ang II

Schéma illustrant la signalisation du récepteur AT1 couplé aux protéines $G_{\alpha q/11}$ et $G_{12/13}$. La liaison de l'Ang II à AT1aR mène à l'activation des voies PLC/PKC responsables de l'augmentation intracellulaire de calcium et de l'activation de la MLCK. Également, les voies Rho/ROCK participent à la contraction cellulaire en activant la myosine et en inhibant la MLCP. Finalement, les β -arrestines sont également activées afin d'internaliser/désensibiliser le récepteur AT1 et stimuler les voies Rho/ROCK ainsi que ERK 1/2. En dépit de leur rôle sur la voie Rho/ROCK, la participation des β -arrestines dans la contraction cellulaire demeure encore inconnue.

1.5 La plasticité phénotypique des cellules du muscles lisses vasculaires

Il est important de noter que les VSMC ne sont pas différenciées de façon définitive et possèdent une certaine plasticité phénotypique. En effet, en condition physiologique on retrouve une certaine diversité phénotypique et la balance entre les phénotypes contractile et prolifératif/synthétique peut être altérée sous l'effet de certains stimuli mécaniques, hormonaux ou environnementaux. Ainsi, en présence de molécules inflammatoires, d'activité accrue du système rénine-angiotensine ou d'une pression accrue exercée sur les vaisseaux causée par de l'hypertension, les VSMC perdent leur capacité contractile pour adopter un profil prolifératif favorisant la synthèse de protéines. Cette plasticité phénotypique permet aux VSMC d'accomplir diverses fonctions telles que la régulation de la pression artérielle et participer au remodelage et réparation vasculaire et aux processus de néovascularisation (Miyazaki *et al.*, 2003).

Les différents phénotypes se manifestent, entre autre, dans la morphologie, le potentiel prolifératif et migratoire, et, dans l'expression de différents marqueurs associés aux phénotypes contractile et synthétique des VSMC (Mack, 2011). À ce jour, plusieurs mécanismes impliqués dans l'acquisition de l'un ou l'autre des phénotypes ont été identifiés, bien que le sujet fasse encore l'objet de recherches intenses.

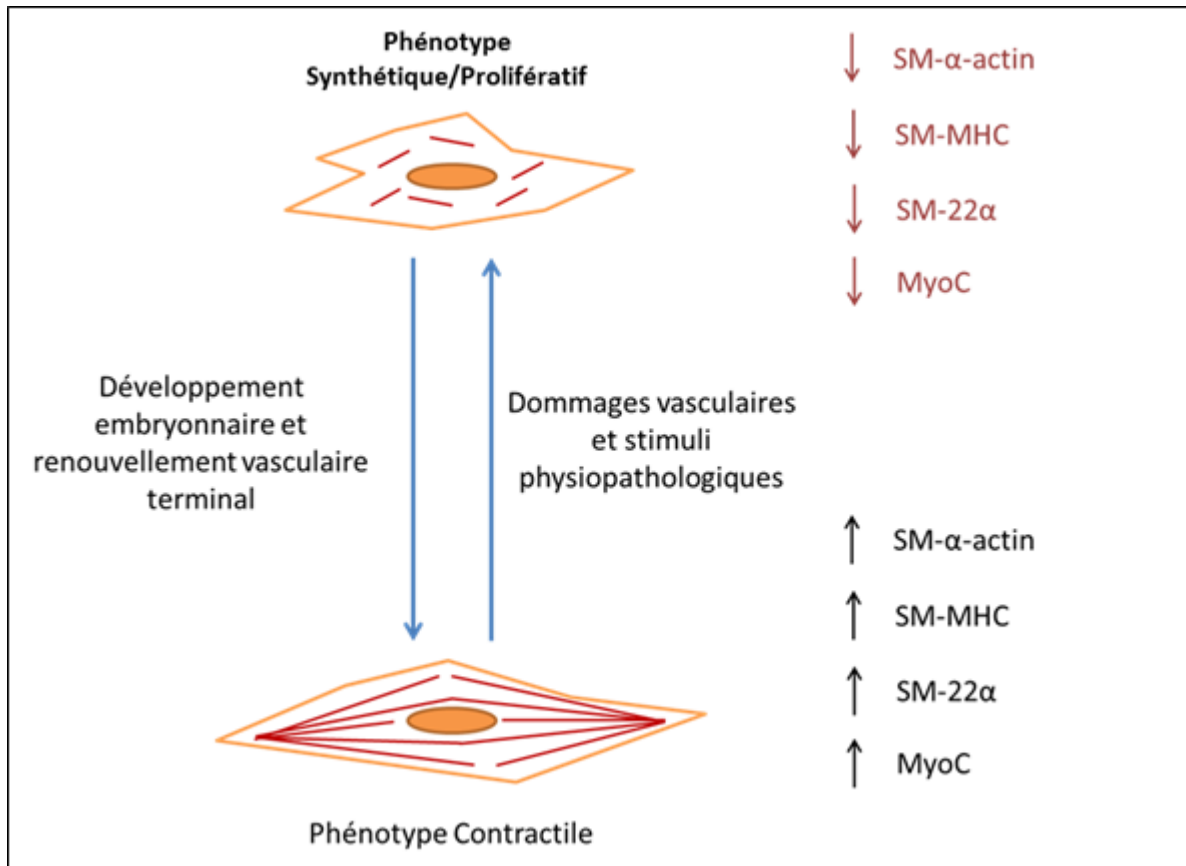


Figure 8. Phénotypes des cellules du muscle lisse vasculaire

Schéma illustrant les phénotypes contractiles et synthétiques/prolifératifs des VSMC en fonction de l'expression de différents facteurs associés à leur différenciation. Ainsi, lors du développement et du renouvellement vasculaire les VSMC adoptent un phénotype contractile et favorisent l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la contraction cellulaire telles SM- α -actin, SM-MHC, SM-22 α , la calponine des muscles lisses, la caldesmone, la smoothéline, la MyoC et le MRTF. De façon opposée, en présence de dommages vasculaires induisant les mécanismes de néovascularisation ou en présence de stimuli physiopathologiques tels que des molécules inflammatoires comme le TGF- β , l'expression des marqueurs associés au phénotype contractile est inhibée favorisant ainsi la domination du phénotype synthétique et prolifératif des VSMC.

1.5.1 Signalisation impliquée dans le phénotype contractile

Au centre de la régulation du phénotype contractile des VSMC, on retrouve le facteur de transcription activé en réponse au sérum (SRF). Ce dernier joue un rôle clé dans la régulation de plusieurs gènes associés directement à la contraction cellulaire et sa régulation (Miano, 2010). On retrouve l'actine- α des muscles lisses (SM- α -actin) et la chaîne lourde de la myosine des muscles lisses (SM-MHC), alors que dans la seconde on retrouve la transgeline (SM-22 α), la calponine des muscles lisses, la caldesmone, la smootheline et la telokine (Mack, 2011). La myocardine (MyoC) et le facteur de transcription s'apparentant à la myocardine (MRTF) sont deux coactivateurs, qui, de concert avec SRF, permettent le maintien du phénotype contractile des VSMC.

Plusieurs voies de signalisation peuvent favoriser la translocation et l'activité du complexe SRF/MyoC/MRTF et le phénotype contractile des VSMC. En outre, l'activité de la petite protéine G RhoA est essentielle dans le maintien du phénotypique contractile des cellules musculaires lisses puisqu'elle permet la translocation nucléaire des MRTF via la polymérisation de l'actine (Staus *et al.*, 2014). De plus, l'inhibition de certains facteurs de transcription favorisant le phénotype synthétique comme FOXO4 par l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT favorise le phénotype contractile (Mack, 2011).

1.5.2 Signalisation impliquée dans le phénotype synthétique

Bien que l'expression des protéines CRBP-1 (transporteur du rétinol) et Smemb (une forme embryonnaire de la chaîne lourde de la myosine) aient été identifiées comme spécifiques au phénotype synthétique des VSMC; l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans le phénotype contractile semble être le principal mécanisme favorisant la domination du phénotype synthétique (Mack, 2011). Ainsi, plusieurs voies de signalisations peuvent interférer avec les activités de SRF et ses cofacteurs MyoC et MRTF.

En outre, la phosphorylation du domaine de liaison à l'ADN de SRF par les protéines kinases C et A, inhibe l'expression du phénotype contractile. De façon similaire, l'activation des

MAPK ERK1/2 entraîne l'inhibition de MyoC et MTRF [26]. Finalement, l'activation de facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) ou FOXO4 entraîne la séquestration de MyoC menant à une diminution des différents marqueurs impliqués dans le phénotype contractile des VSMC (Xie *et al.*, 2011).

Hypothèse et objectifs

La contraction cellulaire joue un rôle central dans plusieurs processus physiologiques que ce soit au niveau des cellules musculaires ou non (Kolodney *et al.*, 1999). Ainsi, l'activité mécanique contractile des cellules endothéliales joue un rôle essentiel dans la régulation de la perméabilité vasculaire et cette même activité, chez les VSMC, régule la pression artérielle (Tang et Anfinogenova, 2008). La régulation de la tension cellulaire est donc critique dans l'homéostasie et le fonctionnement du système cardiovasculaire. En effet, il est également établi qu'une contraction anormale des VSMC est souvent associée à l'hypertension et ses complications. **L'hypothèse centrale de cette thèse propose que l'étude des mécanismes impliqués dans la transduction de signaux menant à la contraction cellulaire et les mécanismes impliqués dans la régulation de celle-ci pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles potentielles afin d'envisager de nouvelles avenues afin de traiter l'hypertension.**

D'ailleurs, certaines découvertes majeures réalisées dans la signalisation reliée aux GPCR ces dix dernières années, principalement dans la signalisation associée aux β -arrestines et le développement d'agonistes biaisés permettant d'étudier cette signalisation, pourraient permettre d'identifier de nouvelles avenues et cibles thérapeutiques pour le traitement de l'hypertension. Toutefois, malgré le rôle important du système angiotensinergique dans l'hypertension (Kim et Iwao, 2000) et la régulation de l'activité contractile des VSMC, la contribution des β -arrestines dans la régulation de la contraction cellulaire induite par l'activation d'AT1aR n'a pas encore été démontrée.

Plusieurs indices suggèrent la participation des β -arrestines dans la régulation de la contraction cellulaire reliée à l'activation d'AT1aR. Il a été montré que la β -arrestine-1 est nécessaire à l'activation de Rho A et de son effecteur ROCK dans la formation des fibres de stress (Barnes *et al.*, 2005). Il a été montré récemment l'importance de β -arrestine-1 et 2 dans la régulation du bourgeonnement cellulaire induit par Rho A (Godin et Ferguson, 2010). Il a également été montré que la β -arrestine-2 était nécessaire dans la chimiotaxie induite par l'Ang II chez les cellules HEK 293 surexprimant le récepteur AT1aR (AT1aR-293) (Hunton

et al., 2005). Finalement, puisque la sous-unité régulatrice de MLCP, MYPT-1, interagit avec la β -arrestine-2 suivant l'activation du récepteur AT1a (Xiao *et al.*, 2007) ; nous avons émis l'hypothèse que les β -arrestines régulent la phosphorylation de la MLC et la contraction cellulaire. **Ainsi le premier objectif de cette thèse sera de déterminer les rôles respectifs de la β -arrestine-1 et 2 dans la régulation de la phosphorylation de la MLC et l'impact de cette régulation sur la contraction cellulaire.**

Tel que mentionné précédemment, une dérégulation de l'état contractile ou de la capacité intrinsèque des VSMC à se contracter peut mener à l'hypertension et ses diverses conséquences (de Gasparo *et al.*, 2000). D'ailleurs, en conditions diabétiques où la formation des AGE est augmentée, il a été observé que les VSMC subiraient un revirement phénotypique du type contractile vers un type sécrétoire/synthétique (Etienne *et al.*, 1998; Pandolfi *et al.*, 2003). Toutefois, les mécanismes responsables de ces changements causés par l'hyperglycémie chronique rencontrée en condition diabétique et l'impact de ces derniers sur la fonction contractile des VSMC demeurent à être déterminés.

Il est connu que l'activation de RAGE par les AGE induit plusieurs voies de signalisation dont celles des MAPK ERK 1/2 qui favorise l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Goldin *et al.*, 2006; Hall, 1998; Taguchi *et al.*, 2000). Or, en plus d'être impliqué dans la transcription de plusieurs gènes inflammatoires (Yan *et al.*, 1994), NF- κ B régule négativement l'expression des protéines impliquées dans le phénotype contractile des VSMC (Xie *et al.*, 2011). Il est intéressant de mentionner les travaux de Suga *et al.* (Suga *et al.*, 2011), qui, dans un modèle de VSMC exposé aux AGE et surexprimant de façon transitoire RAGE, montraient que les VSMC semblaient acquérir des propriétés s'apparentant aux ostéoblastes; suggérant un rôle des AGE dans la calcification vasculaire en condition diabétique. Toutefois, à ce jour, il existe peu d'informations sur les effets fonctionnels au niveau des VSMC de l'activation de RAGE endogène. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de RAGE endogène nuit à l'expression du phénotype contractile des VSMC et interfère avec leur fonction. **Ainsi, le second objectif de cette thèse sera de déterminer les effets de l'activation de RAGE sur le phénotype, les propriétés mécaniques des VSMC**

et diverses fonctions cellulaires telles que la signalisation, la contraction et l'organisation du cytosquelette.

Objectif #1 (Article 1)

Afin de déterminer les rôles respectifs des β -arrestine-1 et 2 dans la régulation de la phosphorylation de la MLC et l'impact de cette régulation sur la contraction cellulaire, l'interaction entre la β -arrestine-1 et des éléments de régulation de la contraction cellulaire a été déterminée en effectuant un criblage double hybride en levure. Ensuite, les rôles respectifs des β -arrestine-1 et 2 dans la régulation de la phosphorylation de la MLC ont été évalués par immunobuvardage en interférant avec l'expression de l'une ou l'autre des β -arrestines en utilisant de petits ARN interférents. Les conséquences fonctionnelles de cette régulation par les β -arrestines ont également été identifiées en mesurant la contraction cellulaire induite par l'activation d'AT1aR par microscopie à force atomique (AFM). De plus, l'importance des β -arrestines et de la signalisation biaisée dans la contraction cellulaire a été confirmée en utilisant le [Sar¹,Ile⁴,Ile⁸]-Ang, un agoniste du récepteur AT1aR n'activant que la voie dépendante des β -arrestines. Ainsi, la contraction cellulaire induite par cet agoniste a été mesurée en utilisant l'AFM. Également, le rôle des β -arrestines dans la signalisation associée à ce ligand biaisé a été confirmé en mesurant la contraction cellulaire par AFM chez les cellules où l'expression de l'une et/ou l'autre des β -arrestines a été interférée par petits ARN interférents. Finalement, l'importance des β -arrestines dans la migration cellulaire a été montrée dans un modèle de VSMC, afin de confirmer la contribution et l'impact fonctionnel de la signalisation biaisée dans la contraction cellulaire.

Objectif #2 (Article 2)

Afin de déterminer les effets de l'activation de RAGE sur le phénotype, les propriétés mécaniques des VSMC et diverses fonctions cellulaires telles que la signalisation, la contraction et l'organisation du cytosquelette, deux types des AGE ont été synthétisés à partir d'albumine sérique recombinante humaine. Puis, la présence du récepteur RAGE dans le

modèle de VSMC, soit les cellules A7r5, a été validée. Afin de confirmer la fonctionnalité de RAGE, l'activité de plusieurs voies de signalisation (ERK, JNK, p38, AKT) et du facteur de transcription (NF- κ B) a été mesurée respectivement par immunobuvardage et épifluorescence dépendante d'un système de gène rapporteur NF- κ B/GFP. Ensuite, l'impact de cette signalisation a été évalué sur la transcription (qPCR) et l'expression protéique (immunobuvardage) de plusieurs marqueurs reliés au phénotype contractile des VSMC (SM- α -actin, SM-MHC, MyoC, SM-22 α). Les effets de l'activation de RAGE sur le phénotype cellulaire ont également été déterminés, en s'intéressant aux changements engendrés sur propriétés mécaniques cellulaires. Les changements morphologiques et dans l'organisation du cytosquelette ont été observés par microscopie traditionnelle, alors que la rigidité ainsi que la hauteur de cellule par AFM. L'activité de la myosine a été observée quant à elle via la mesure de la phosphorylation de sa chaîne légère (MLC) par immunobuvardage. Finalement, l'impact des changements du phénotype cellulaire induit par l'activation de RAGE ont été déterminés sur diverses fonctions cellulaires impliquant la signalisation calcique (Fura2-AM), les changements morphologiques (immunofluorescence du cytosquelette d'actine), l'activation de la myosine (phosphorylation de la MLC par immunobuvardage) et la génération de forces mécaniques (AFM) suite à la stimulation cellulaire, *via* l'activation du récepteur V1 de l'AVP.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique est une technique d'imagerie à haute résolution de l'ordre du nanomètre ce qui représente une résolution de près 1000 fois supérieure à celle de la microscopie optique conventionnelle. Cette résolution est obtenue à l'aide d'une sonde de dimension nanoscopique (cantilevier) qui est utilisée pour entrer en contact avec l'objet (ex. cellule) ou la surface d'intérêt. Ainsi, les mouvements enregistrés au niveau de la sonde qui résultent de son interaction avec l'échantillon sont détectés via la réflexion d'un faisceau laser centré sur l'extrémité de la sonde (**Figure 9**). Il est facilement possible de calculer le déplacement et la force exercée sur cette dernière puisque la constante de ressort de la sonde (N/m) est connue. En général, l'interaction entre la sonde et l'élément observé est de nature non-spécifique. Toutefois, il est possible de fonctionnaliser chimiquement une sonde avec divers molécules chimiques ou biologiques afin d'observer des forces d'interaction spécifiques.

En mode imagerie AFM, l'échantillon est balayé dans les axe x et y à l'aide d'éléments piezo-électriques. La déflexion de la sonde permet ensuite de reproduire une image topographique tridimensionnelle. En spectrométrie de force, la sonde approche l'échantillon sur l'axe des z , soit de façon perpendiculaire, afin de mesurer des forces d'interaction entre la sonde et l'échantillon. C'est, entre autre, de cette façon qu'il est possible de suivre la contraction cellulaire en temps réel ou encore de mesurer la rigidité cellulaire. Il est également possible de combiner la spectrométrie de force à l'imagerie AFM pour obtenir de patrons d'interactions spécifiques avec l'échantillon.

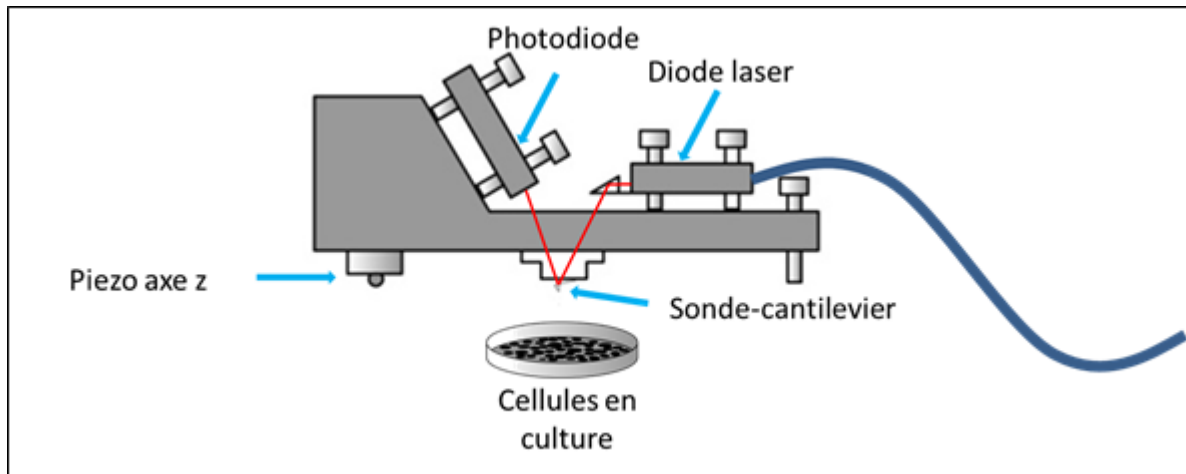


Figure 9. Représentation schématique d'un AFM

Représentation schématique de l'AFM utilisé dans cette thèse. L'appareil est placé sur un microscope à contraste de phase et peut être soulevé facilement afin d'introduire les échantillons d'intérêt tel qu'un pétri contenant des cellules en culture. La pointe du cantilevier assure le contact avec la cellule. Les forces appliquées sur la pointe du cantilevier par la cellule sont mesurées via la réflexion du laser et un système de photodiode.

2.1.1 Mesure de contraction cellulaire en temps réel

Malgré sa précision et sa haute résolution, l'AFM demeure un outil peu utilisé en biologie cellulaire, malgré qu'il soit un outil particulièrement intéressant afin d'interroger les mécanismes impliqués dans la régulation de la contraction cellulaire. En effet, c'est à l'aide de l'AFM que certains groupes ont été en mesure de montrer que l'oscillation de la membrane cellulaire pouvait être influencée par différents paramètres environnementaux tels que la température (Pelling *et al.*, 2005), l'activité métabolique de la cellule (Pelling *et al.*, 2004), le voltage transmembranaire (Zhang *et al.*, 2001) et la mobilisation intracellulaire de calcium (Hill *et al.*, 2007). De façon similaire, à l'aide de l'AFM, les groupes de Shroff et Domke ont été en mesure de montrer respectivement que la fréquence de contraction des myocytes de l'oreillette dépendait de la concentration de calcium extracellulaire (Shroff *et al.*, 1995) et de la confluence de la population étudiée (Domke *et al.*, 1999). Également, notre laboratoire a utilisé l'AFM afin de mettre en évidence la contribution importante des protéines G12/13 dans la contraction cellulaire associée à l'activation du récepteur AT1 (Cuerrier *et al.*, 2009).

Lors d'une expérience typique, les cellules sevrées sont placées sous le microscope à contraste de phase sur lequel un AFM a été monté. À l'aide d'un système de caméra, la sonde est grossièrement positionnée au niveau apical de la cellule, soit au-dessus du noyau cellulaire. Ensuite, à l'aide d'un élément piézo-électrique, l'approche en *z* de la sonde est effectuée jusqu'à ce qu'une force d'approximativement 200 pN soit appliquée sur la membrane cellulaire. Les mouvements de cette dernière sont alors enregistrés de façon continue et rapportés en volts par la photodiode. Une ligne de base allant de cinq à dix minutes est réalisée, puis suivant l'administration de l'agent pharmacologique, l'enregistrement se poursuit pendant 20 à 30 minutes. Les réponses cellulaires sont ensuite rapportées en nm à partir d'une mesure de calibration basée sur la déflexion du cantilevier en V/m. Typiquement, la contraction cellulaire, exprimée en nm, est le reflet de la variation maximale de hauteur cellulaire enregistrée par rapport à la ligne de base (**Figure 10**).

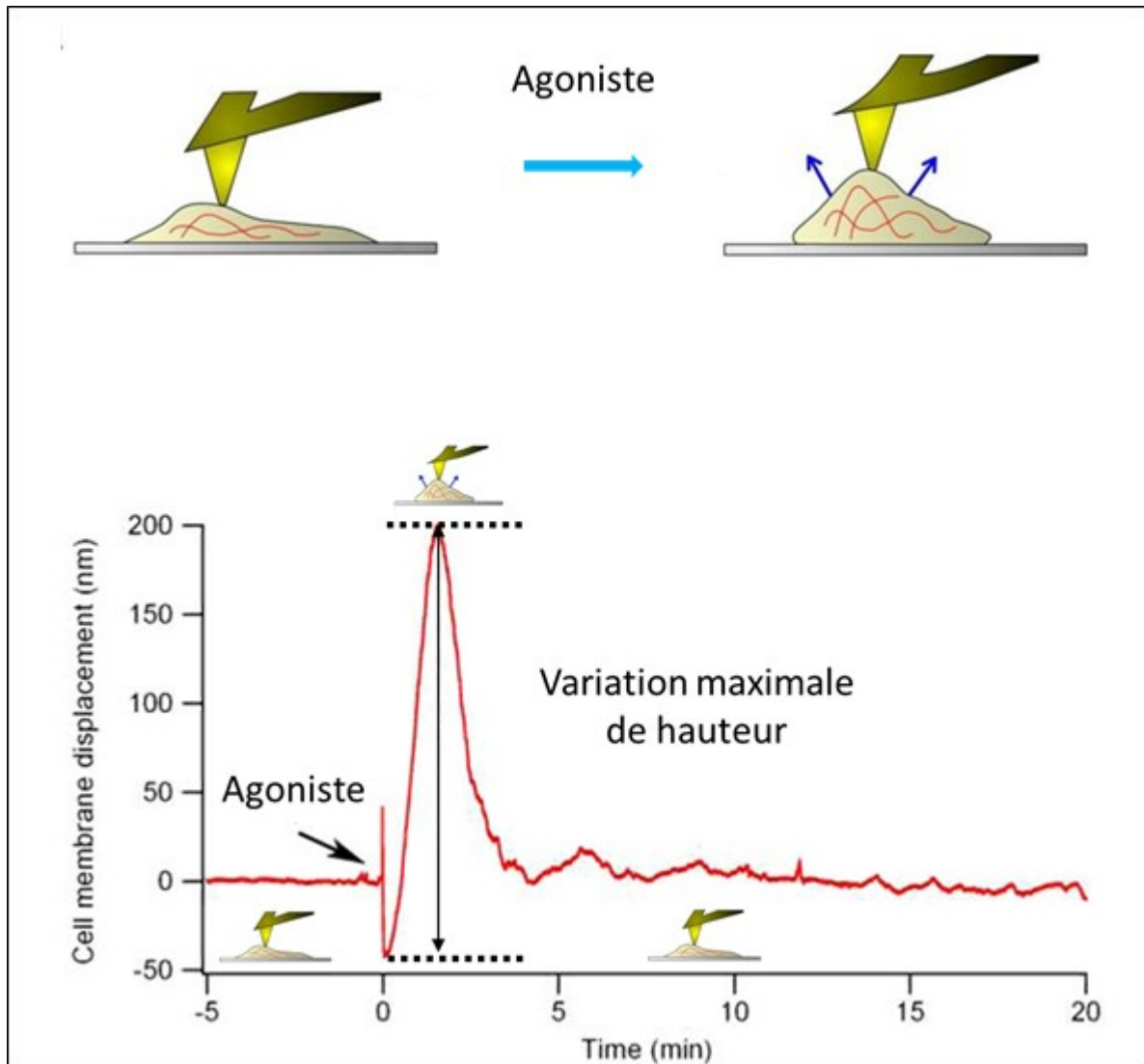


Figure 10. Mesure de la contraction cellulaire en temps réel par AFM dans une expérience typique

Cette figure illustre la réponse cellulaire engendrée par un agent contractile tel que l'Ang II. Le panneau du haut illustre la contraction stimulée par un agoniste et son impact sur le cantilevier. Ainsi, la présence d'agoniste stimule la contraction cellulaire et la réorganisation du cytosquelette. L'ensemble de ces événements induit un changement dans la hauteur de la membrane cellulaire qui entraîne la déflexion du cantilevier. Le panneau du bas est un tracé typique obtenu chez les cellules 293-AT1aR stimulées à l'Ang II. Ainsi, après une période de stabilisation (-5 à 0 min), l'Ang II est ajouté au milieu entraînant une contraction rapide et transitoire (0 à 5 min) d'environ 200 nm. La variation de hauteur maximale est généralement utilisée afin de quantifier la contraction cellulaire par AFM.

2.1.2 Mesure de la rigidité cellulaire

En plus de permettre la mesure de la contraction cellulaire induite par un agoniste, l'AFM permet également de mesurer les changements dans la rigidité cellulaire associés avec le remodelage du cytosquelette et la contraction cellulaire (Cuerrier *et al.*, 2008). D'ailleurs, il a été montré que la rigidité corticale est associée à la rigidité membranaire ainsi que le degré d'organisation du réseau d'actine alors que la rigidité profonde serait dépendante des filaments intermédiaires et de microtubules (Van Citters *et al.*, 2006). De façon générale, la rigidité cellulaire est directement reliée à la tension exercée par le moteur acto-myosine et la densité du cytosquelette. La variation de cette rigidité est donc une mesure de la contraction cellulaire puisque la génération de forces de contraction et de migration est dépendante de l'actine qui la compose (Cooke, 2004).

En plus d'être le reflet de l'état de contraction cellulaire, la rigidité corticale fait l'objet de nombreuses études dans le but de caractériser les phénotypes cellulaires. Il existe une grande diversité de valeurs de rigidité cellulaire rapportées dans la littérature et l'importance relative des valeurs de rigidité sur la fonction cellulaire fait encore état de nombreuses discussions et recherches. Il a été montré que les cellules cancéreuses métastatiques seraient moins rigides ce qui pourrait favoriser leur migration et leur caractère invasif (Swaminathan *et al.*, 2011). De façon similaire les cellules non différenciées seraient moins rigides, ce qui leur permettrait de mieux répondre aux forces présentes dans leur environnement (Holle et Engler, 2010). Il a également été observé, qu'en fonction du vieillissement, la rigidité cellulaire était augmentée possiblement causée par l'accumulation d'AGE (Berdyeva *et al.*, 2005). Finalement, une augmentation de la rigidité a été associée au développement de plusieurs maladies progressives telles que les maladies vasculaires (hypertension), rénales (insuffisance), oculaires (cataractes), mentales (Alzheimer) et dans les complications du diabète (Bucala et Cerami, 1992; Ulrich et Zhang, 1997). Ainsi la mesure de rigidité permet à la fois de suivre l'état de contraction cellulaire, mais également représente une propriété phénotypique permettant de déterminer l'état physiopathologique de la cellule.

La rigidité cellulaire est déterminée en mesurant le module d'élasticité de la cellule, soit le module de Young. Pour ce faire, une approche de la sonde doit être effectuée sur une cellule individuelle de façon à déterminer la force devant induire une déformation particulière. Ainsi, plus une cellule sera rigide, plus une force importante devra être appliquée sur cette dernière pour la déformer.

Dans une expérience typique, tout comme pour la mesure de la contraction en temps réel, les cellules sevrées sont placées sur un microscope à contraste de phase sur lequel un AFM a été monté. À l'aide d'un système de caméra, la sonde est grossièrement positionnée au niveau apical de la cellule, soit environ au 2/3 de la distance entre la périphérie cellulaire et le noyau. Ensuite les courbes d'indentation cellulaire sont enregistrées à l'aide de l'élément piézo-électrique permettant l'approche en z de la sonde à un rythme de $3.25 \mu\text{m/s}$, et ce, jusqu'à ce qu'une indentation de la membrane cellulaire de 1500 nm soit réalisée. Les données en volt obtenues sont ensuite transformées en mesures de force à partir de la mesure de calibration basée sur la déflexion du cantilevier en V/m et sa constante de ressort (N/m). À partir d'une adaptation du modèle de Hertz, tenant compte de la géométrie de la sonde et des propriétés de l'objet déformé, le module de Young ou la rigidité cellulaire est finalement calculé (**Figure 11**).

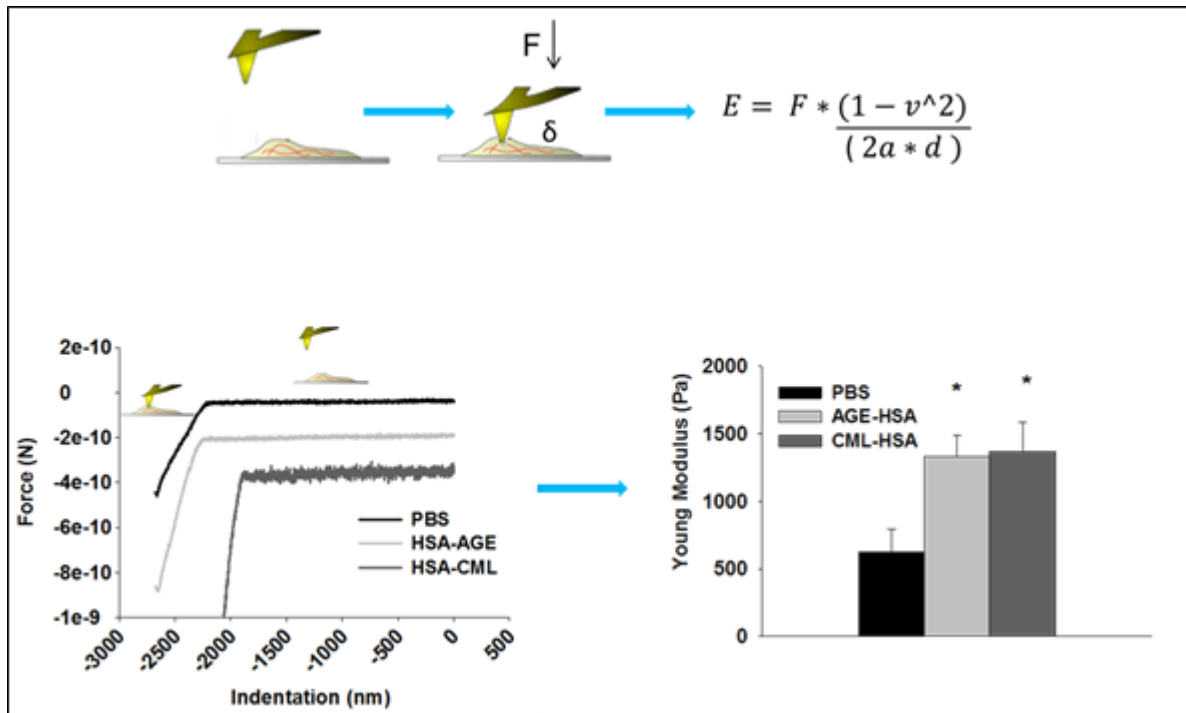


Figure 11. Mesure de rigidité cellulaire par AFM

Le schéma du haut illustre la mesure de rigidité par AFM où la rigidité cellulaire s'exprime sous la forme du module de Young (E) dépend de la force appliquée (F) par le cantilevier sur la cellule dans le but d'effectuer une déformation δ ou d . Le calcul du module de Young doit également tenir compte du ratio de Poisson (ν) d'une valeur de 0.5 puisque la cellule est considérée comme un matériel incompressible et du rayon de la sonde (a) utilisée. Le panneau du bas représente les données typiquement obtenues chez des cellules A7r5 stimulées pendant 24 heures avec différents AGE. À gauche, les changements dans la rigidité cellulaire peuvent être observés dans la pente des courbes obtenues : une pente plus prononcée illustre une rigidité plus importante. Le graphique de droite, représente la transformation des données obtenues en mesure de rigidité ou Young Modulus exprimée en Pascal (Pa).

ARTICLE 1

β -Arrestin regulation of myosin light chain phosphorylation promotes AT1aR-mediated cell contraction and migration.

Auteurs de l'article: Elie Simard, Jeffrey J. Kovacs, William E. Miller, Jihee Kim, Michel Grandbois et Robert J. Lefkowitz.

Statut de l'article: Publié en 2013 dans PLoS ONE 8(11): e80532.

Avant-propos: Au niveau expérimental, j'ai conçu et réalisé les expériences AFM en plus d'analyser et interpréter les données obtenues non-seulement pour l'AFM, mais pour l'ensemble des expériences présentées. Finalement, j'ai rédigé le manuscrit sous la supervision des Prs Michel Grandbois et Robert J Lefkowitz. Tous les auteurs ont lu, critiqué, révisé et accepté le manuscrit.

Résumé : Durant la dernière décennie, il a été établi que les récepteurs couplés aux protéines G signalent non-seulement via des mécanismes dépendants des protéines G, mais également via les protéines ubiquitaires et d'échafaudages: β -arrestine-1 et β -arrestine-2. Des études précédentes ont identifié les β -arrestines comme régulateurs de la réorganisation de l'actine en réponse à l'activation des GPCR et lors de la migration cellulaire. Un des événements critique dans l'activité mécanique cellulaire implique le cycle métabolique de phosphorylation de la MLC. Dans cette étude, nous avons identifié la protéine MYPT-1 comme partenaire d'interaction des β -arrestines et nous avons montré que les β -arrestines jouent un rôle significatif dans le cycle de phosphorylation de la myosine. Ainsi, en réponse à l'activation d'AT1aR, MLC est phosphorylée rapidement. Nous avons également montré que la β -arrestine-2 prévient la phosphorylation de MLC alors que, de façon opposée, la β -arrestine-1 favorise la phosphorylation de MLC. Curieusement, la perte de l'une ou l'autre des β -arrestines est associée à une perte de contraction cellulaire tel que montré par AFM. De plus, en utilisant le ligand biaisé SII, nous avons démontré que la motilité cellulaire, induite par l'activation d'AT1aR, implique une participation significative des β -arrestines.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la régulation réciproque de la phosphorylation de MLC par les β -arrestines joue un rôle dans le cycle métabolique de la MLC et que l'intégrité de ces éléments régulateurs est nécessaire dans la contraction cellulaire et la chimiotaxie.

β -Arrestin regulation of myosin light chain phosphorylation promotes AT1aR-mediated cell contraction and migration

Elie Simard¹, Jeffrey J. Kovacs⁴, William E. Miller⁷, Jihee Kim⁴, Michel Grandbois^{1,2,3}, *Robert J. Lefkowitz^{4,5,6}

¹Département de Pharmacologie, ²Institut de Pharmacologie de Sherbrooke and ³Chaire de Recherche Canadienne en Nanopharmacologie et Microscopie à Force Atomique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Departments of ⁴Medicine, ⁵Biochemistry and ⁶Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, United States of America

⁷Department of Molecular Genetics, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, United States of America

* Corresponding author e-mail: Lefko001@receptor-biol.duke.edu

ABSTRACT

Over the last decade, it has been established that G-protein-coupled receptors (GPCRs) signal not only through canonical G-protein-mediated mechanisms, but also through the ubiquitous cellular scaffolds β -arrestin-1 and β -arrestin-2. Previous studies have implicated β -arrestins as regulators of actin reorganization in response to GPCR stimulation while also being required for membrane protrusion events that accompany cellular motility. One of the most critical events in the active movement of cells is the cyclic phosphorylation and activation of myosin light chain (MLC), which is required for cellular contraction and movement. We have identified the Myosin Light Chain

Phosphatase Targeting Subunit (MYPT-1) as a binding partner of the β -arrestins and found that β -arrestins play a role in regulating the turnover of phosphorylated myosin light chain. In response to stimulation of the Angiotensin Type 1a Receptor (AT1aR), MLC phosphorylation is induced quickly and potently. We have found that β -arrestin-2 facilitates dephosphorylation of MLC, while, in a reciprocal fashion, β -arrestin 1 limits dephosphorylation of MLC. Intriguingly, loss of either β -arrestin-1 or 2 blocks phospho-MLC turnover and causes a decrease in the contraction of cells as monitored by atomic force microscopy (AFM). Furthermore, by employing the β -arrestin biased ligand [Sar¹,Ile⁴,Ile⁸]-Ang II, we demonstrate that AT1aR-mediated cellular motility involves a β -arrestin dependent component. This suggests that the reciprocal regulation of MLC phosphorylation status by β -arrestins-1 and 2 causes turnover in the phosphorylation status of MLC that is required for cell contractility and subsequent chemotactic motility.

Cellular contraction, governed by actin-myosin-mediated motor activity, is central to many physiological processes in both muscle and non-muscle cells, including cell division, adhesion, chemotaxis and cytokinesis [1]. Dynamic mechanical activity also regulates contractile events that mediate vascular permeability in vascular endothelial cells and governs blood pressure in vascular smooth muscle cells [2]. Regulation of the tensile state of cells is therefore critical for organ homeostasis. Indeed, abnormal contraction of vascular smooth muscle cells can lead to hypertension and complications such as cardiac hypertrophy and failure, renal dysfunction and cerebrovascular maladies [3].

Several G-protein-coupled receptors (GPCRs), such as the Angiotensin II type 1a receptor (AT1aR), are involved in the regulation of cellular contraction. The AT1aR agonist, Angiotensin II (Ang II), a potent vasoconstrictor, is well known to contribute to the development of cardiovascular diseases [31]. AT1aR is coupled mainly to the G α q/11 G-proteins and signals primarily through the downstream effectors phospholipase C and protein kinase C [3]. Additionally, it has been shown AT1aR is also coupled to G α 12/13 which has the small G-protein Rho as an effector [32]. Upon activation of AT1aR, β -arrestins are also recruited to the receptor to desensitize G-protein-mediated signaling and to act as scaffolding proteins [33,34] that mediate several other signaling pathways [35]. Included in these β -

arrestin-mediated signaling pathways are the mitogen-activated protein kinase (MAPK) [36] and Rho-A-GTPase cascades, which have been shown to regulate both actin cytoskeletal reorganization and cell migration [32]. Recent proteomic studies revealed that the β -arrestins interact with more than 35 cellular structural proteins including cytoskeletal components such as actin, and motor proteins such as myosin [35].

Myosins (both smooth muscle and non-muscle) are regulated by the phosphorylation of MLC [15]. Phosphorylation of myosin catalyzed either by Myosin Light Chain Kinase (MLCK) or by Rho-activated Kinase (ROCK), activates myosin by promoting transition to an extended conformation. This conformation allows myosin to bind actin and use ATP to generate a force of contraction. Conversely, dephosphorylation of MLC by Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP) stabilizes an inhibited and bent conformation with low affinity for actin. It has been proposed that cycling of MLC between its phosphorylated and unphosphorylated states is required for cell motility and contraction [16]. Turnover of phosphorylated MLC is regulated, in part, by MLCP, which is a heterotrimeric protein composed of a phosphatase (PP1C), a myosin binding and regulatory domain (MYPT), and a domain (ML20) of unknown function [17]. Interestingly, ROCK can affect MLC phosphorylation by directly phosphorylating MLC [18] or by phosphorylating MYPT and consequently inhibiting MLCP activity.

Several lines of evidence suggest a role for β -arrestins in the regulation of cellular contraction. We have previously reported that β -arrestin-1 is required for RhoA/ROCK activation and stress fiber formation [32]. *Godin et al.* also reported recently the importance for β -arrestins-1 and 2 in the regulation of Rho-A-dependent membrane blebbing [37]. Additionally, we have previously shown that β -arrestin-2 is required for Ang II-induced chemotaxis in HEK 293 AT1aR cells (AT1aR-293) [38]. These studies suggest a role for angiotensin-dependent β -arrestin signaling in dynamic cytoskeletal reorganization.

Previously, a proteomics study from our group found that MYPT-1 interacts with β -arrestin-2 upon AT1aR activation [35]. Here, we present a yeast-II hybrid screen revealing a direct interaction between β -arrestin-1 and MYPT-1. Based on our previous data, and the fact that little is known about the consequences of the β -arrestin/MYPT-1 interaction, we set out to delineate the respective roles of β -arrestin-1 and 2 in regulating MLC phosphorylation by

investigating the downstream consequences of this signaling interplay. Ours results confirm a key role for β -arrestin-mediated signaling in regulating cell contraction and motility.

MATERIALS AND METHODS

Reagents—Angiotensin II was purchased from Sigma. [Sar¹, Ile⁴, Ile⁸]-Angiotensin II (SII) was purchased from the Cleveland Clinic Core Synthesis Facility. Q-serum was prepared as follows: 5ml Source 30Q beads (GE Healthcare Life Science) were washed two times in phosphate buffered saline (PBS) then incubated with 25 ml fetal bovine serum (FBS) (Sigma) for 30 min with agitation. The mixture was then centrifuged at 2000 rpm and the treated serum was recovered and filtered through 0.22 μ m.

Cell culture—AT1aR-stable HEK-293 (AT1aR-293) cells were maintained in minimum essential Eagle's medium (EMEM) (M2279; Sigma) plus 10% FBS, 0.6 IU/ml penicillin (Sigma) and 600 μ g/ml streptomycin (Sigma) in the presence of 100 μ g/ml zeocin (Invitrogen) as described previously [39]. Rat vascular smooth muscle cells (rVSMC) were prepared from aortas of male Sprague-Dawley rats by enzymatic digestion [40] and maintained in Medium 199 (M199; Sigma) supplemented with 10% FBS, 0.6 IU/ml penicillin and 600 μ g/ml streptomycin. Slow growing early passage (less than 5) cells at 80-90% confluence were used for all experiments.

Yeast two-hybrid Screen— The full length cDNA of rat β -arrestin-1 was subcloned into the yeast expression vector pAS2-1 using EcoRI and BamHI restriction sites. Following amplification in *Escherichia coli*, the pAS2-1 β -arrestin-1 plasmid was transformed into yeast strain PJ69-4A and a yeast two-hybrid screen was carried out essentially according to the Clontech Matchmaker protocol using a GAL4 activation domain fusion library in pACT2 (Matchmaker human heart cDNA library, Clontech). Library clones containing putative β -arrestin-1 interacting proteins were identified by positive growth on Trp/Leu/His/Ade dropout plates. Plasmids were isolated from positive clones using standard methodologies and analyzed by DNA sequencing (Howard Hughes Nucleic Acid Facility, Duke University). One of these clones corresponded to amino acids 643 to 943 of human MYPT-1 (NM_001143886). To confirm this interaction and to map the β -arrestin-1 interacting

domain, DNA fragments corresponding to amino acids 1-163 or 1-253 of rat β -arrestin-1 were PCR amplified and subcloned into pAS2-1 using EcoRI and BamHI restriction sites. Plasmids corresponding to full length (1-418), 1-163, or 1-253 β -arrestin-1 were then co-transformed with pACT2 MYPT-1(643-943) into the PJ69-4A yeast strain and selected on Trp/Leu dropout plates. Yeasts containing the β -arrestin-1 and MYPT-1 plasmids were then analyzed for growth on Trp/Leu/Ade dropout plates.

Plasmid Transfection and siRNA— 3 days before β -arrestin overexpression experiments, AT1aR-293 cells were transfected with either 1 μ g of plasmid pcDNA3- β -arrestin-1-FLAG or pcDNA3- β -arrestin-2-FLAG (encoding rat β -arrestins) [41,42] using FuGENE 6 (Roche Applied Science) transfection reagent according to the manufacturer's instructions.

3 days before β -arrestin and MYPT-1 siRNA-mediated knockdown experiments, 50% confluent human AT1aR-293 or rVSMC cells were transfected with siRNA using Gene Silencer (Gene Therapy Systems) as previously described [39,42] or Protein-Transduction Domain-Double-stranded RNA Binding-Domain (PTD-DRBD) reagent (a gift from Steven Dowdy's lab, see protocol below) [43]. Unlabeled and YFP-tagged custom made control, human β -arrestin-1 and human β -arrestin-2 siRNAs were 5-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UDTdT-3, 5-AGC CUU CUG CGC GGA GAA UdTdT-3 and 5-CCA ACC UCA UUG AAU UUG AdTdT-3, respectively. The SMARTpool siRNA targeting human MYPT-1 consists of 4 different siRNA sequences (L-011340, Dharmacon). The custom made siRNA sequences targeting rat β -arrestin-1 and rat β -arrestin-2 were 5-AGC CUU CUG UGC UGA GAA C-3 and 5-CCA ACC TCA TTG AAT TCG A-3 respectively [44]. The SMARTpool siRNA targeting rat MYPT-1 consist of 4 different siRNA (L-095860, Dharmacon). Protein knockdown efficacy was determined by immunoblotting and calculated by comparing the levels of the target protein in cells transfected with the specified siRNA to the cells treated with the control siRNA. Data are expressed as % of reduction in protein expression.

PTD-dRBD siRNA delivery protocol— rVSMCs were seeded to 80% confluency in 6-well plates and cultured overnight. The following day, siRNA delivery system was prepared by mixing 10 μ l of 40 μ M siRNA diluted in water with 9 μ l of 200 μ M PTD-dRBD protein pre-diluted in 64.2 μ l of PBS-10% Glycerol. While the siRNA delivery mix was incubating on

ice for 15 minutes, cells were washed with serum free medium and incubated in 1 ml 10% Q-serum-medium. After incubation on ice, the PTD-dRBD:siRNA mix was diluted 1:5 in 10% Q-serum-medium. Media was removed from cells and replaced with 400 μ l PTD-dRBD:siRNA complexes. After 4-6 hrs of incubation at 37°C in 5% CO₂ incubator, the cells were washed twice with 10% FBS medium and kept under culture conditions until assays (motility or western blotting) were performed 96 hours later.

Immunoprecipitation and immunoblotting— Cells were solubilized in lysis buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.5), 0.5% Nonidet P-40, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A and 100 μ M benzaminidine. For immunoprecipitation, 15 μ l of protein A/G plus-agarose (SantaCruz) and 1 μ g of specified antibody were added to whole-cell lysates. After 3 hour incubation at 4 °C on a rocker platform, the immunoprecipitates were collected by centrifugation at 2,500 rpm for 2 min. The supernatant was discarded, whereupon the pellet was washed 4 times and then dissolved in sample buffer. For direct detection of protein levels in lysates, whole-cell lysates were directly used for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. SDS-PAGE were conducted on 10% polyacrylamide tris-glycine gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting according to standard protocols. Immunoblots were performed using the following antibodies: β -arrestin-1 polyclonal A1CT and β -arrestin-2 polyclonal A2CT [45], FLAG M2 (F1804; Sigma), MYPT-1 (2634, Cell Signaling), phosphorylated-MLC (3671, Cell Signaling), Actin (A1978, Sigma) and Tubulin (T5293, Sigma). Chemiluminescent detection was performed with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Amersham Biosciences) and SuperSignal West Pico reagent (Pierce). Chemiluminescence was quantified by a charge-coupled device camera (Syngene ChemiGenius2); representative images are shown as inverted grayscale. Relative quantification of protein levels was performed by dividing the intensity of the band corresponding to the protein of interest by the intensity of the band mentioned as the loading control protein.

AFM Measurements—A custom-made AFM-based force measurement device was mounted on an inverted epifluorescent microscope (Carl Zeiss) as described previously [46]. Silicon

nitride 0.01N/m cantilevers (HYDRA2R-100NG, AppNano) were used as force sensor for real-time monitoring of the cell contractile responses. Cells starved overnight in CO₂-independent EMEM media containing HEPES at 37°C were adapted to room temperature one hour prior to an AFM experiment. YFP fluorescence was used to select cells that incorporated siRNAs and contrast phase microscopy was used to manually position the cantilever tip over the apical region of the cell. With the help of a 15 µm piezo scanner (Physik Instrumente) an individual cell was approached until a contact force of approximately 200pN was measured. Baseline measurements were typically recorded for 5 mins after which vehicle injection was performed as control. After an additional 5 min, agonists were injected. Simultaneously to AFM data recording, micrographs were taken every second in phase contrast microscopy using a 40X objective and an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss). All AFM experiments were performed at room temperature to limit mechanical vibration and thermal drift introduced by a heating/cooling system. Cell mechanical responses are reported as variations in cell height measured by the cantilever deflection (nm) and cell contractions were reported as the maximal variation of the cell height with respect to the baseline.

Chemotaxis Assays— Boyden-Chamber assays were performed in transwell chambers of 24-well inserts with 8-µm pore membranes coated with fibronectin (5µg/ml) for 1 hour. rVSMC were serum-starved for 2 hours in M199 then assays were conducted in serum-free M199 media as well. Agonists were placed in the lower chamber, and 100 000 cells were placed in the upper chamber and incubated for 5 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were then removed from the upper chamber and the upper side of the membrane, leaving only those cells that migrated through the membrane and to the lower chamber. Membranes were then fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 1% crystal violet before being dried, excised, and mounted on microscope slides. Membrane densities were quantified using the GeneTools image analysis software (Syngene). The chemotactic index was calculated by dividing values from membranes in the stimulated conditions by values from control membranes (Vehicle).

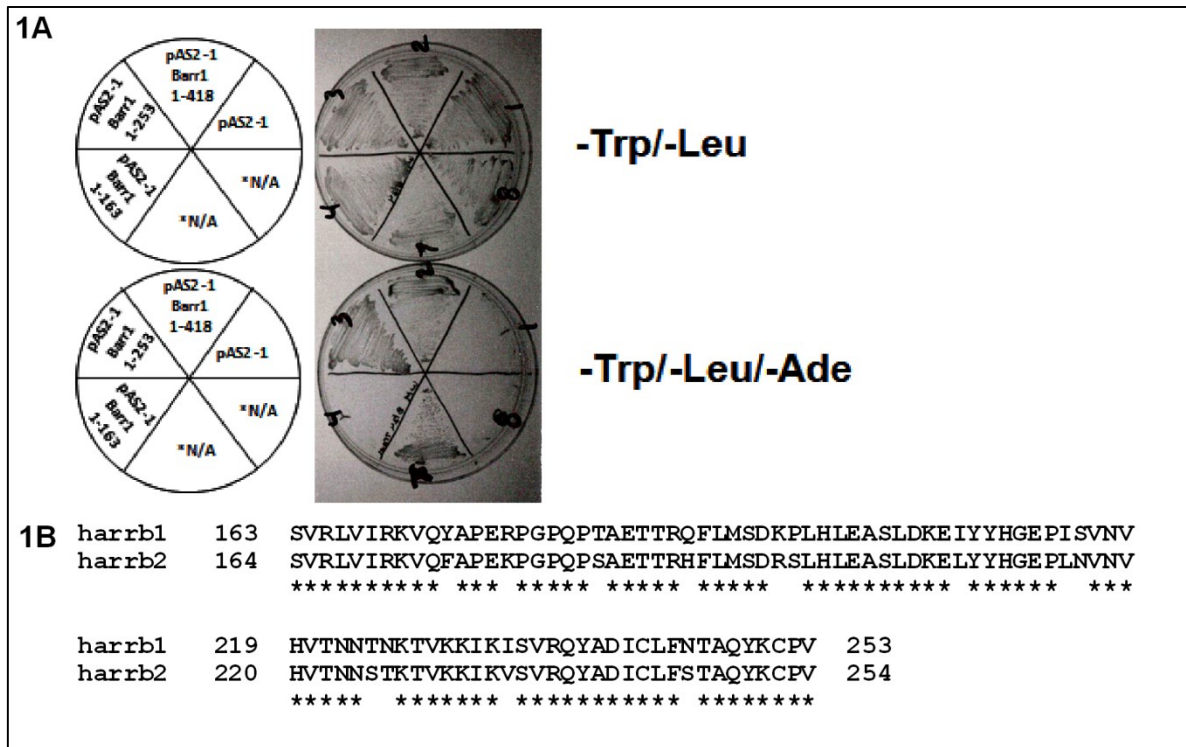
QCM chemotaxis cell migration assays (ECM510, Millipore) were performed in 96-well plates. Briefly, rVSMC were starved overnight in M199 and 25 000 cells per well were used using the protocol supplied by the manufacturer. The cell fluorescence was measured

by a fluorescence plate reader using 480/520 nm filter set. The chemotactic index was calculated by dividing values from the different treatments by values from control conditions.

RESULTS

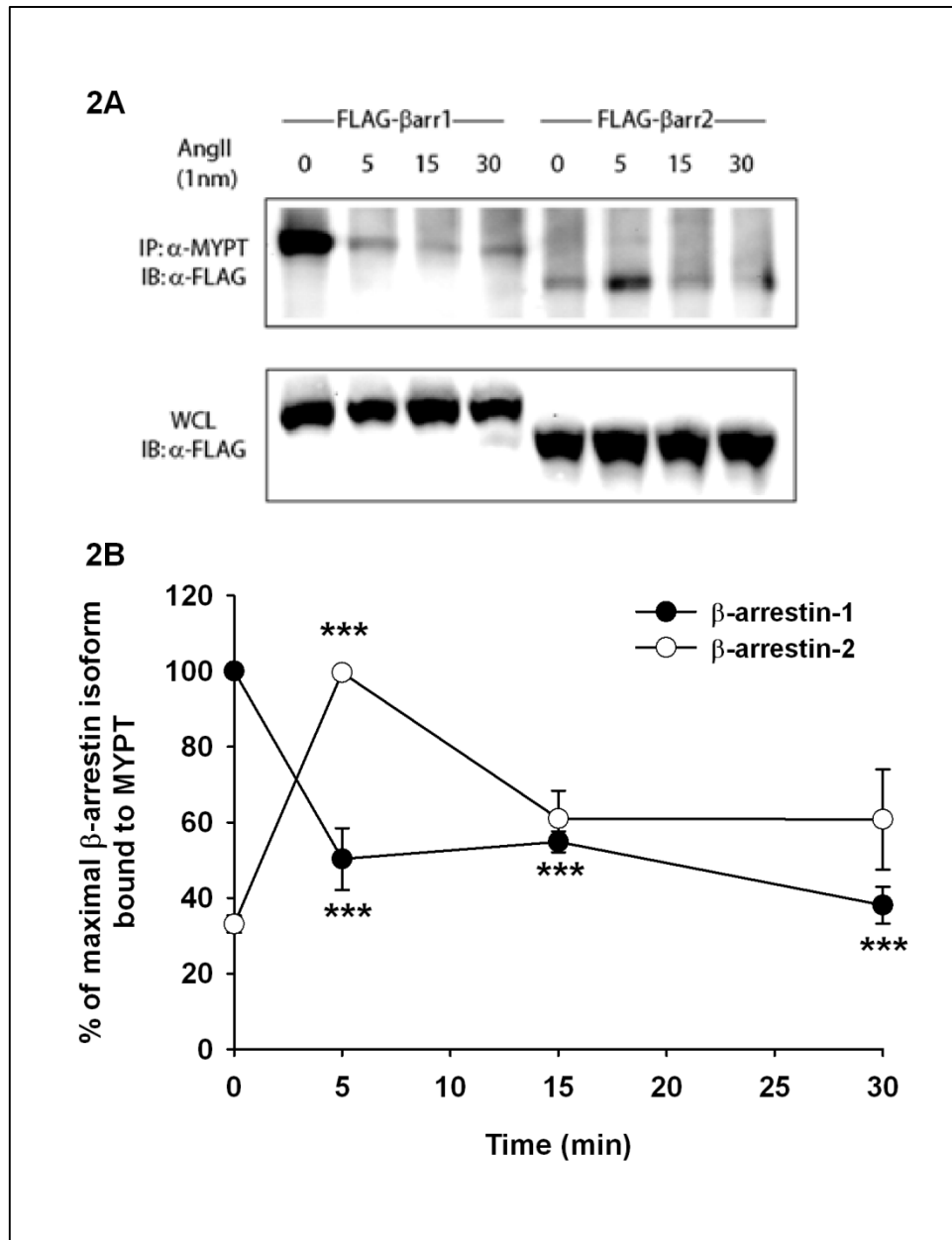
In order to identify binding partners of β -arrestin-1, a yeast-II hybrid screen was performed using pAS2-1 β -arrestin-1 as the bait and a human heart cDNA library as the prey. We isolated one clone corresponding to the c-terminus amino acids (643 to 943) of MYPT-1 (NM_001143886). Amino acids 643 to 943 contain the regulatory and myosin binding domains of the MLCP complex, indicating that these domains confer the ability of MLCP to interact with β -arrestin-1. To determine the regions of β -arrestin-1 that interact with MYPT-1, β -arrestin-1 fragments were co-expressed with MYPT-1(643-943) in a yeast-II hybrid assay. The results demonstrate that β -arrestin-1 (1-418) and (1-253) interact with MYPT-1(643-943), while β -arrestin-1 (1-163) did not (**Figure 1A**). These results suggest that amino acids (163-253) of β -arrestin-1 contain the MYPT-1 binding domain. Intriguingly, proteomic experiments have shown that β -arrestin-2 also interacts with MYPT-1 in an AT1aR stimulus dependent fashion, suggesting that both β -arrestins bind MYPT-1 [35]. Worthy of notice, the amino acid sequence of β -arrestin-1 and β -arrestin-2 is highly similar in this region (**Figure 1B**).

To confirm the interaction of β -arrestins with MYPT-1, co-immunoprecipitations were performed following Ang II (1 nM) stimulation of AT1aR-293 cells overexpressing β -arrestin-1 or β -arrestin-2. **Figure 2** shows that β -arrestin-1 interacts with MYPT-1 in resting cells, an interaction which diminishes rapidly following Ang II stimulation. On the other hand, β -arrestin-2 weakly interacts with MYPT-1 in basal condition. However, in presence of Ang II, this interaction is transiently increased to reach a maximum within 5 minutes. Taken together, those results confirm that β -arrestin-1 and 2 interact with MYPT-1 and suggest they may play a role in the regulation of the phosphorylation of MLC.



Article 1, Figure 1. β -Arrestin-1 interacts with MYPT-1.

A, β -Arrestin-1 constructs comprising amino acids 1-418 (full-length), 1-253 or 1-163 were co-transformed with a MYPT-1 construct containing amino acids 643-693 (the regulatory and myosin binding domains of MLCP). 1-418 and 1-253 β -arrestin-1 constructs interacted with MYPT-1 as indicated by growth on Ade dropout plates, while the 1-163 β -arrestin-1 construct or empty vector (pAS2-1) did not. Therefore, it appears that amino acids 163-253 of β -arrestin-1 contain the MYPT-1 interacting domain. * N/A sectors are unrelated experiments. **B**, β -Arrestin-1 (163-253) domain alignment with the corresponding β -arrestin-2 domain. * Indicates conserved amino acids between β -arrestin-1 and 2.

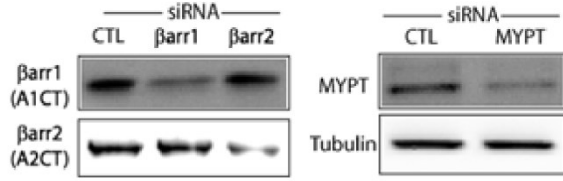


Article 1, Figure 2. β -Arrestin-1 and 2 interact with MYPT-1.

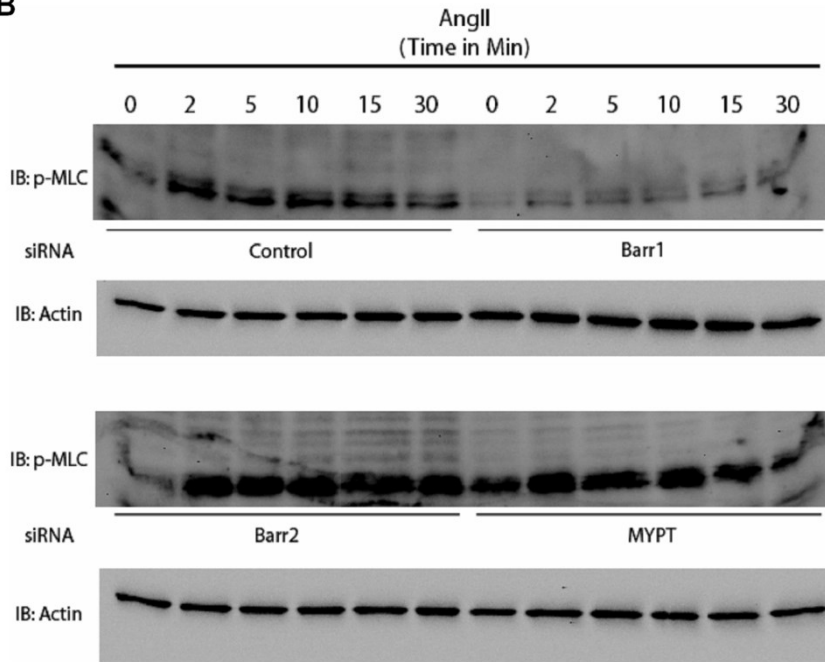
A, AT1aR-293 cells were transfected to express either β -arrestin-1-FLAG or β -arrestin-2-FLAG then stimulated with Ang II 1 nM for the indicated time. The interaction between overexpressed β -arrestin and endogenous MYPT-1 was analyzed by immunoprecipitation of MYPT-1 and revelation of β -arrestin by immunoblotting the FLAG tag. **B**, Semi-quantitative analysis of β -arrestin and MYPT interaction (n=4). For each experiment, the β -arrestin band with the highest intensity was assigned to 100% and all other bands were normalized as a percentage of that value. Data are presented as mean \pm standard mean error where *** $p < 0.001$ compared with respective unstimulated condition (0 min) using one-way ANOVA with Bonferroni correction.

Work from our group and others has revealed a critical role for both β -arrestins in cytoskeletal dynamics downstream of the AT1aR [32,38]. Since both β -arrestins bind MYPT-1, it suggests that this interaction may affect the levels of phosphorylated myosin light chain in cells. To investigate the roles of β -arrestin-1 and 2 in regulating MLC phosphorylation, we acutely knocked down β -arrestins expression by transiently transfecting AT1aR-293 cells with siRNAs targeting β -arrestin-1, β -arrestin-2 or MYPT-1. **Figure 3A** confirms that the knockdown of the different proteins of interest was effective. For all AT1aR 293 cells experiments, efficacies were evaluated and found to be 85.3 ± 3.8 % for β -arrestin-1, 78.6 ± 5.4 % for β -arrestin-2 and 88.7 ± 6.9 % for MYPT-1. Control and knocked down cells for β -arrestin-1, β -arrestin-2 or MYPT-1 were then analyzed for MLC phosphorylation in response to Ang II (1nM). Stimulation with Ang II rapidly induces MLC phosphorylation in control cells reaching a maximum between 2 and 10 minutes (**Figure 3B, upper left and 3C, solid circles**) and then showing a slight decrease before leveling off as the turnover of phospho-MLC reaches an apparent equilibrium for at least 30 min. In cells knocked down for β -arrestin-1, Ang II-stimulated MLC phosphorylation is essentially ablated (**Figure 3B, upper right and 3C, open circles**) suggesting that β -arrestin1 is required for Ang II driven MLC phosphorylation. Interestingly, Ang II stimulation of β -arrestin-2 knockdown cells leads to a dramatic increase in MLC phosphorylation, (**Figure 3B, lower left and 3C, filled triangles**), suggesting that β -arrestin-2 normally functions to suppress phosphorylation of MLC. MYPT-1 knockdown leads to a significant increase in both basal and Ang II stimulated MLC phosphorylation as would be predicted for cells lacking MLCP activity (**Figure 3B, lower right and 3C, open triangles**). Since the loss of β -arrestin-2 or MYPT-1 leads to a similarly high level of MLC phosphorylation, our results suggest that β -arrestin-2 is a positive regulator of MYPT-1 and, consequently, MLCP activity. Taken together, these data point towards opposing roles for β -arrestin-1 and β -arrestin-2 on MLC phosphorylation where β -arrestin-1 promotes MLC phosphorylation while β -arrestin-2 acts as a repressor of MLC phosphorylation by promoting the activity of MYPT-1 and the MLCP complex. These experiments identify the β -arrestins as important regulators of MLC phosphorylation and suggest that they may in turn affect myosin-dependent cell contraction and motility.

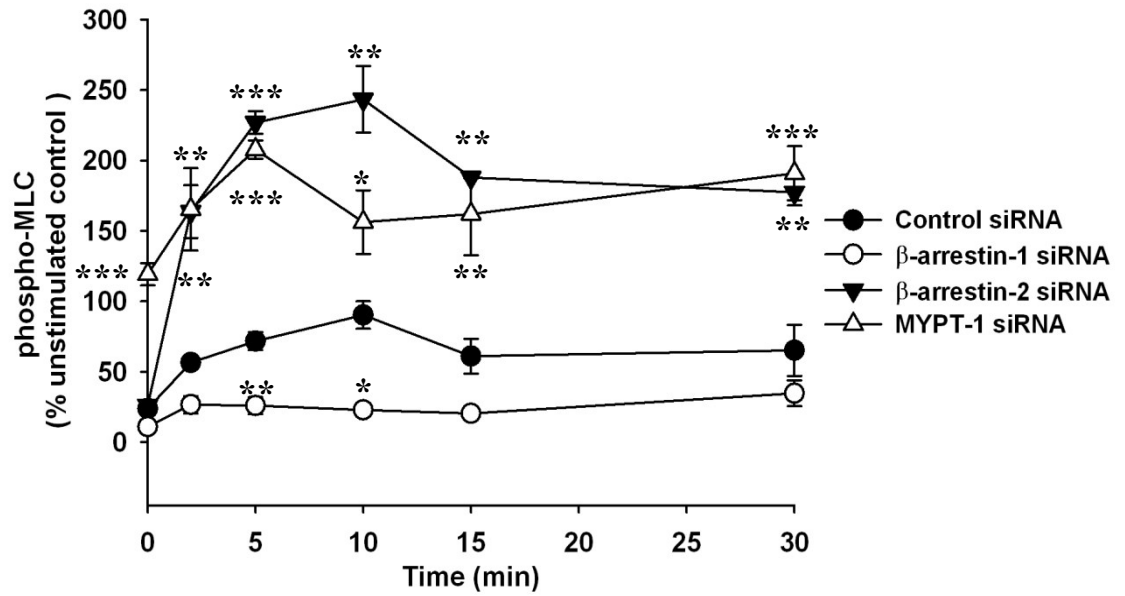
3A



3B



3C

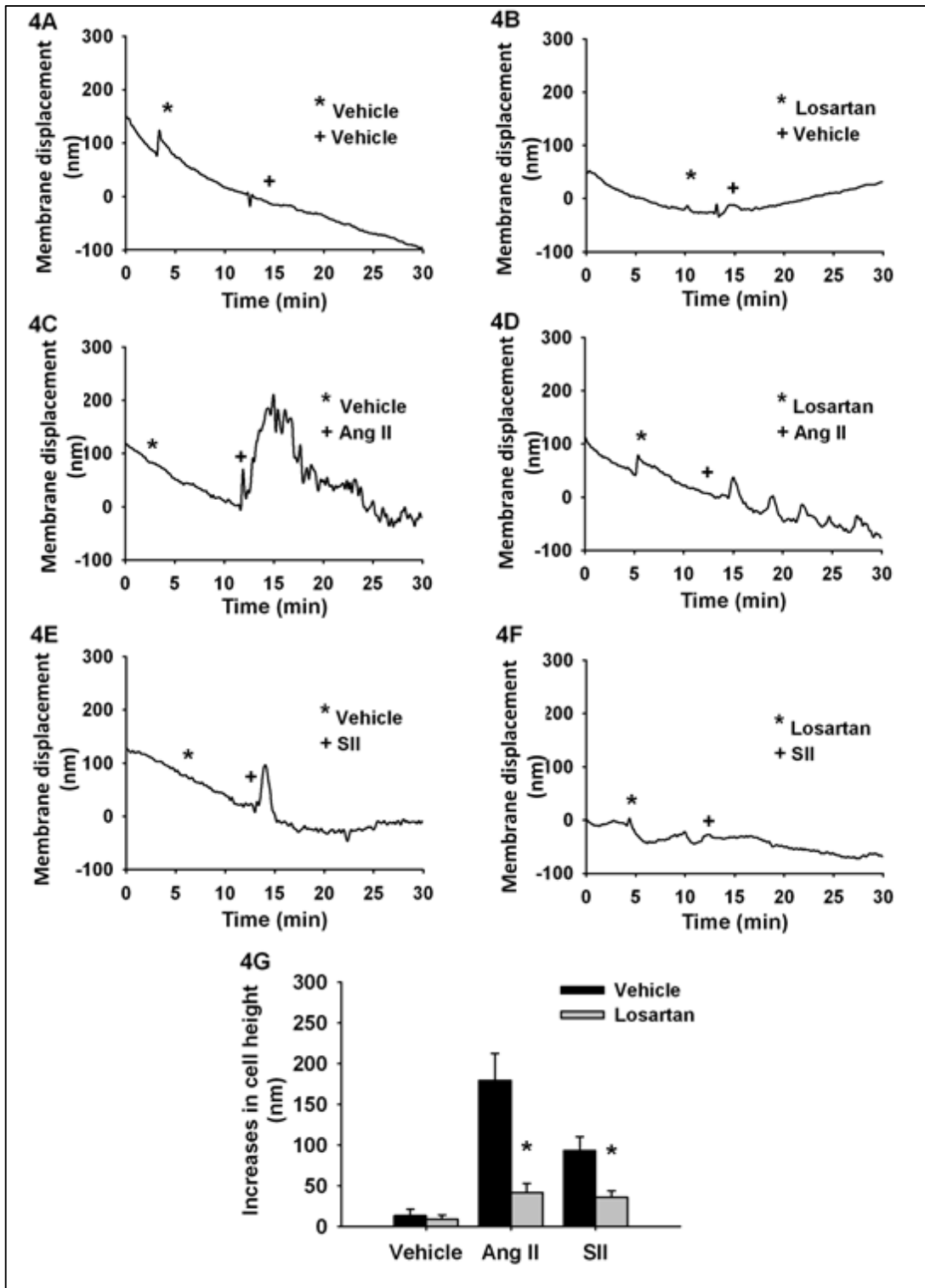


Article 1, Figure 3. β -Arrestin-1 and β -arrestin 2 have opposing role on MLC phosphorylation.

A, AT1aR-293 cells were transfected with siRNAs towards indicated proteins and immunoblotting was used to determine knockdown efficacies for indicated targets. **B**, AT1aR-293 cells were stimulated with Ang II 1nM for the indicated time after knockdown with indicated siRNAs. Phospho-MLC levels were analyzed by immunoblotting where actin was used as a loading control. **C**, Semi-quantitative analysis of phospho-MLC levels (n=4), where phospho-MLC levels are normalized according to respective actin levels then expressed as % of unstimulated control siRNA (0 min). Data are presented as mean \pm standard mean error where $p<0.01$ (5 min) and $p<0.05$ (10 min) for cells depleted in β -arrestin-1; $p<0.01$ (2, 10, 15 and 30 min) and $p<0.001$ (5 min) for cells depleted in β -arrestin-2 and $p<0.05$ (10 min), $p<0.01$ (2 and 15 min) and $p<0.001$ (0, 5 and 30 min) in cells depleted in MYPT-1 compared to Control siRNA sample at given time points using one-way ANOVA with Bonferroni correction.

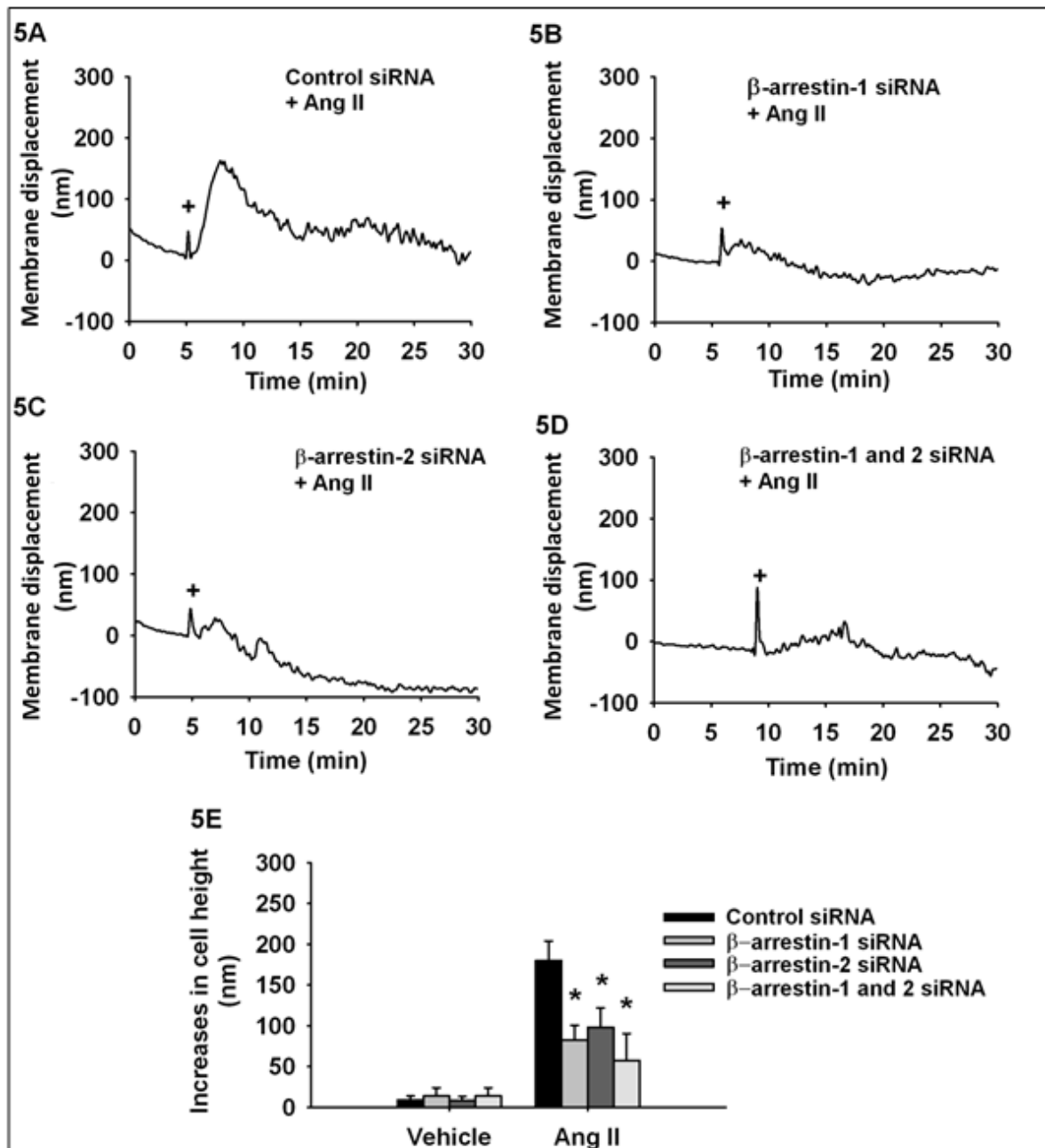
Since phosphorylation of MLC is associated with cell contractility and motility, we next determined if these β -arrestin-mediated regulations of MLC phosphorylation could also affect cellular contraction. In order to examine this question, we conducted AFM-based measurements of single cell contractility in response to AT1aR activation triggered by the full agonist Ang II (1nM) or the β -arrestin biased agonist SII (10 μ M) (**Figure 4**). AFM experiments quantify the contraction of the cell body as a rapid increase in cell height following the stimulation with agonists. Compiled independent experiments (**Figures 4C and 4E**), show that Ang II and SII elicit a contractile response of 179 ± 33 nm and 93 ± 17 nm, respectively. Those responses were also blocked by the AT1aR antagonist Losartan (**Figures 4D and 4F**), thus confirming the specificity of the contractile responses to the activation of AT1aR. Since Ang II elicits both G-protein-mediated and β -arrestin-mediated signalling responses, while the SII elicits only a β -arrestin-mediated signaling response, the smaller contractile response induced by SII suggests that there are two components to contractile events downstream of the AT1aR; one governed by G-protein-mediated signalling and one governed by β -arrestin signaling.

To examine the contribution of the β -arrestins in Ang II-dependent cell contraction, we conducted similar AFM experiments in cells transfected with β -arrestin-1 or β -arrestin-2 siRNA. When compared to the contractile response observed with Ang II (1nM) stimulation (179 ± 24 nm), the loss of β -arrestin-1 or 2 leads to smaller contractions of 82 ± 18 nm and 97 ± 24 nm, respectively (**Figures 5B and C**). Moreover, the repression of both β -arrestin-1 and 2 (**Figure 5D**) further decreases contractility (57 ± 33 nm). This further supports the notion that cellular contraction induced by Ang II involves a G-protein-mediated component that is independent of β -arrestin signalling.



Article 1, Figure 4. Ang II and SII induce cell contraction detectable by AFM.

Typical AFM curves monitoring the cellular contraction following stimulations with (A) Vehicle, (B) Losartan, (C) Ang II, (D) Losartan and Ang II (E) SII (F) Losartan and SII. G, Histogram showing average cell contraction (maximal cell height variation) of cells pretreated with Vehicle or Losartan 100 nM and stimulated with Ang II 1 nM or SII 10 μ M. Each bar represents 10-12 independent experiments and EMEM was used as vehicle. Data are expressed as mean \pm standard mean error where * $p < 0.05$ compared with respective Ang II and SII responses using Student *t*-test.

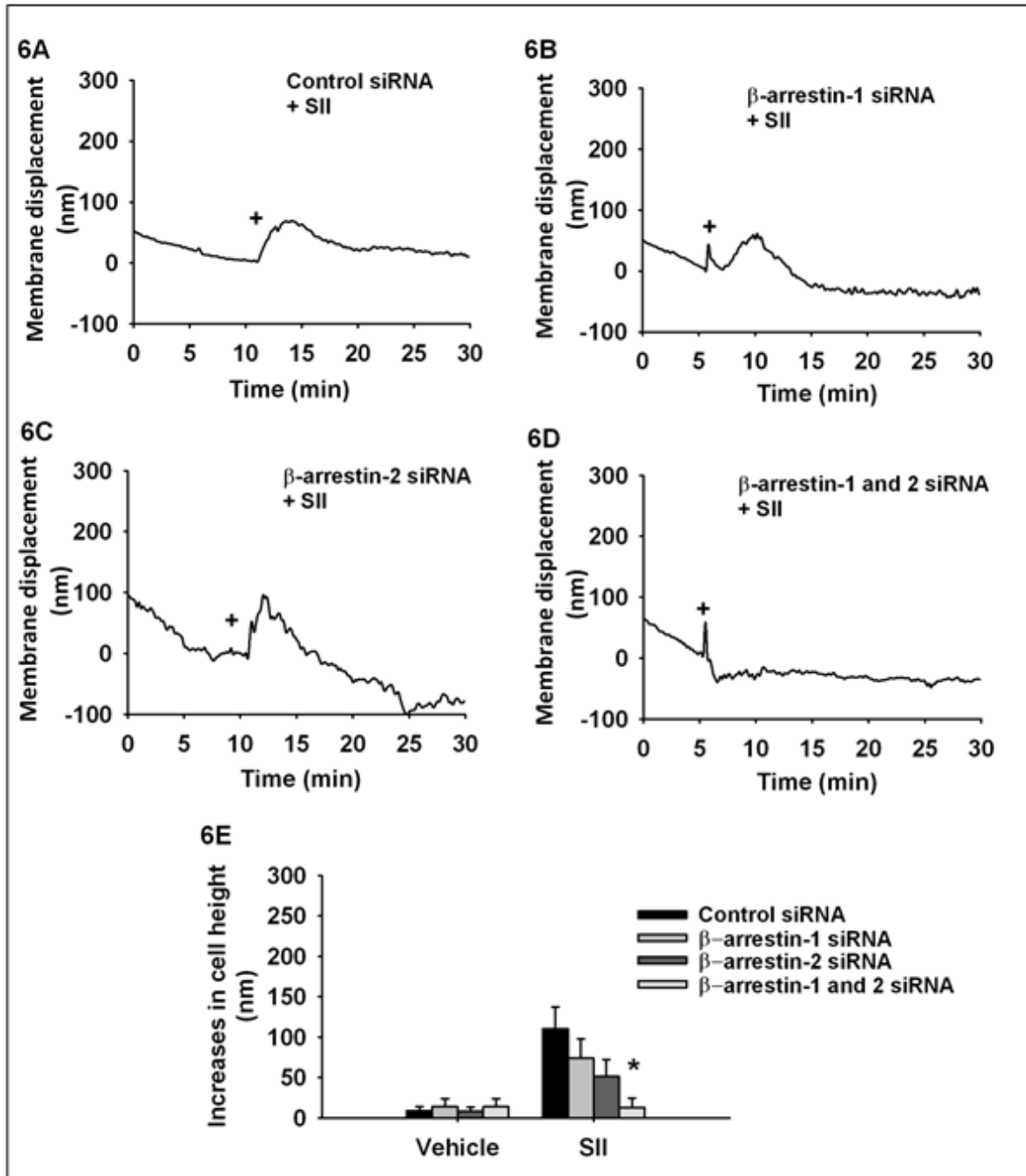


Article 1, Figure 5. β -Arrestin 1 and 2 are participating in Ang II-dependent cell contraction.

Typical AFM curves monitoring the cellular contraction following stimulations with (A) control, (B) β -arrestin-1, (C) β -arrestin-2 or (D) β -arrestin-1 and 2 siRNAs on Ang II-induced cellular contraction. E, Histogram showing average cell contraction (maximal cell height variation) (contraction) of cells transfected with indicated siRNA and stimulated with Ang II 1 nM. Each bar represents 10-12 independent experiments and EMEM was used as vehicle. Data are expressed as mean \pm standard mean error where * $p < 0.05$ compared with control transfection response using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test.

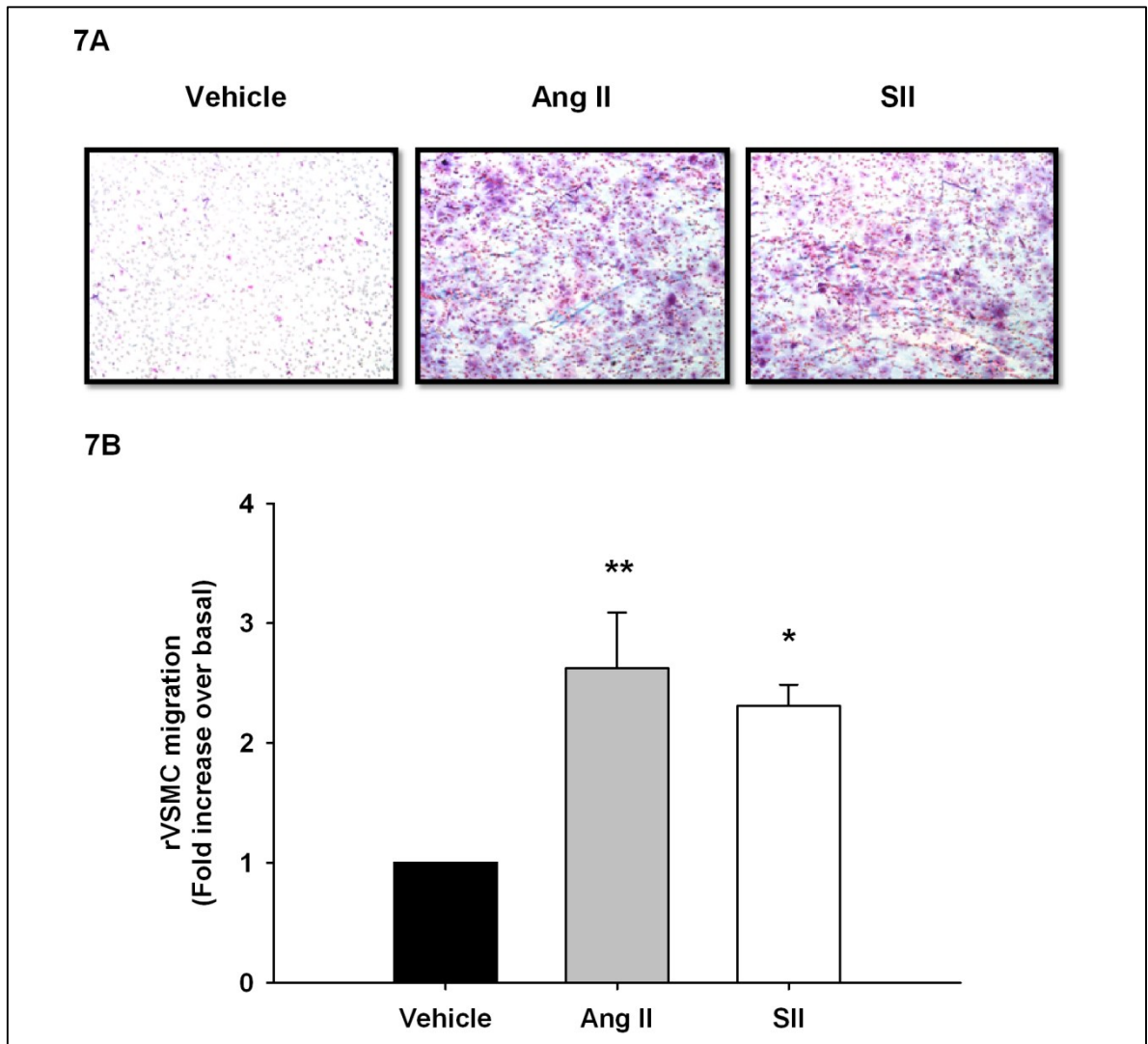
To determine if the SII-mediated effects on contractility seen in **Figure 4** are the result of β -arrestin signaling and to identify the respective contributions of β -arrestin-1 and 2 in this response, we knocked down β -arrestin-1 or β -arrestin-2 expression prior to stimulation with SII (10 μ M) (**Figure 6**). Interestingly, SII-dependent contractility (110 \pm 27 nm) was slightly decreased in cells lacking β -arrestin-1 (74 \pm 24 nm; **Figure 6B** and **6E**) or β -arrestin-2 (51 \pm 21 nm; **Figure 6C** and **6E**), whereas cells lacking both β -arrestins (13 \pm 12 nm) no longer responded (**Figure 6D** and **6E**). These results confirm, through use of the β -arrestin biased ligand, SII, that β -arrestin-mediated signalling is actively involved in cell contraction. Moreover, these results support the hypothesis that β -arrestin-regulated phospho-MLC turnover is necessary for successful cytoskeletal reorganization and membrane contraction [16]. Indeed, in cells lacking one or both β -arrestins, these events are compromised and this correlates with changes in the magnitude and timing of MLC phosphorylation.

Since it appears that both β -arrestins play a role in the regulation of MLC phosphorylation, and both are required for AT1aR-induced cellular contractility, we wished to examine the involvement of β -arrestin-1, β -arrestin-2, and MYPT-1 in a physiologically relevant system that expresses endogenous levels of AT1aR receptors. Therefore, we used primary cultures of rat vascular smooth muscle cells (rVSMC) as they endogenously express the AT1aR and contract robustly in response to Ang II (1nM; 2.6 \pm 0.5 fold) or SII (1 μ M; 2.3 \pm 0.2 fold) (**Figure 7**).



Article 1, Figure 6. SII acts as a biased agonist inducing contraction via both β -arrestin-1 and 2 activation.

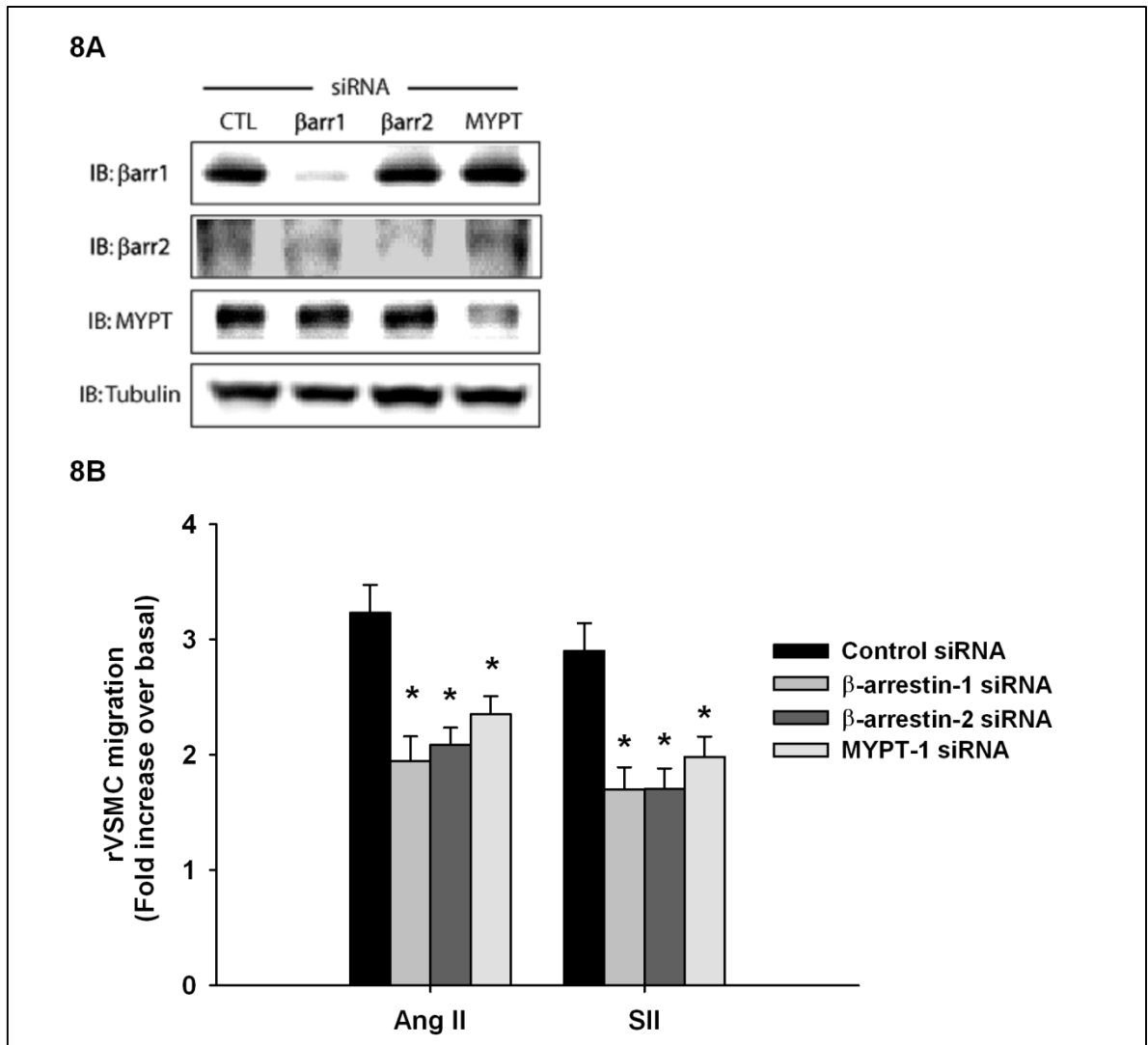
Typical AFM curves monitoring the cellular contraction following stimulations with (A) control, (B) β -arrestin-1, (C) β -arrestin-2 or (D) β -arrestin-1 and 2 siRNAs on SII-induced cellular contraction. E, Histogram showing average cell contraction (maximal cell height variation) of cells transfected with indicated siRNA and stimulated with SII 10 μ M. Each bar represents 10-12 independent experiments and EMEM was used as vehicle. Data are expressed as mean \pm standard mean error where * $p < 0.05$ compared with control transfection response using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test.



Article 1, Figure 7. Ang II and SII induce rVSMC migration.

A, Crystal violet staining of membranes following transwell migration assay of rVSMC exposed to Ang II 1 nM or SII 1 μ M. **B**, Histogram showing Ang II and SII induced chemotaxis in rVSMC (n=5). Data are expressed as mean \pm standard mean error where * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with vehicle using one-way ANOVA with Bonferroni correction.

The rVSMCs were then transfected with β -arrestin-1, β -arrestin-2, or MYPT-1 siRNAs and cell migration was assessed under Ang II or SII stimulation. Western blot analysis shows that knockdowns of β -arrestin-1, β -arrestin-2 or MYPT-1 in rVSMC were successful and did not affect the expression of other proteins of interest (**Figure 8A**). Knockdown efficacies were evaluated from multiple independent experiments and found to be 92.4 ± 10.2 % for β -arrestin-1, $86.4.6 \pm 7.1\%$ for β -arrestin-2 and $76.3 \pm 9.3\%$ for MYPT-1. Again, results show that chemotaxis is induced by both Ang II (10nM; 3.2 ± 2 fold) and SII (1 μ M; 2.9 ± 0.2 fold) in rVSMCs transfected with control siRNA. However, when the expression of β -arrestin-1 was repressed, the chemotactic response to either Ang II (1.9 ± 0.2 fold) or SII (1.7 ± 0.2 fold) was diminished (**Figure 8B**). Similar results could be found in cells where β -arrestin-2 expression was inhibited and stimulated with Ang II (2.1 ± 0.1 fold) or SII (1.7 ± 0.2 fold) (**Figure 8B**). Furthermore, results show that MYPT-1 removal also decreased rVSMC motility following Ang II (2.4 ± 0.2 fold) or SII (2.0 ± 0.2 fold) stimulation (**Figure 8B**). These data confirm that β -arrestin-mediated signaling plays a major role in promoting cell contractility and chemotaxis downstream of the AT1aR. Furthermore, it seems that the reciprocal regulation of phosphorylated MLC by β -arrestins-1 and 2 is a part of this interplay.



Article 1, Figure 8. β -Arrestins are required for cell migration.

A, rVSMC were transduced with siRNAs toward the indicated proteins. Immunoblots of representative rVSMC lysates from cell populations used in motility experiments were performed to confirm knockdown. **B**, rVSMC motility was examined using high-throughput QCM migration assay. Cell migration was assessed in response to Ang II 10 nM or SII 1 μ M stimulation after 3 hours. Histogram showing Ang II and SII induced chemotaxis in conditions of β -Arrestin-1, 2 and MYPT-1 depletion. Data are expressed as mean \pm standard mean error where * $p < 0.05$ compared with control transfection responses using one-way ANOVA with Bonferroni correction.

DICUSSION

The activation of distinct GPCRs has been reported to initiate numerous physiological responses including contraction in muscle and non-muscle cell types. In addition to their G-protein-mediated signaling, these receptors also trigger the recruitment and activation of β -arrestins that are not only responsible for mediating receptor internalization and desensitization, but also for driving G-protein-independent, β -arrestin-mediated signaling. The AT1aR is well-known to induce contractile responses in muscle cells [47]. Moreover, similar results have been found in non-muscle HEK-293 cells which overexpress AT1aR [46,48]; a well-established model system for elucidating AT1aR downstream signaling events. Interestingly, we have previously shown that β -arrestin-1 is required for Rho A activation and subsequent stress fiber formation and cytoskeleton rearrangement [32]. Furthermore, we have also shown that β -arrestin-2 is required for Ang-II-induced chemotaxis [38], thus implicating both β -arrestins in the contraction-motility signaling axis. Here we build upon those previous findings to further elucidate the mechanism whereby the β -arrestins regulate agonist-induced cell contraction through their interplay with MLC.

We have shown here that the β -arrestin-mediated regulation of phosphorylated MLC is a significant component of AT1aR-induced mechanical response. Depletion of β -arrestin-1 from cells decreases levels of phospho-MLC in response to AT1aR stimulation (**Figure 3**) suggesting a hyperactive MLCP complex. This regulatory event could be due to a simple sequestration of MYPT-1 away from the MLCP complex, or as suggested by our previous work [35] could be due to a loss of β -arrestin-1-dependent activation of Rho A. This would consequently lead to a loss of ROCK activation and hyperactive MLCP. Most likely, it is a combination of these factors that causes the effects seen by loss of β -arrestin-1.

Additionally, we have shown that β -arrestin-2 is important for AT1aR-mediated dephosphorylation of MLC (**Figure 3**). Agonist stimulation leads to higher levels of phospho-MLC in the absence of β -arrestin-2; suggesting that a β -arrestin-2/MYPT-1 complex may limit the access of MLCP to its substrate resulting in low activity of MLCP¹. Moreover, the loss of MYPT-1 in this system mimicked the loss of β -arrestin-2, thus lending further credence to the importance of MLCP activity and its reciprocal regulation by β -

¹ Une erreur a été repérée dans la version publiée de l'article. Cette phrase aurait dû être: "Agonist stimulation leads to higher levels of phospho-MLC in the absence of β -arrestin-2; suggesting that a β -arrestin-2/MYPT-1 complex is required for the full activity of MLCP."

arrestins in phospho-MLC turnover. Further investigation will be needed to completely understand the spatial and temporal interplay of the β -arrestins, MYPT-1 and the MLCP complex in response to AT1aR stimulation. ERK 1/2 [36] and several other signaling pathways are also involved in β -arrestin signaling [35]. Interestingly, it has been reported that ERK can phosphorylate MLCK and participate, to a small extent, in myosin light chain phosphorylation, cell contraction and force generation [49]. However, to our knowledge, no link has been made between β -arrestin-dependent ERK activation and MLCK regulation.

In 2008, Matsumura *et al.* proposed a model where high levels of phosphorylated MLC do not necessarily translate into increased cell contraction or migration. In their model, high MLC phosphorylation coupled with low MLCP activity result in low phospho-MLC turnover leading to increased cell adhesion and stress fiber formation. Conversely, high MLC phosphorylation coupled with high MLCP activity result in high phospho-MLC turnover leading to morphological changes and cell motility by accelerating focal adhesion turnover and limiting myosin-induced actin polymerization [16]. Our results suggest that the β -arrestins are required for this dynamic turnover of phospho-MLC. Moreover, in MYPT-1 depletion experiments, levels of phospho-MLC were found to be very high after Ang II treatment, and not surprisingly, MYPT-1 depletion in rVSMC reduced cell migration in response to both Ang II and SII. These results mirror those seen with loss of β -arrestin-2, and suggest that defective phospho-MLC turnover due to loss of β -arrestin-regulated MLCP activity leads to reduced cellular migration.

Cycling of MLC phosphorylation correlates with cell contractility [50] and we showed that activation of AT1aR signaling through β -arrestins induces an increase in phospho-MLC that can be correlated with cellular contraction events. We also observed that, SII, a β -arrestin-biased ligand for the AT1aR, can induce cellular contraction and cell migration (**Figure 4-8**). Interestingly, while the two β -arrestins appear to reciprocally regulate phosphorylation of MLC, loss of either β -arrestin-1 or β -arrestin-2 function appears to have similar effects on cell contractility and motility. Considering that phosphorylation of MLC is a key event in cellular contraction and a driver of cellular migration, we believe that a failure to properly regulate MLC cycling in the absence of β -arrestin-mediated signalling is manifested as defective cellular contractility and migration.

REFERENCES

1. Kolodney MS, Thimman MS, Honda HM, Tsai G, Yee HF. (1999) Ca²⁺-independent myosin II phosphorylation and contraction in chicken embryo fibroblasts. *J Physiol (Lond)* 515 (Pt 1): 87-92.
2. Tang DD, Anfinogenova Y. (2008) Physiologic properties and regulation of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 13: 130-140.
3. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. the angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-472.
4. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986.
5. Pandolfi A, Grilli A, Cilli C, Patruno A, Giaccari A, et al. (2003) Phenotype modulation in cultures of vascular smooth muscle cells from diabetic rats: Association with increased nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation. *J Cell Physiol* 196: 378-385.
6. Etienne P, Pares-Herbute N, Mani-Ponset L, Gabrion J, Rabesandratana H, et al. (1998) Phenotype modulation in primary cultures of aortic smooth muscle cells from streptozotocin-diabetic rats. *Differentiation* 63: 225-236.
7. Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. (2008) Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol* 104: 588-600.
8. Cade WT. (2008) Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 88: 1322-1335.
9. Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension* 53: 885-892.
10. Hirose A, Tanikawa T, Mori H, Okada Y, Tanaka Y. (2010) Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/rho signaling pathway. *FEBS Lett* 584: 61-66.
11. Bailey AJ, Sims TJ, Avery NC, Halligan EP. (1995) Non-enzymic glycation of fibrous collagen: Reaction products of glucose and ribose. *Biochem J* 305 (Pt 2): 385-390.
12. Miyazaki H, Hayashi K, Hasegawa Y. (2003) Tensile properties of fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Biorheology* 40: 207-212.

13. Mack CP. (2011) Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1495-1505.
14. Xie C, Ritchie RP, Huang H, Zhang J, Chen YE. (2011) Smooth muscle cell differentiation in vitro: Models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1485-1494.
15. Ikebe R, Reardon S, Mitsui T, Ikebe M. (1999) Role of the N-terminal region of the regulatory light chain in the dephosphorylation of myosin by myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 274: 30122-30126.
16. Matsumura F, Hartshorne DJ. (2008) Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 149-156.
17. Lincoln TM. (2007) Myosin phosphatase regulatory pathways: Different functions or redundant functions? *Circ Res* 100: 10-12.
18. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, et al. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by rho-associated kinase (rho-kinase). *J Biol Chem* 271: 20246-20249.
19. Takeuchi M, Makita Z, Bucala R, Suzuki T, Koike T, et al. (2000) Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Mol Med* 6: 114-125.
20. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. (2001) Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia* 44: 129-146.
21. Moheimani F, Morgan PE, van Reyk DM, Davies MJ. (2010) Deleterious effects of reactive aldehydes and glycated proteins on macrophage proteasomal function: Possible links between diabetes and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1802: 561-571.
22. DeGroot J, Verzijl N, Wenting-Van Wijk MJ, Bank RA, Lafeber FP, et al. (2001) Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation: The role of advanced glycation end products. *Arthritis Rheum* 44: 2562-2571.
23. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, et al. (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267: 14998-15004.
24. Fritz G. (2011) RAGE: A single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* 36: 625-632.
25. Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.

26. Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L. (2000) Rho GTPases: Signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261: 1-12.
27. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. (2006) Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114: 597-605.
28. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, et al. (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269: 9889-9897.
29. Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. (2003) Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids* 25: 283-292.
30. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, et al. (2003) Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101: 2652-2660.
31. Kim S, Iwao H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52: 11-34.
32. Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren X, Milligan G, et al. (2005) Beta-arrestin 1 and α 11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* 280: 8041-8050.
33. Goodman OB, Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, et al. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383: 447-450.
34. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, et al. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3712-3717.
35. Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Chen YZaM, Shenoy SK, et al. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12011-12016.
36. Wei H, Ahn S, Barnes WG, Lefkowitz RJ. (2004) Stable interaction between beta-arrestin 2 and angiotensin type 1A receptor is required for beta-arrestin 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem* 279: 48255-48261.
37. Godin CM, Ferguson SSG. (2010) The angiotensin II type 1 receptor induces membrane blebbing by coupling to rho A, rho kinase, and myosin light chain kinase. *Mol Pharmacol* 77: 903-911.

38. Hunton DL, Barnes WG, Kim J, Violin, Xiu-Rong Ren and Jonathan D., Reiter E, et al. (2005) Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol* 67: 1229-1236.
39. Ren XR, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, et al. (2005) Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1448-1453.
40. Kim J, Ahn S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. (2009) Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 284: 11953-11962.
41. Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, et al. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2449-2454.
42. Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, et al. (2005) Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1442-1447.
43. Eguchi A, Dowdy SF. (2010) Efficient siRNA delivery by novel PTD-DRBD fusion proteins. *Cell Cycle* 9: 424-425.
44. Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, et al. (2006) Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 281: 10856-10864.
45. Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, et al. (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267: 17882-17890.
46. Cuerrier CM, Benoit M, Guillemette G, Gobeil F, Jr, Grandbois M. (2009) Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Arch* 457: 1361-1372.
47. Mehta PK, Griendling KK. (2007) Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-97.
48. Auger-Messier M, Turgeon ES, Leduc R, Escher E, Guillemette G. (2005) The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II modifies the morphology and cytoskeletal organization of HEK-293 cells. *Exp Cell Res* 308: 188-195.

49. D'Angelo G, Adam LP. (2002) Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H602-10.
50. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 778-790.
51. Safar ME, Lacolley P. (2007) Disturbance of macro- and microcirculation: Relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1-7.
52. Chillelli NC, Burlina S, Lapolla A. (2013) AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A "glycooxidation-centric" point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23: 913-919.
53. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, et al. (2004) Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 27: 1761-1773.
54. Chawla D, Bansal S, Banerjee BD, Madhu SV, Kalra OP, et al. (2014) Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvasc Res* 95C: 1-6.
55. Ahmed N. (2005) Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67: 3-21.
56. Ramamurthy B, Jones AD, Larsson L. (2003) Glutathione reverses early effects of glycation on myosin function. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C419-24.
57. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, et al. (2000) Blockade of RAGE-amyloid signaling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405: 354-360.
58. Chuong C, Katz J, Pauley KM, Bulosan M, Cha S. (2009) RAGE expression and NF-kappaB activation attenuated by extracellular domain of RAGE in human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 221: 430-434.
59. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, et al. (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274: 31740-31749.
60. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

61. Temple A, Yen TY, Gronert S. (2006) Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin. *J Am Soc Mass Spectrom* 17: 1172-1180.
62. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. (2012) NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
63. Brosseau J, Lucier J, Lapointe E, Durand M, Gendron D, et al. (2010) High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA* 16: 442-449.
64. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8: R19.
65. Cuerrier CM, Benoit M, Guillemette G, Gobeil F, Jr, Grandbois M. (2009) Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Arch* 457: 1361-1372.
66. Butt H-, Jashke M. (1995) Thermal noise in atomic force spectroscopy. *Nanotechnology* 6: 1-7.
67. Boucher J, Simard E, Froehlich U, Grandbois M. (2014) Amplification of AngII-dependent cell contraction by glyoxal: Implication of cell mechanical properties and actomyosin activity. *Integr Biol (Camb)* .
68. Tsien RY, Rink TJ, Poenie M. (1985) Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6: 145-157.
69. Nguyen N, Biet M, Simard E, Beliveau E, Francoeur N, et al. (2013) STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca²⁺ channel activity. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1294-1303.
70. Bovenzi V, Savard M, Morin J, Cuerrier CM, Grandbois M, et al. (2010) Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli. *J Cell Physiol* 222: 168-176.
71. Cuerrier CM, Chabot V, Vigneux S, Aimez V, Escher E, et al. (2008) Surface plasmon resonance monitoring of cell monolayer integrity: Implication of signaling pathways involved in actin-driven morphological remodeling. *Cell Mol Bioeng* 1: 229-239.
72. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. (2003) Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care* 7: 427-434.
73. Cuerrier CM, Benoit M, Guillemette G, Jr Gobeil F, Grandbois M. (2008) Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling

in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* .

74. Hubmayr RD, Shore SA, Fredberg JJ, Planus E, Panettieri RA, Jr, et al. (1996) Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 271: C1660-8.
75. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. (2001) Rho-rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 22: 32-39.
76. Rasmussen H, Takuwa Y, Park S. (1987) Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J* 1: 177-185.
77. Olson ES, Dong W. (2006) Nonlinearity in intracochlear pressure. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 68: 359-364.
78. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84: 767-801.
79. Suga T, Iso T, Shimizu T, Tanaka T, Yamagishi S, et al. (2011) Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb* 18: 670-683.
80. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, et al. (2004) Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: Biochemical characterization and formation kinetics. *Anal Biochem* 324: 68-78.
81. Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, et al. (1996) N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the maillard reaction. *Biochemistry* 35: 8075-8083.
82. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. (1995) N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 34: 10872-10878.
83. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72: 1493-1505.
84. Liu L, Abramowitz J, Askari A, Allen JC. (2004) Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2173-82.
85. Zhang X, Meng H, Wang MM. (2013) Collagen represses canonical notch signaling and binds to notch ectodomain. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1274-1280.

86. Schad JF, Meltzer KR, Hicks MR, Beutler DS, Cao TV, et al. (2011) Cyclic strain upregulates VEGF and attenuates proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vasc Cell* 3: 21-824X-3-21.
87. Kimes BW, Brandt BL. (1976) Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res* 98: 349-366.
88. Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN. (2003) Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7129-7134.
89. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 15: 100-108.
90. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, et al. (1999) Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 73-82.
91. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, et al. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183.
92. Hemmings BA, Restuccia DF. (2012) PI3K-PKB/akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011189.
93. Xie P, Fan Y, Zhang H, Zhang Y, She M, et al. (2009) CHIP represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation via ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 29: 2398-2408.
94. Friedl P, Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374.
95. Holle AW, Engler AJ. (2010) Cell rheology: Stressed-out stem cells. *Nat Mater* 9: 4-6.
96. Swaminathan V, Mythreye K, O'Brien ET, Berchuck A, Blobe GC, et al. (2011) Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res* 71: 5075-5080.
97. Berdyeva TK, Woodworth CD, Sokolov I. (2005) Human epithelial cells increase their rigidity with ageing in vitro: Direct measurements. *Phys Med Biol* 50: 81-92.
98. Ulrich P, Zhang X. (1997) Pharmacological reversal of advanced glycation end-product-mediated protein crosslinking. *Diabetologia* 40 Suppl 2: S157-9.
99. Bucala R, Cerami A. (1992) Advanced glycosylation: Chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol* 23: 1-34.

100. Halka AT, Turner NJ, Carter A, Ghosh J, Murphy MO, et al. (2008) The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Cardiovasc Pathol* 17: 98-102.
101. Briones AM, Arribas SM, Salaices M. (2010) Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 187-194.
102. Ren J, Albinsson S, Hellstrand P. (2010) Distinct effects of voltage- and store-dependent calcium influx on stretch-induced differentiation and growth in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 285: 31829-31839.
103. Thatcher SE, Marshall University. (2007) MLCK/actin interaction in the contracting A7r5 cell and vascular smooth muscle. : Marshall University.
104. Simard E, Kovacs JJ, Miller WE, Kim J, Grandbois M, et al. (2013) B-arrestin regulation of myosin light chain phosphorylation promotes AT1aR-mediated cell contraction and migration. *PloS one* In Press.
105. Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N. (2013) Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int J Inflamm* 2013: 403460.
106. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, et al. (1999) Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation* 100: 1134-1146.
107. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, et al. (1993) Accumulation of maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 91: 2463-2469.
108. McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, et al. (1993) Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91: 2470-2478.
109. Yamamoto Y, Yamamoto H. (2013) RAGE-mediated inflammation, type 2 diabetes, and diabetic vascular complication. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 105.
110. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. (2010) The RAGE axis: A fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res* 106: 842-853.
111. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. (2003) Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 93: 1159-1169.

112. Goldin A, Beckman J, Schmidt A, Creager M. (2006) Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114: 597-605.

ARTICLE 2

Activated receptors for advanced glycation end-products interfere with the vascular smooth muscle cell contractile phenotype and function

Auteurs de l'article: Elie Simard, Thomas Söllradl, Jean-Sébastien Maltais, Julie Boucher, Pedro D'Orléans-Juste et Michel Grandbois

Statut de l'article: Accepté avec révision mineure à *Plos One* (2015/02/24)

Avant-propos: J'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées dans cet article. De plus, j'ai analysé et interprété les données obtenues, puis, j'ai rédigé le manuscrit sous la supervision des Prs Michel Grandbois et Pedro D'Orléans-Juste. Tous les auteurs ont lu, critiqué, révisé et accepté le manuscrit.

Résumé : Les concentrations élevées de glucose plasmatique favorisent une réaction lente entre les protéines et le glucose ayant comme conséquence la formation des AGE. Les protéines exposées au glucose (albumine, collagène et élastine) accumulent ces AGE et peuvent activer leur récepteur RAGE retrouvé, entre autre, au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses du système vasculaire (VSMC). RAGE possède une signalisation intracellulaire complexe qui implique les petites protéines G et les MAPK menant à une activité accrue du facteur de transcription NF- κ B. Alors que l'activation de RAGE au niveau endothélial a été adressée à plusieurs reprises; il existe encore peu d'informations sur l'effet de la signalisation RAGE au niveau de la fonction des VSMC. En conséquence, nous avons émis l'hypothèse que la signalisation RAGE altère les propriétés structurelles et fonctionnelles des VSMC et pourrait contribuer aux complications associées au diabète. Ainsi nous avons déterminé que RAGE est bel et bien exprimé et fonctionnel au niveau des cellules A7r5; un modèle de VSMC. De plus, l'activation de RAGE chez ces cellules induit une augmentation importante de l'activité du facteur de transcription NF- κ B bien connue pour altérer le profil d'expression génétique et le phénotype des VSMC. Les

niveaux protéiques du facteur de transcription MyoC, impliqué dans la régulation du phénotype contractile, se sont trouvés diminués chez les cellules exposées aux AGE. Ces résultats corrélerent avec la diminution observée au niveau de l'ARNm et de la protéine SM-22 α : un régulateur de la contraction des VSMC. De façon intéressante, l'activation de RAGE a également modifié les propriétés mécaniques des cellules A7r5; soit *via* une augmentation de rigidité corticale possiblement causée par une activité accrue de la myosine. Finalement, l'activation de RAGE a amplifié la relâche calcique et l'activité de la myosine chez les cellules stimulées à l'AVP. Toutefois, en dépit de l'amplification de la signalisation calcique observée, les cellules exposées aux AGE ont perdu la réponse contractile normalement observée lors de la stimulation à l'AVP. Ainsi, l'activation de RAGE semble être un élément clé dans le développement des maladies vasculaires associées au diabète puisqu'elle interfère vraisemblablement avec le phénotype contractile des VSMC en modifiant leurs propriétés mécaniques et fonctionnelles.

TITLE: Activated receptors for advanced glycation end-products interfere with the vascular smooth muscle cell contractile phenotype and function.

AUTHORS : Elie Simard¹, Thomas Söllradl ¹, Jean-Sébastien Maltais¹, Julie Boucher¹, Pedro D'Orléans-Juste^{1,2} and Michel Grandbois^{1,2,3}

AFFILIATIONS : ¹Département de Pharmacologie, ²Institut de Pharmacologie de Sherbrooke and ³Chaire de Recherche Canadienne en Nanopharmacologie et Microscopie à Force Atomique,
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4

CORRESPONDING AUTHOR: Michel Grandbois

Département de Pharmacologie

Faculté de médecine et des sciences de la santé

3001 12e Avenue, Sherbrooke, J1H 5N4, Qc, Canada

Tel: 1-819-820-6868 #12369

Fax: 1-819- 564-5400

Michel.Grandbois@USherbrooke.ca

ABSTRACT

Elevated blood glucose concentrations promote reactions between glucose and proteins to form advanced glycation end-products (AGE). AGE circulating in the blood plasma can activate the receptor for advanced end-products (RAGE), which is present on both endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMC). RAGE exhibits a complex signaling involving small G-proteins as well Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) leading to increased NF- κ B activity. While RAGE activation in endothelial cells has been addressed previously, little is known on its impact on the function of VSMC. Therefore, we hypothesized that RAGE signaling leads to alterations in the mechanical and functional properties of VSMC which could contribute to complications associated with diabetes. We found that RAGE is expressed and functional in the A7r5 VSMC model and its activation by AGE increased significantly NF- κ B activity, which is known to interfere with the contractile phenotype of the VSMC. Protein levels of the contraction-related transcription factor myocardin were also reduced by RAGE stimulation with a concomitant decrease in mRNA and protein levels of transgelin (SM-22 α), a regulator VSMC contraction. Interestingly, we found that RAGE activation increased the overall cell rigidity, an effect that can be related to increase in myosin activity. Finally, although RAGE stimulation amplified calcium signaling and slightly myosin activity in VSMC challenged with AVP, their contractile capacity was negatively affected. Overall, we found that RAGE activation in VSMC could be a keystone in the development of vascular diseases associated to diabetes by interfering with the contractile phenotype of VSMC through the modification of their mechanical and functional properties.

INTRODUCTION

Chronic hyperglycemia leads to the formation of sugar-derived adducts called advanced glycation end-products (AGE) (1). AGE result from a slow chemical reaction between sugars and amines groups present in proteins, lipids or DNA (2). Glycation of plasma protein such as albumin and hemoglobin is universally used as a marker of chronic hyperglycemia in diabetic patients (3). During AGE formation, primary amines in proteins react slowly with either glucose, its autoxidation products or other glycolysis intermediates such as glyoxal or

methylglyoxal. A variety of AGE structures have been identified: carboxymethyl-lysine (CML), carboxyethyl-lysine, pyrallyine, pentoside, imidazolone, pyrimidine, etc. An important aspect of AGE formation is the activation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) (4). It was previously suggested that sustained RAGE activation by AGE present in the blood plasma could lead to an aberrant activation of multiple signaling pathways such as the small G protein RhoA, Cdc42, Rac and Ras (5), proteins member of the mitogen activated protein kinase family ERK1/2, JNK and P38 (6) or JAK/STAT and PI3K/AKT kinases (7) and the nuclear factor kappa B (NF- κ B) which participates in the regulation of over 150 genes related to inflammation, cell proliferation, immune system modulation or apoptosis (8). RAGE activation also causes an important oxidative stress via an increased production of reactive oxygen species further reinforcing NF- κ B activation (9). Therefore, it is suggested that RAGE-dependent NF- κ B activation in vascular cells could be an important contributor to vascular dysfunction. Interestingly, RAGE's expression is also positively regulated by RAGE-dependent NF- κ B activation (10). Through this positive feedback mechanism, it is suggested that RAGE activation could exacerbate the chronic inflammation commonly associated with diabetes.

Vascular smooth muscle cells (VSMC) are the mechanically active cell layer in the vascular system and they are directly responsible for regulating blood pressure and blood flow distribution (11). A deregulation of vascular smooth muscle cell phenotype and contractile function can lead to hypertension and complications such as cardiac hypertrophy and failure, renal dysfunction and cerebrovascular diseases (12). VSMC are not terminally differentiated cells. While their phenotype is most of the time contractile; mechanical, hormonal and environmental stimuli, such as alteration of the extracellular matrix, can lead to a switch toward a synthetic and proliferative phenotype. This phenotypic plasticity allows VSMC to fulfill divergent roles such as the active regulation of the vascular tone and arterial remodeling, repair and growth (13).

A major regulator of the contractile phenotype of VSMC is the serum response factor (SRF) which plays a pivotal role in the regulation of many contractile associated genes such as smooth muscle alpha-actin (SM- α -actin), smooth muscle myosin heavy chains (SM-MHC) and transgelin (SM-22 α) thereby maintaining VSMC contractile function (14). Myocardin (MyoC) and myocardin related transcription factor (MRTF) are two transcriptional

coactivators which, together with SRF, are responsible for maintaining VSMC in a differentiated contractile phenotype. Further, small GTPases, such as RhoA, play also an essential role in regulating VSMC contractile phenotype by increasing actin-dependent nuclear translocation of MRTF. Conversely, the activation of the MAPK ERK 1/2 pathway or transcription factor NF- κ B, through the inhibition of MyoC or MRTF association with SRF, leads to a phenotype switch by down-regulating the expression of proteins involved in the contractile phenotype (15).

Several lines of evidence suggest a role for RAGE in the regulation of genes involved in the contractile phenotype of VSMC. Since little is known about the impact of RAGE activation on the mechanical properties of VSMC, we set out to delineate the impact of its activation on the phenotype of VSMC and the downstream consequences of this signaling interplay on their functional mechanical activity. Here, we show that VSMC express the AGE receptor RAGE and are sensitive to various AGE derived from human serum albumin (HSA). Working with AGE-HSA as well as with the specific protein adduct HSA-CML, we demonstrate that RAGE activation interferes with the VSMC phenotype by modifying the expression of important contractile marker proteins and regulators associated with their contractile phenotype. Finally, we show that RAGE activation decreases the ability of VSMC to respond to vasopressin, a vasoactive hormone known to induce vascular smooth muscle cell contraction. Taken together, our results support the hypothesis that RAGE activation can modify vascular homeostasis by inducing VSMC de-differentiation and loss of contractile function.

METHODS

Reagents — Vasopressin was purchased from American Peptide Compagny (66-0-03). Phosphate buffered saline (PBS; 311-425-CL) and Hepes (330-050-EL) were purchased from Wisent. Fura-2/AM was from Life Technologies (F-1201). Tris (hydroxymethyl) aminomethane (T395-1), NaCl (S671), KCl₂ (P217) and CaCl₂ (C70) were bought from Fisher. Glycine (G7126), Glucose (G8270) and EGTA (E0396) were purchased from Sigma. MgSO₄ (AC-5568) was ordered from Anachemia.

Cell culture — Rat aortic/thoracic vascular smooth muscle cells (A7r5) (CRL-1444; ATCC) were maintained in minimum essential Dulbecco's modification Eagle's medium (DMEM) (319-005; Wisent) containing 10% FBS, 0.6 IU/ml penicillin (450-201-EL; WISENT), 600 µg/ml streptomycin (450-201-EL; WISENT) and non-essential amino acids (NEAA) (312-012; Wisent). Cells were grown on 10 cm petri dishes (353003; Corning), unless specified otherwise, at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. Cells were passed twice a week until confluence was reached and starved 24 hours before any experiments since FBS contains AGE harboring CML adducts (**S1 Figure 1C**).

Glycation of albumin — To study RAGE activation from AGE; AGE derived from long term incubation of albumin with glucose is widely used. Here two types of glycated HSA were synthesized: one containing a wide variety of AGE called AGE-HSA and one known to contain only CML adducts named CML-HSA. Therefore, glycated recombinant human serum albumin (HSA) (A9731; Sigma) was prepared as previously described (16). Briefly, AGE-HSA was produced incubating 50 mg/ml HSA with 30 mM D-Glucose PBS at 37°C, in the dark and for 6 weeks. CML-HSA was produced by incubating 50 mg/ml HSA in 0.1M phosphate buffer pH 7.4 with 45 mM Glyoxylic acid (128465; Sigma) and 150 mM sodium cyanoborohydride (156159; Sigma) at 37°C, in the dark for 24 hours. Produced AGE were also dialyzed 48 hours at 4°C to remove reagents excess, filtered on 0.2 µm (83.1826.001; Sarstedt) and final protein concentrations were also determined by BCA assay (17). All AGE were produced using sterile material and under sterile condition.

Free primary amine assay — Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) reacts readily with the primary amino groups of amino acids in aqueous solution at pH 8 to form yellow adducts whereas no colored derivatives are formed with the secondary amino acids proline and hydroxyproline. TNBSA has been used as a hydrophilic modifying reagent for the detection of solvent-exposed primary amines in samples containing amino acids, peptides or proteins [35]. HSA, AGE-HSA or CML-HSA were diluted 2:1 to a final concentration of 100 µg/ml with 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) 0.01% in sodium carbonate buffer pH 8.5 (P2297; Sigma) and incubated 2 hours at 37°C. The reaction was stopped by diluting the mixture 3:1:0.5 with SDS 10% and HCl 1M, respectively. Absorbance at 420 nm was

measured in a plate reader (SpectraMax Plus 384; Molecular Device) and free amines were determined using a glycine standard curved under the same conditions. Percentage of modification was calculated based of the number of free primary amines present in HSA: 59 lysine and 24 arginine residues (18).

Immunoblotting — For direct detection of protein levels, whole-cell lysates solubilized in loading buffer containing 10mM Tris pH 6.8, 2% SDS (15525-017; Invitrogen), 0.01% Bromophenol Blue (B0126; Sigma), 10% Glycerol (G33-500; Fisher) and 0.1M DTT (D9779; Sigma), were used for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. SDS-PAGE were conducted on 10 % polyacrylamide (1500; Calbiochem) Tris-glycine gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (NEF1002; PerkinElmer) for immunoblotting according to standard protocols. Immunoblots were performed using the following antibodies: CML (ab27684; Abcam), RAGE (MAB5328, Millipore), phosphorylated ERK (4370; Cell Signaling), ERK (4695; Cell Signaling), phosphorylated p38 (4631; Cell Signaling), p38 (9212; Cell Signaling), phosphorylated JNK/SAPK (4668; Cell Signaling), JNK/SAPK (9258; Cell Signaling), phosphorylated Ser473 AKT (9271; Cell Signaling), AKT (8272; Cell Signaling), Vasopressin Type 1A receptor (Ab3506P; Millipore), SM- α -actin (ab5694; Abcam), SM-MHC (ab53219; Abcam), MyoC (ab22073; Abcam), SM-22 α (ab14106; Abcam), phosphorylated Ser19 MLC (3671, Cell Signaling) and Tubulin (T5293, Sigma). Primary antibodies were detected with horseradish peroxidase-coupled rat (ab6734; Abcam), mouse (A-9044; Sigma) or rabbit (ab6721; Abcam) secondary antibodies using Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (80196, Pierce). Chemiluminescence was detected with Amersham Hyperfilm ECL (28906839, GE Healthcare) and quantified (Gel Analyzer 2010a). Relative quantification of protein levels was performed by dividing the intensity of the band corresponding to the protein of interest by the intensity of the band mentioned as the loading control protein.

NF- κ B-GFP assay — 24 hours prior cell stimulation, 70% confluent A7r5 cells, grown in glass-bottom 24 well plates (P24-1.5H-N, In Vitro Scientific), were transfected with Cignal Reporter Assay plasmids (CCS-031G, Qiagen) using Lipofectamine 2000 (52887, Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. Briefly, Lipofectamine 2000 was

mixed in a 1:9 ratio with Opti-MEM (31985-070; Gibco) and incubated five min. Meanwhile, 250 ng of negative, positive or assay plasmids were mixed with the same volume of opti-MEM used for the Lipofectamine 2000. Afterward, the DNA mixture was added to the diluted Lipofectamine 2000 solution and incubated 20 min. Meanwhile, cells were washed with PBS and cell media was replaced with DMEM containing only 10% FBS and NEAA for 10 times the volumes used to dilute the Lipofectamine 2000. After the incubation, the transfection mixture was added to the cell and mixed. 24 hours after the transfection, cells were washed with PBS, starved with DMEM containing only NEAA and stimulated with PBS, 1 mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA for 24 hours. GFP fluorescence was determined by fluorescence microscopy using an inverted epifluorescence microscope (Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss, Germany). Pictures were taken with a 20x objective and an Endow GFP band pass filter (41017, Chroma Technology Inc.) with excitation at 470/40 nm and emission at 525/50 nm. Fluorescence quantification was achieved with ImageJ software (19); see *Microscopy fluorescence image analysis* section for more details.

Actin labelling and fluorescence microscopy — Cells grown on 25 mm glass coverslips were treated 24 hours with PBS, 1 mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA. Cells were treated either with PBS or 200 nM AVP five min before fixation with 4.0% paraformaldehyde (G6403, Sigma) in PBS for 10 min and at room temperature. Fixed cells were washed with PBS for five min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (807426; MP Biomedicals) in PBS for one min. Cells were then incubated with the blocking solution Image-iT (I36933, Invitrogen) for 30 min prior incubation with Phalloidin/Texas Red (T7471, Invitrogen) and Hoechst (B2261, Sigma-Aldrich) for 30 min. The coverslips were then mounted on microscope slides using Prolong Gold anti-fade reagent (P39634, Invitrogen). An inverted epifluorescence microscope (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss) was used for fluorescence acquisition. Band pass filters with excitation at 560/40 nm and emission at 630/60 nm were used for Texas-Red (Chroma Technology Inc.). Band pass filters with excitation at 365/40 nm and emission at 445/50 nm were used for Hoechst (Carl Zeiss). Fluorescence quantification was achieved with ImageJ software (19); see *Microscopy fluorescence image analysis* section for more details.

Microscopy fluorescence image analysis — Using ImageJ software, background was removed using the Remove Background algorithm with a setting of 1000 pixel. White noise contained in the images was also evaluated by measuring the grey value distribution of an area that doesn't contain any fluorescence. The maximum grey values measured: 40 for eGFP and 100 for Texas Red were standardly used to remove white noise from all images. Afterward, the density of grey values was measured for each picture and used for statistical and data analysis.

Quantitative real-time polymerase chain reaction — Total mRNA extractions were performed on cell pellets using TRIzol (15596026; Invitrogen) with chloroform (9180-01; J.T. Baker), following the manufacturer's protocol. The aqueous layer was recovered, mixed with one volume of 70% ethanol and applied directly to an RNeasy Mini Kit column (74104; Qiagen). DNase treatment on the column and total RNA recovery were performed as per the manufacturer's protocol. mRNA quality and presence of contaminating genomic DNA was verified as previously described (20). mRNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Reverse transcription was performed on 2.2 µg total RNA with Transcriptor® reverse transcriptase, random hexamers, dNTPs (04897030001; Roche Diagnostics) and 10 units of RNaseOUT (10777-019; Invitrogen) following the manufacturer's protocol in a total volume of 20 µl. All forward and reverse primers were individually resuspended to 20–100 µM stock solution in Tris-EDTA buffer (11-05-01-05; IDT) and diluted as a primer pair to 1 µM in RNase DNase-free water (11-05-01-04; IDT). Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed in 10 µl in 96 well plates on a CFX-96 thermocycler (BioRad) with 5 µL of 2X iTaq Universal SYBR Green Supermix (172-5120; BioRad), 10 ng (3 µl) cDNA, and 200 nM final (2 µl) primer pair solutions. The following cycling conditions were used: 3 min at 95°C; 50 cycles: 15 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C. Relative expression levels were calculated using the qBASE framework (21) and the housekeeping genes *Tubb5*, *Rpl19* and *Pum1* for rat cDNA. Primer design and validation was evaluated as described elsewhere (20). In every qPCR run, a no-template control was performed for each primer pair and these were consistently negative. All primer

sequences are available in **S2 Table 1**. All primer design and mRNA experiments were carried by the Laboratoire de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke.

Article 2, S2 Table 1. Primer sequences used for qRT-PCR.

Gene of Interest	Sequences
*Pumilio RNA-binding family member 1	F: CCG ACC AGA CCCT CCC TAT CCT
	R: TGC TGA CTC AAT ACA AGT ACA TTG CCT C
*Ribosomal protein L19	F: TGT GGT AAA AAG AAG GTG TGG TTG GA
	R: GGC CAA GGT GTT CTT CCG GC
*Tubulin, beta 5 class I	F: GAC TCC GTT CGC TCA GGT CC
	R: TTC CGC ACC ACA TCC AAG ACA GA
Smooth muscle alpha-actin	F: GGG CTG TTT TCC CAT CCA TCG T
	R: GTG ATG ATG CCG TGT TCT ATC GGA
Smooth muscle myosin heavy chain	F: ACG GGA TGT GGT GCA GAA AGC T
	R: CCC CCT GAC GAT GGG TCT TAT CC
Myocardin	F: AGA ACG ATA CAG CCT CCC AGC T
	R: GGG TCT TTG GGC TTT TTG TGG C
Transgelin/SM22-alpha	F: TTC AAG CAG ATG GAA CAG GTG GC
	R: ACT GCC CAA AGC CAT TAC AGT CC

*, indicates genes used as housekeeping for normalisation. **F** and **R**, indicate forward and reverse primer sequences, respectively.

Atomic Force Microscopy (AFM) Measurements and analysis — Live cell AFM measurements were performed on a custom-made force measurement device, based on the design and operation of an AFM (22). Measurements were made at room temperature with an AFM mounted on an inverted microscope (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) equipped with an AxioCam camera, allowing the precise positioning of the cantilever tip on the cell. All force measurements were made with standard silicon nitride cantilevers with a nominal spring constant of 0.02-0.77 N/m mounted with a cylinder tip (PL2-CONTR-SPL, NANOSENSORS). Prior each experiment, the cantilever was calibrated using thermal noise amplitude analysis (23). Indentation experiments were performed at a constant indentation depth of 1500 nm at a rate of 3.25 $\mu\text{m/s}$. After reaching confluence, cells grown in 6 cm petri dishes were starved and stimulated for 24 hours with 1mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA or PBS as control. For the stiffness measurement, cells were placed under the AFM and the tip was positioned over the cell body using an x-y piezoelectric stage. The basal cell rigidity was calculated from three indentation curves recorded at the perinuclear region for approximately 15 cells per petri dish. For stimulated cell rigidity measurements, the experiment was designed to record three indentation curves at the perinuclear region of three cells per petri dish before and after stimulation with PBS or 200 nM Arginine-Vasopressin (AVP) for five min.

To determine cell rigidity, an experimental contact point between the tip and the cell surface was assigned at an indentation force three times higher than the noise present in the initial region of the force curve. Using multiple possible contact point, starting 50 nm before and after the experimental contact point with increment of 5 nm, the data were fitted iteratively into the Hertz model in order to calculate the Young's modulus (E) using the calibrated spring constant (k) and a Poisson ratio (ν) of 0.5 until the root mean square deviation (RMSD) of the fit was three times greater than the experimental noise. For a cylinder tip, the relation between the applied force F and the indentation depth d is given by $F = 2a E / ((1 - \nu^2)) d$, where a is the radius of the cylinder. d , which represents the indentation depth, and E were calculated from the best fit which contained the most data points and the lowest RMSD variation.

Cell height, was determined from three sets of indentation curves performed on both the petri dish and the apical part of multiple cells beside. This procedure was repeated for

three different regions in multiple petri dishes treated either with PBS, 1mg/ml AGE-HSA or 1 mg/ml CML-HSA. The contact points on these curves were determined using the curve noise as mentioned above. Cell heights were calculated from the difference between the cell contact point and the petri contact point.

Calcium measurements — Fluorescence from Fura-2-loaded cells was monitored as previously described (24). Briefly, A7r5 cells grown on poly-L-Lysine (P4707; Sigma) coated coverslips were starved and stimulated with PBS, 1mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA. Cells were washed twice with HBSS (20mM HEPES, 120mM NaCl, 5.3mM KCl₂, 3mM CaCl₂, 800nM MgSO₄, 5 mM Glucose) and loaded with 2μM Fura-2/AM for 20 min, at room temperature and in the dark. Cells were washed with HBSS and incubated for another 20 min, at room temperature and in the dark to ensure the probe de-esterification. Coverslips were placed in a circular open-bottom chamber and were mounted on the stage of an Olympus microscope (Roper Scientific) controlled by METAFUOR 6.1 digital imaging and photometry system (Universal Imaging). The system allows the simultaneous acquisition of images of custom regions on interest per field of view (10-20 cells). A typical experiment corresponds of 60 s of stabilization in HBSS followed by 60 sec stabilization period where extracellular calcium was removed by changing the media with HBSS prepared without CaCl₂ and containing 0.5 mM EGTA. Cells were then stimulated with 200 nM AVP to measure intracellular calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Upon signal returning to baseline (approximately 180 s), media was changed back to HBSS containing calcium for another 150 sec to measure extracellular calcium entry.

Changes in cytosolic calcium concentration was determined via ratiometric fluorescence measured at 510 nm from 340/380 nm excitations (25). The ratio of fluorescence intensity was calculated from individual images and calibrated in a saturating Calcium⁺ environment as described elsewhere (24, 26-28). All experiments were performed at room temperature and the results are expressed as free intracellular calcium concentrations as a function of time.

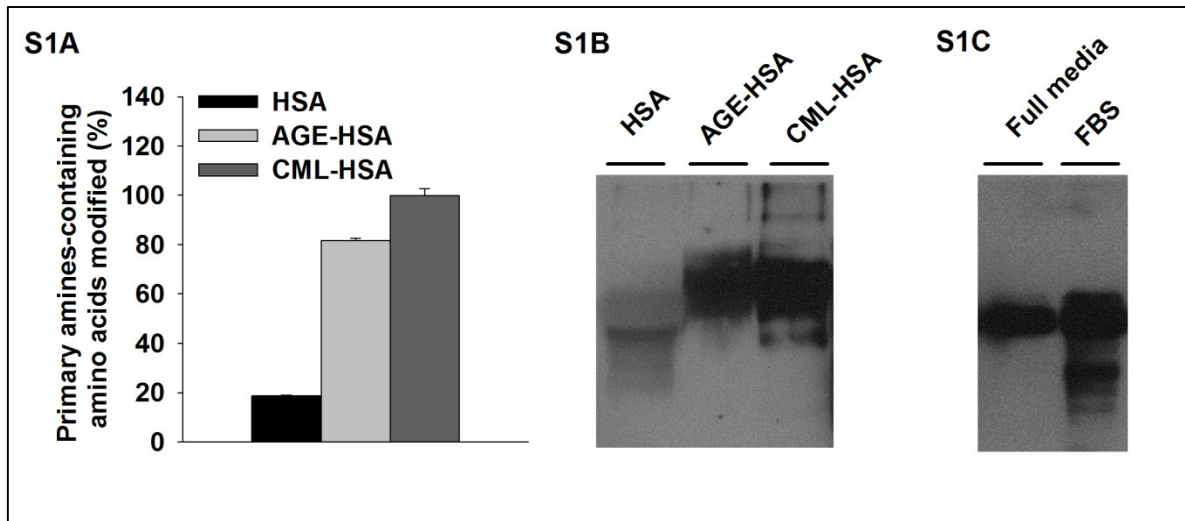
Statistical analysis — Data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM). All statistical analyses were carried using InStat 2.0 (GraphPad). Briefly, data were first tested

for normality using the Shapiro–Wilk test the appropriate parametric or non-parametric tests were carried. For multiple group comparison, analysis of variance (ANOVA) followed by the proper *post hoc* test was applied. See figures legend for more details. Statistical significance was assumed at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Glycation of HSA in vitro.

To assess the degree of *in vitro* glycation of HSA, we measured the extent of modifications of amino acids containing primary amines. **S1 Figure 1A** shows that untreated recombinant HSA has $18.8 \pm 0.1\%$ of primary amines modified, whereas HSA incubated with glucose (AGE-HSA) is more extensively modified to a level as high as $81.6 \pm 0.9\%$. With CML-HSA, we observed more than $99.8 \pm 2.8\%$ of modified primary amines. In order to confirm AGE formation in our preparations, we revealed the presence of CML adducts by using a specific antibody. **S1 Figure 1B** confirms that CML-HSA contains largely the CML adduct, and it was also found in lesser amount in the HSA-AGE preparation as well as in the untreated HSA. These results show that AGE-HSA and CML-HSA are extensively glycated proteins suitable to study RAGE activation *in cellulo*.

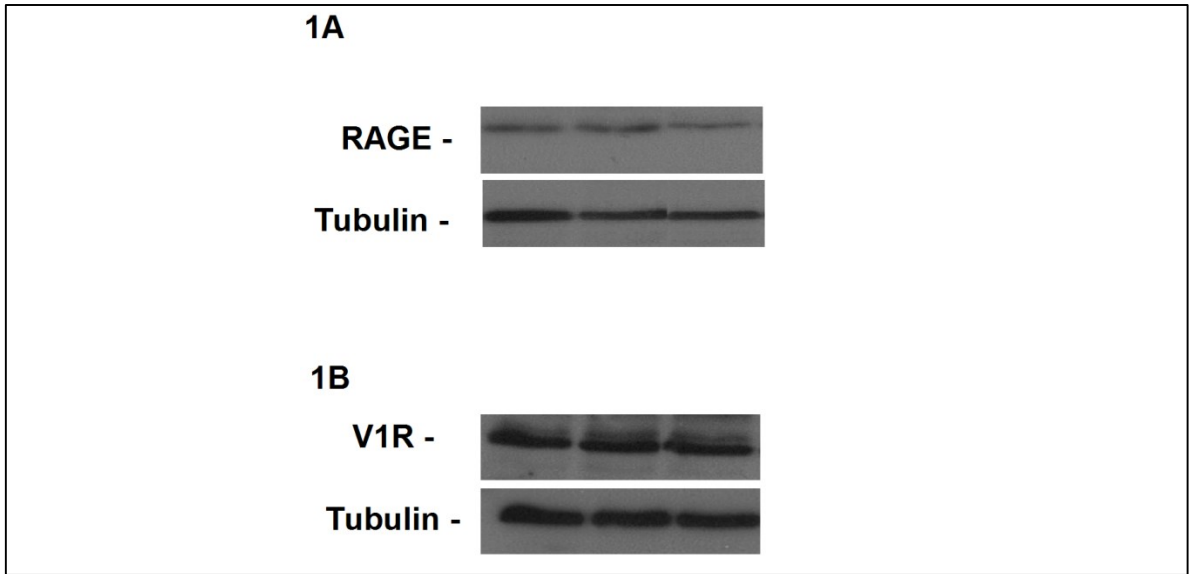


Article 2, S1 Figure 1. *In vitro* glycation of HSA increases CML adducts.

Human recombinant albumin was treated in order to produce AGE-HSA or CML-HSA. **A**, Degree of modification of amino acids containing primary amines using the TNBSA assay. The results show that untreated recombinant HSA has a degree of modification of $18.8 \pm 0.1\%$ whereas HSA incubated with glucose (AGE-HSA) is extensively modified to $81.6 \pm 0.9\%$. Similarly, CML-HSA has more than $99.8 \pm 2.8\%$ of its primary amines modified. **B**, Presence of CML adducts in the different preparations by immunoblotting using a CML specific antibody. Results show that CML-HSA contains the CML adduct, which appears less prevalent in the AGE-HSA preparation and in the untreated HSA. **C**, A7r5 cell culture media containing AGE as revealed by immunoblotting for CML adduct. These results confirm that glycation occurred *in vitro* and reveal that untreated HSA carries a certain degree of modification forbidding its use as an experimental control. Thus, PBS was used as a negative control in our study.

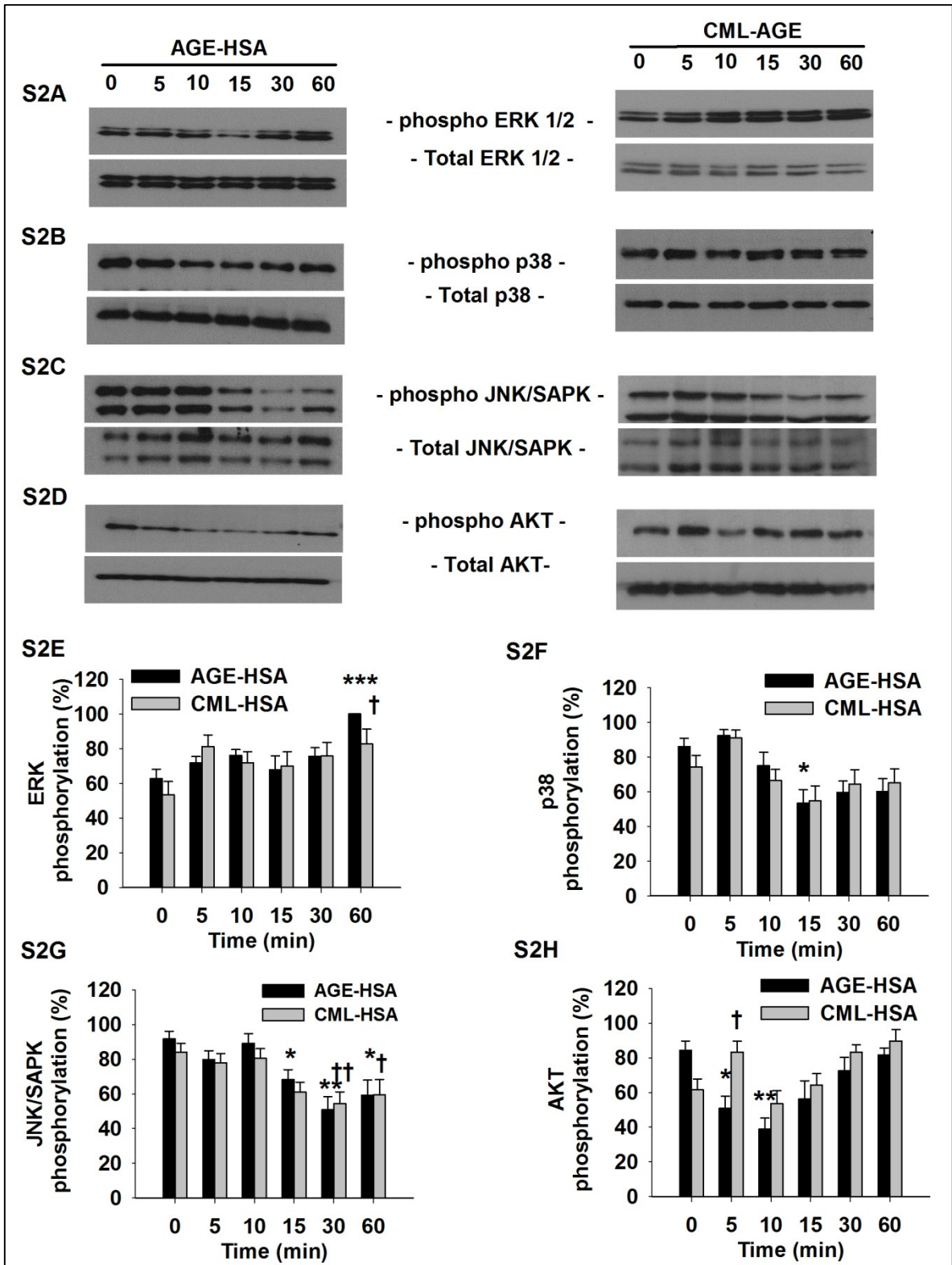
A7r5 cells as a model to study RAGE activation in VSMC.

In order to establish that rat aortic VSMC (A7r5) are a suitable model for studying the impact of RAGE signaling on smooth muscle cells functional phenotype, we first confirmed the expression of RAGE in this cell line (**Fig. 1A**). Since, RAGE can activate multiple signaling pathways including the PI3K/AKT kinases and the proteins member of the mitogen activated protein kinase (MAPK) family: ERK1/2, JNK and p38 (7); in order to confirm RAGE functionality in this cell model, we measured the RAGE-dependent signaling of these pathways in A7r5 cells stimulated by AGE-HSA and CML-HSA. **S3 Figure 2** shows that both AGE modulates MAPK ERK 1/2, p38 and JNK as well as AKT supporting that RAGE is functional in A7r5 cells through its coupling to downstream signalling pathways. Finally, G-protein-coupled receptors (GPCRs), such as the Vasopressin type 1 receptor (V1R) are coupled to Gαq/11 G-proteins and signals primarily through the downstream effectors phospholipase C and protein kinase C (29), to regulate cellular contraction and vascular tone. In order to use V1R activation as a functional contractile assay to determine the phenotype status of VSMC, its expression was also confirmed in the A7r5 model (**Fig. 1B**). Therefore, we confirmed that the A7r5 cell line as a suitable model to study the effect of RAGE activation on the contractile phenotype and function of VSMC.



Article 2, Figure 1. Expression levels of RAGE and V1R in A7r5 cells.

Immunoblots showing the expression of (A) RAGE and (B) V1R in A7r5. Tubulin was used as loading control.

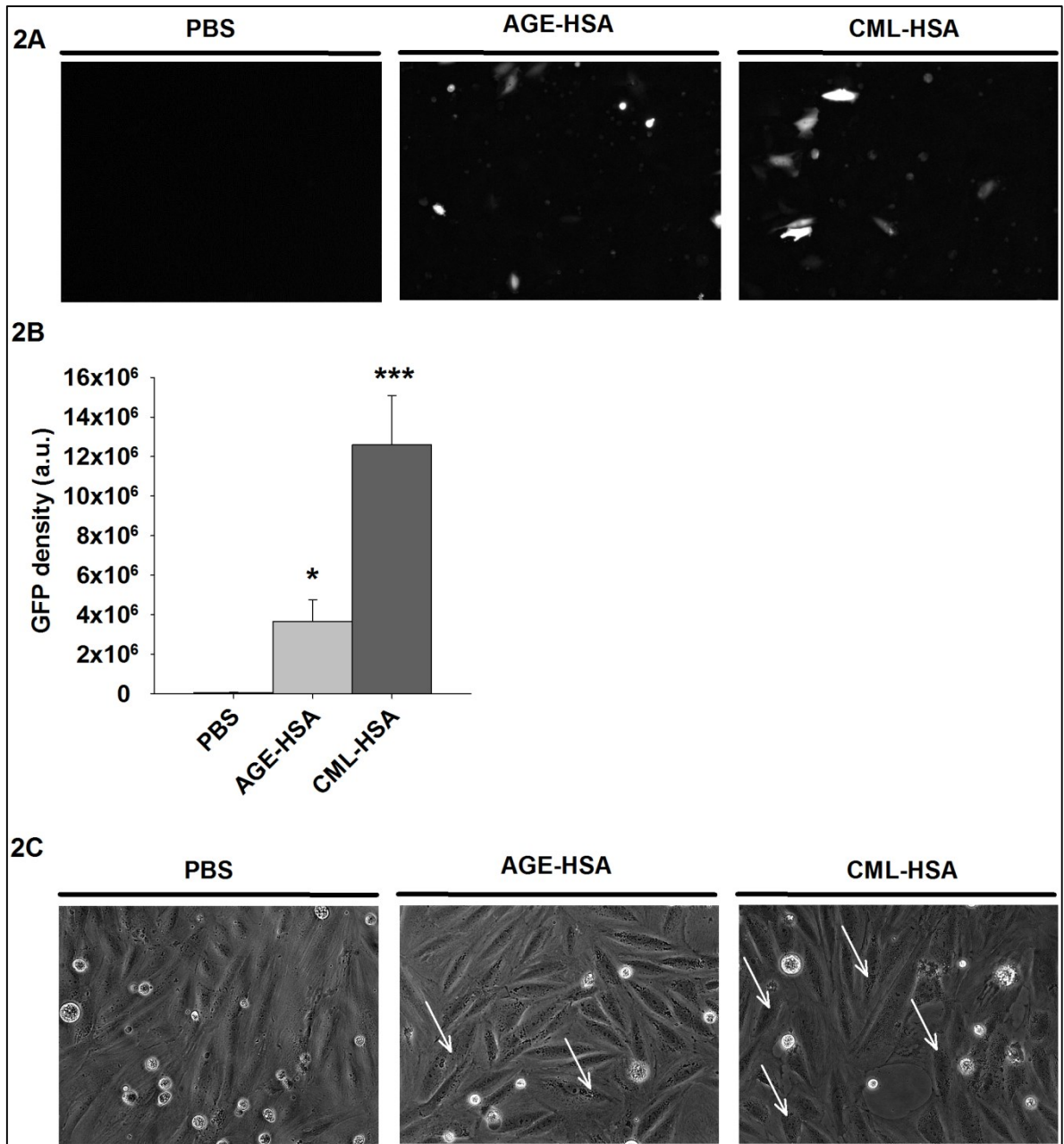


Article 2, S3 Figure 2. RAGE activation affects MAPKs and AKT signaling.

A, Immunoblots showing phosphorylated and total (**A**) ERK 1/2, (**B**) p38, (**C**) JNK/SAPK or (**D**) AKT proteins levels in A7r5 cells stimulated with (**Left panels**) 1mg/ml AGE-HSA or (**Right panels**) 1mg/ml CML-HSA at indicated times. Semi-quantitative analysis of (**E**) ERK, (**F**) p38, (**G**) JNK/SAPK or (**H**) AKT activation in A7r5 cells stimulated for indicated times with 1mg/ml AGE-HSA or 1 mg/ml CML-HSA (n=9). Data were normalized based on corresponding total unphosphorylated protein then expressed in % relative to maximum phosphorylation value. * $p < 0.05$ compared with AGE-HSA and † < 0.05 compared with CML-HSA controls (0 min) using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test. Results shows that both RAGE ligands increase ERK activity (**A** and **E**) over 60 min of stimulation (AGE-HSA: 100±0% and CML-HSA: 82.6±8.6%) compared to basal phosphorylation (AGE-HSA: 62.7±5.4% and CML-HSA: 53.3±7.8%), whereas p38 activity (**B** and **F**) was not significantly affected by the CML-HSA treatment. However, cells treated with AGE-HSA for 15 min (54.4±7.9%) showed a signal lower than basal p38 activity (86.1±4.7%). As for JNK phosphorylation (**C** and **G**), both RAGE ligands decreased JNK signaling in A7r5. Indeed, when compared to basal JNK activity (91.7±4.5%), AGE-HSA decreased JNK phosphorylation after 15 min of stimulation (68.3±5.7%) and remained lower at 30 and 60 min (50.8±7.6% and 59.2±8.8%, respectively). In the case of CML-HSA, when compared to unstimulated controls (84.0±5.1), a significant reduction in JNK activity was also observed at 30 min (54.4±6.8%) and was maintained over 60 min of stimulation (59.6±8.8%).

RAGE-dependent NF-κB activity in VSMC.

Several lines of evidence showed that NF-κB signaling in VSMC is detrimental to the expression of their contractile phenotype. However, little is known on the NF-κB activity dependent of RAGE signaling on the contractile phenotype and function of VSMC. Hence, to determine if VSMC are sensitive to NF-κB-mediated RAGE signaling, we first quantified NF-κB activity by measuring the GFP signal in A7r5 cells stimulated with AGE-HSA, CML-HSA or PBS and transfected with a GFP-based gene reporter plasmid for NF-κB. **Fig. 2B** and **2C** show that A7r5 cells treated with AGE-HSA or CML-HSA exhibit elevated NF-κB activities ($3,6 \pm 1,1 \times 10^6$ and $12,6 \pm 2,5 \times 10^6$ a.u., respectively) when compared to PBS treated cells ($0,5 \pm 0,4 \times 10^6$ a.u.) as revealed by the increased GFP expression. These results validate that RAGE activation in VSMC is associated with increased NF-κB activity. We then determined whether AGE-HSA, CML-HSA or PBS stimulations resulted in morphological changes in the A7r5 cell line. **Fig. 2A** shows that A7r5 cells stimulated with either AGE-HSA (central panel) or CML-HSA (right panel) do not significantly differ in morphology compared to cells treated with PBS (left panel). However, increased granularity that could be associated with cellular stress and P-bodies formation (30) has been observed in A7r5 cells treated with AGE-containing HSA (white arrows, central and right panel) suggesting that VSMC are sensitive to RAGE activation.



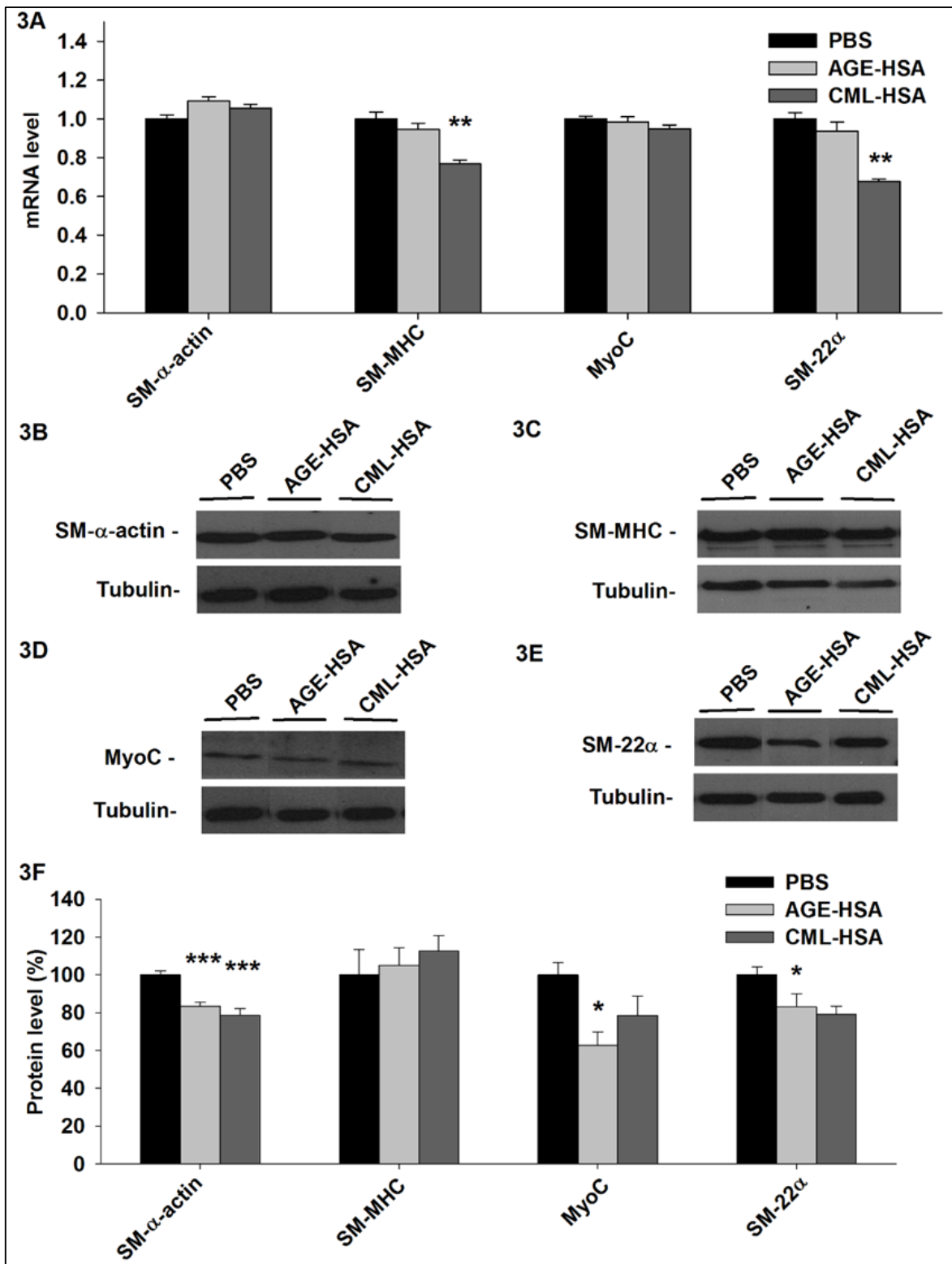
Article 2, Figure 2. RAGE stimulation increases NF-κB activity.

A, Representative phase contrast micrographs (20X) showing the morphological effect of stimulations with PBS, 1mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA in A7r5 cells for 24 hours (n=6). **B**, Representative epifluorescence micrographs (20X) and **(C)** Histogram of average GFP fluorescence intensities showing NF-κB dependent GFP expression in A7r5 cells stimulated for 24 hours with PBS, 1mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA. Each bar represents 10-12 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with PBS using one-way ANOVA followed by Dunn post-test.

Modification of the transcriptome and proteins expression by RAGE activation.

To examine the potential impact of RAGE signaling on the contractile phenotype of VSMC, we measured changes in the mRNA level of key genes involved in the cell contraction machinery (SM- α -actin and SM-MHC), or responsible for maintaining and regulating the cell contractile phenotype (MyoC and SM-22 α) in A7r5 cells stimulated with AGE-HSA, CML-HSA or PBS. **Fig. 3A** shows that significant changes in mRNA are observed only in cells treated with CML-HSA. More precisely, the SM-MHC mRNA level was reduced (0.884 ± 0.023) when compared to cells treated with PBS (1.152 ± 0.041). Similarly, SM-22 α mRNA levels were also found to be lower (0.795 ± 0.016) in cells treated with CML-HSA, when compared to control (1.174 ± 0.037).

To identify the impact of the changes observed in the transcriptome of VSMC stimulated with AGE, we also measured changes in the protein levels of SM- α -actin, SM-MHC, MyoC and SM-22 α . **Fig. 3B** and **F** show that both AGE-HSA ($77.6\pm 2.0\%$) and CML-HSA ($73.3\pm 3.1\%$) treatments led to a reduction of SM- α -actin levels when compared to PBS ($93.2\pm 2.0\%$). On the other hand, SM-MHC levels (**Fig. 3C** and **3F**) were not affected by both RAGE ligands. Only AGE-HSA ($50.4\pm 5.8\%$) significantly reduced MyoC levels (**Fig. 3D** and **3F**) even if a similar tendency could be observed with CML-HSA ($63.0\pm 8.3\%$) when compared to PBS ($80.3\pm 5.2\%$), and only the CML-HSA treatment induced a significant reduction in the SM-22 α protein levels ($66.6\pm 3.6\%$) when compared to PBS ($84.2\pm 3.6\%$). Finally, AGE-HSA ($70.0\pm 5.8\%$) seemed to have a similar effect (**Fig. 3E** and **3F**). These results support that RAGE signaling, in the VSMC, modulates the transcriptome and the proteins expression usually associated with its contractile phenotype.

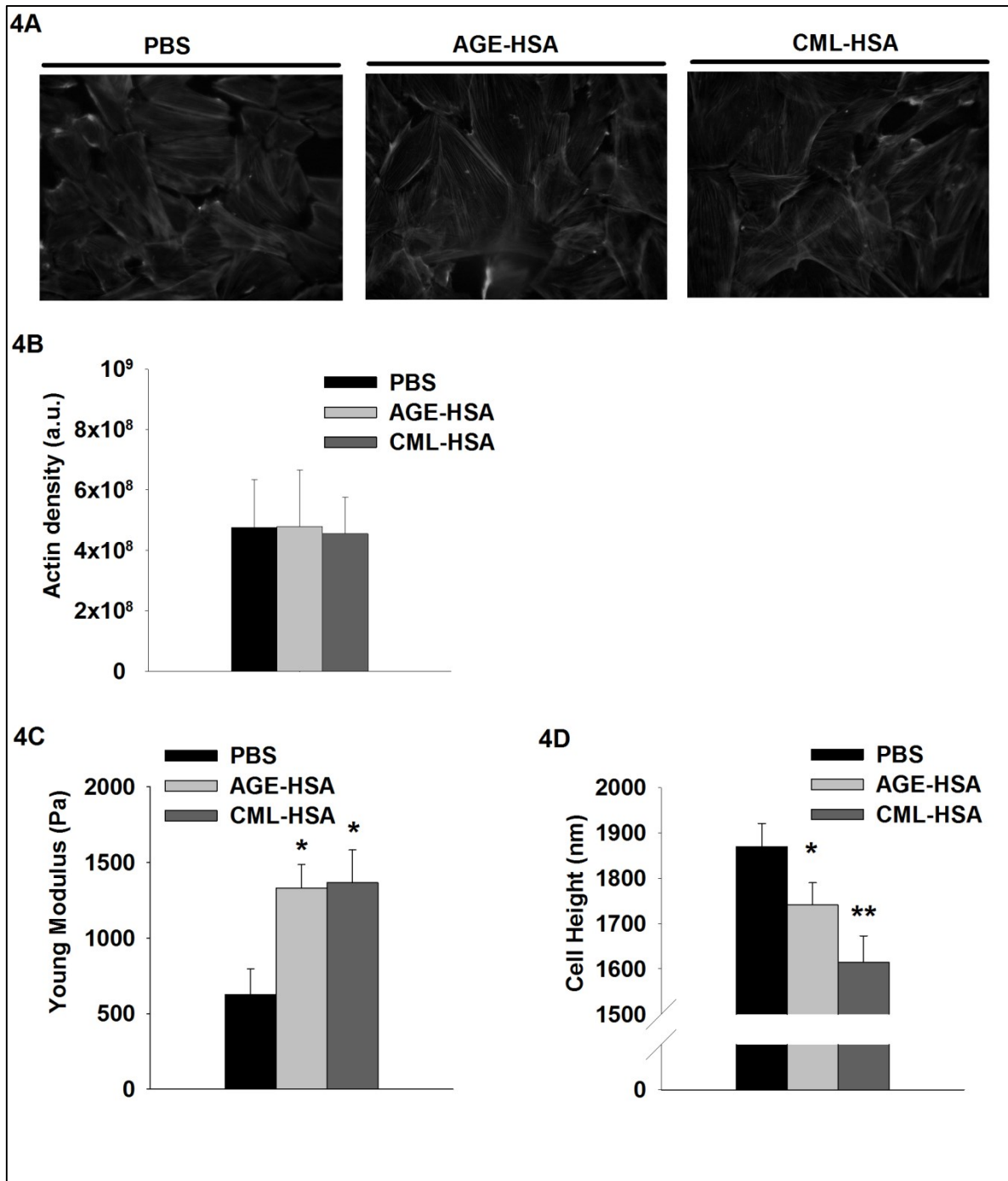


Article 2, Figure 3. RAGE stimulation affects mRNA and protein levels of different key proteins involved in VSMC phenotype.

A, Histogram of mRNA levels of SM- α -actin, SM-MHC, MyoC and SM-22 α measured by qPCR, immunoblots showing **(B)** SM- α -actin, **(C)** SM-MHC, **(D)** MyoC and **(E)** SM-22 α proteins levels and **(F)** Semi-quantitative analysis of indicated proteins levels in A7r5 cells stimulated 24hours with 1mg/ml AGE-HSA or 1 mg/ml CML-HSA. Each bar represents 10-12 independent experiments. For mRNA, data were normalized based on the mRNA levels of 3 housekeeping genes then expressed relative to PBS. As for protein levels, data were normalized based on corresponding tubulin loading control then expressed in % relative to PBS. * $p < 0.05$ compared with PBS using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test.

RAGE-dependent modulation of the VSMC mechanical properties.

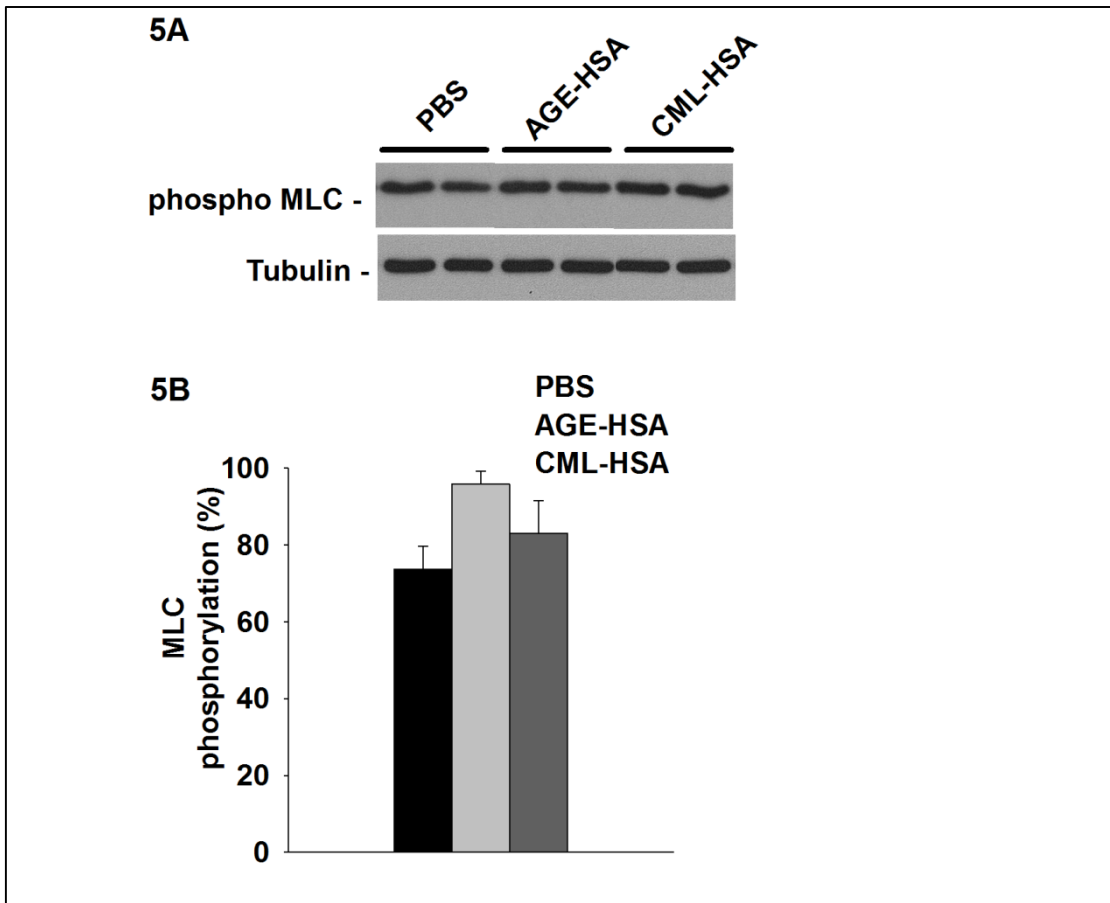
Mechanical characteristics such as cytoskeletal organization, cell rigidity and the ability of the cell to contract are of relevance when studying VSMC functionality which in turns depends on the expression of its contractile phenotype. To investigate the potential impact of RAGE stimulation on the contractile function of VSMC, we first determined the effect of AGE-HSA and CML-HSA stimulations of A7r5 cells on their actin structure and the overall stiffness of the cell body. Indeed, previous reports from our laboratory and from others showed that the activity of the contractile machinery can be measured through time-resolved changes in cell rigidity (31, 32). Results show that neither AGE-HSA nor CML-HSA affected the general structure (**Fig. 4A**) or the density of the actin cytoskeleton (**Fig. 4B**). However, **Fig. 4C** shows a dramatic increase in the basal cell rigidity from 623 ± 171 Pa for PBS to 1328 ± 157 Pa for AGE-HSA and 1366 ± 215 Pa for CML-HSA. Therefore, cells stimulated with AGE-HSA or CML-HSA offer more resistance to deformation when compared to their PBS counterpart suggesting increased intracellular tension associated with cell contraction. Interestingly, we measured a reduced cell height with respect to the substrate (**Fig. 4D**) which could be consistent with a possible increase in intracellular tension. Indeed, compared to cells treated with PBS exhibiting a nominal height of 1869 ± 51 nm, cells treated with either AGE-HSA or CML-HSA, showed a significantly reduced height (1614 ± 58 nm and 1740 ± 49 nm, respectively).



Article 2, Figure 4. RAGE stimulation changes cell mechanical properties and increases cell rigidity.

A, Representative epifluorescence micrographs (40X) of Phalloid/TexasRED stained cells showing actin organization, **(B)** histogram of average TexasRED fluorescence corresponding to actin density, **(C)** histogram showing cell rigidity (Young Modulus) and **(D)** cell heights measured by AFM of A7r5 cells stimulated for 24 hours with PBS, 1mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA. Each bar represents 12-15 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with PBS using one-way ANOVA followed by Dunn post-test.

VSMC contraction is mainly governed by actin-myosin-mediated motor activity. Acto-myosin motor activity is regulated by the phosphorylation of its light chain (MLC) (33) which is either catalyzed by Myosin Light Chain Kinase (MLCK) or by Rho-activated Kinase. Therefore, as part of investigating the potential impact of RAGE stimulation on the contractile function of VSMC, we assessed the impact of AGE-HSA and CML-HSA stimulation on the basal activity of myosin by measuring phosphorylated MLC levels. Overall, even if a tendency for an increased basal activity of myosin could be observed for both AGE, these experiments (**Fig. 5A** and **5B**) revealed no significant differences between PBS ($73.7 \pm 5.9\%$), AGE-HSA ($95.8 \pm 3.4\%$) or CML-HSA ($83.1 \pm 8.4\%$). Altogether, these results indicate that RAGE activation modulates VSMC mechanical properties.

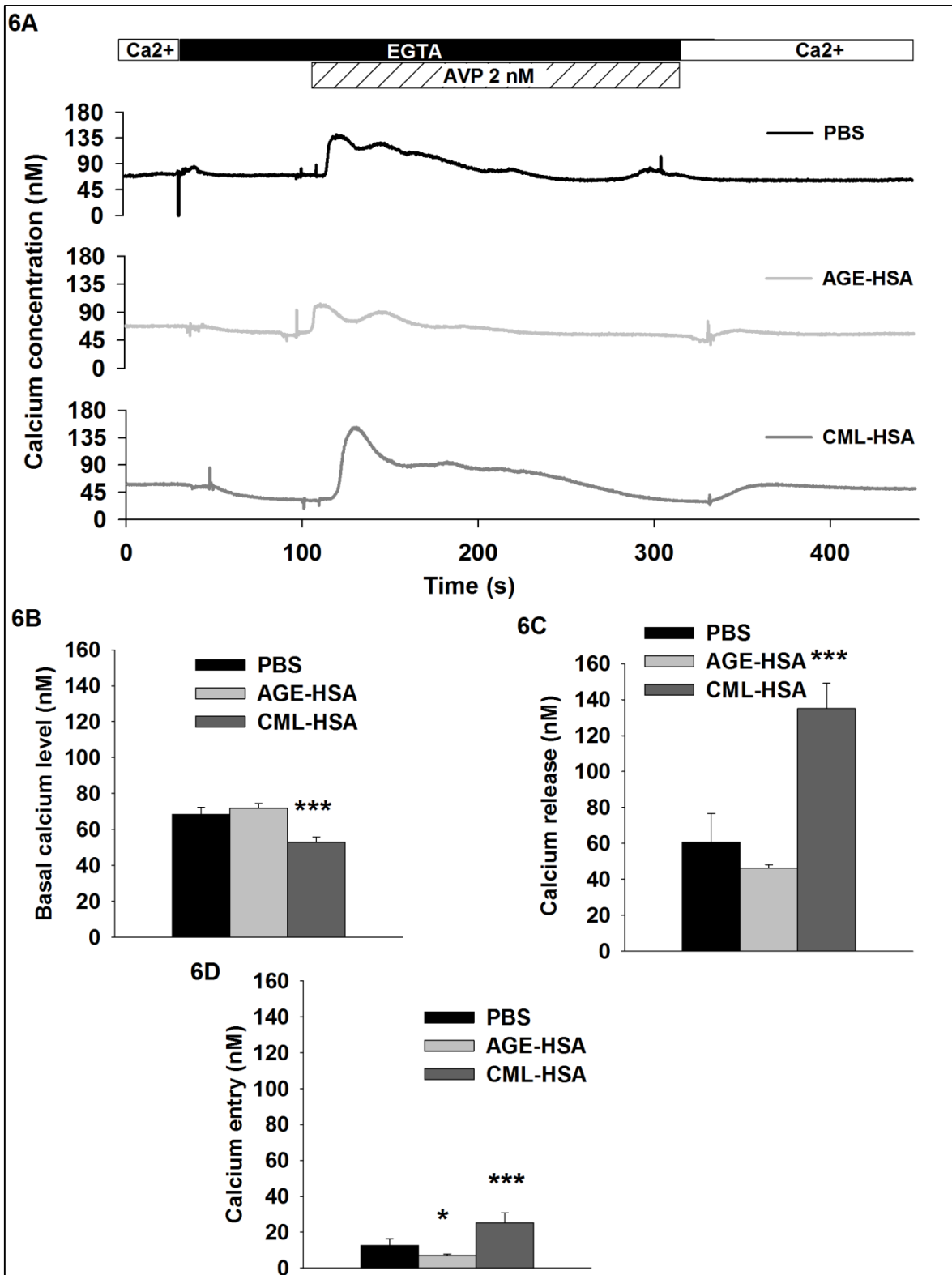


Article 2, Figure 5. RAGE activation does not affect significantly basal myosin phosphorylation.

A, immunoblots showing phosphorylated levels of MLC and **(B)** semi-quantitative analysis of pMLC activity in A7r5 cells stimulated 24hours with 1mg/ml AGE-HSA or 1 mg/ml CML-HSA. Each bar represents 9-12 independent experiments. Data were normalized based on corresponding tubulin loading control then expressed in % relative to maximum phosphorylation value.

Regulation of calcium homeostasis and signaling by RAGE activation.

In order to test the effect of RAGE signaling on the signaling capacity VSMC associated with cell contraction, we measured V1R-dependent calcium response in A7r5 cells pretreated with AGE-HSA, CML-HSA or PBS and stimulated with AVP. The activation V1aR leads to $G\alpha_q/11$ -dependent intracellular calcium mobilization responsible for the activation of the CAMK/MLCK pathway and the concomitant contraction in of VSMC (34, 35). **Fig. 6A** and **6B** show that, in absence of extracellular calcium, we found that CML-HSA pretreatment affected basal calcium levels ($52.9\pm 2.8\text{nM}$) when compared to PBS ($68.2\pm 3.9\text{nM}$). Moreover, **Fig. 6A** and **6C** show that AVP-induced calcium released from the sarcoplasmic reticulum, was also increased by CML-HSA pretreatment ($135\pm 14\text{nM}$) when compared to PBS ($60.6\pm 15.9\text{nM}$). Remarkably, whereas calcium entry (**Fig. 6A** and **6D**) was reduced in cells pretreated with AGE-HSA ($7.0\pm 0.8\text{nM}$), it was increased in cells pretreated with CML-HSA ($25.2\pm 5.4\text{nM}$) when compared to control ($12.6\pm 3.8\text{nM}$). These results demonstrate that sustained AGE signaling in VSMC affects the cellular calcium homeostasis and agonist-induced calcium response.



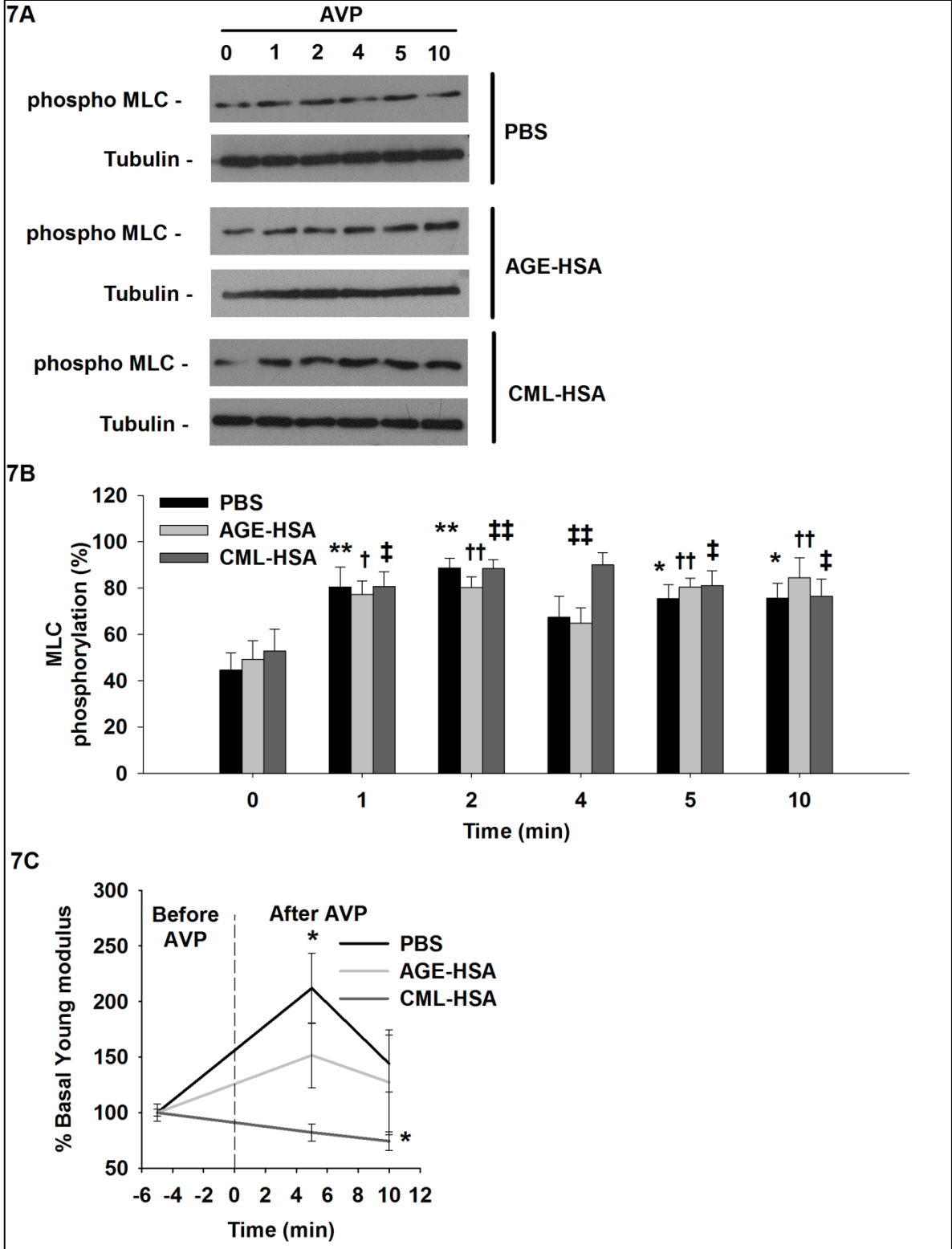
Article 2, Figure 6. RAGE activation increases V1R/Gq-dependent calcium signaling.

A, Typical calcium measurement kinetics obtained with FURA-2 and histograms showing **(B)** basal calcium levels, **(C)** Gq-dependent calcium release and **(D)** calcium entry in A7r5 cells stimulated for 24 hours with PBS, 1mg/ml AGE-HSA or 1mg/ml CML-HSA and challenged with 2 nM AVP. Each bar represents 9-12 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with PBS using one-way ANOVA followed by Dunnett post-test.

Alteration of VSMC contractile activity by AGE-dependent RAGE signaling.

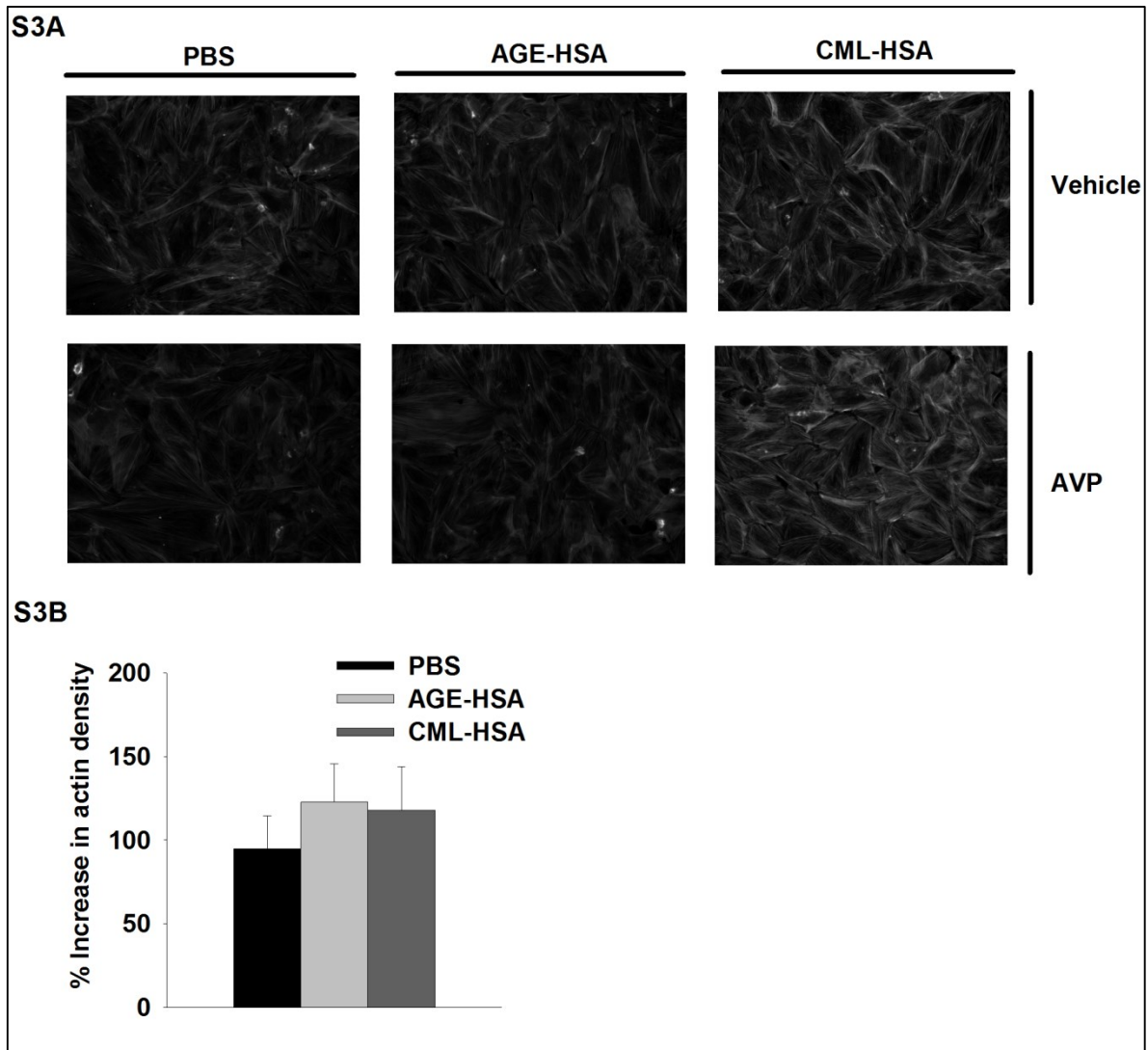
As presented above, MLC phosphorylation can be associated with cell contractile activity. To determine the impact of RAGE activation on this biomarker of cell contraction in VSMC, we monitored changes in MLC phosphorylation levels in A7r5 cells pretreated with AGE-HSA, CML-HSA or PBS, and stimulated with AVP. As expected, cellular MLC activity was increased in all conditions after AVP stimulation (**Fig. 7A** and **7B**). The overall MLC activity was found to be similar in between the different conditions, but still slightly higher in cell treated with CML-HSA. Indeed, phosphorylated MLC levels ($90.0 \pm 5.2\%$) were significantly higher after 4 min of stimulation with AVP compared to AGE-HSA ($64.7 \pm 6.7\%$) or PBS (67.3 ± 9.0) pretreated cells.

Knowing that cell contractile activity can be positively correlated with either rearrangements in the cell morphology and the cytoskeletal structure, or variations in cell rigidity; we followed both the evolution of the actin organization and the Young Modulus of A7r5 cells preconditioned with AGE-HSA, CML-HSA or PBS before and after stimulation with AVP. While, no contraction of the cell body was visually detected under AVP stimulation and for all conditions, as demonstrated by the lack of rearrangement of the actin cytoskeleton (**S4 Figure 3**); only control cells ($211 \pm 31\%$) increased their rigidity (**Fig. 7C**) after AVP stimulation when compared to cells pretreated with AGE-HSA ($151 \pm 29\%$) or CML-HSA ($82.1 \pm 7.8\%$) This important result suggests that RAGE activation interfere with the mechanical competency of VSMC.



Article 2, Figure 7. RAGE stimulation changes myosin phosphorylation dependent on V1R activation.

A, immunoblots showing phosphorylated levels of MLC and **(B)** semi-quantitative analysis of pMLC activity in A7r5 cells stimulated 24 hours with 1mg/ml AGE-HSA or 1 mg/ml CML-HSA. Each bar represents 11-12 independent experiments and tubulin was used as loading control for MLC activity determination. Data were normalized based on corresponding tubulin loading control then expressed in % relative to maximum phosphorylation value. * $p < 0.05$ compared with respective control (0 min) using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. **C**, Graph showing changes in Young modulus as measured by AFM. A7r5 cells stimulated 24 hours with 1mg/ml AGE-HSA, 1mg/ml CML-HSA or PBS, were probed 5 min before stimulation to obtain basal values then same cells were probed 5 min and 10 min after 200nM AVP stimulation. Data are expressed as % changes in cell rigidity compared to respective control (-5 min). Each condition represents 12-15 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with control (-5 min) using one-way ANOVA followed by Dunn post-test.



Article 2, S4 Figure 3. RAGE activation doesn't affect significantly AVP-induced cytoskeletal reorganisation.

A, Representative epifluorescence micrographs (40X) of Phalloidine/TexasRED stained cells showing actin organization. **B**, Histogram of average TexasRED fluorescence corresponding to actin density, in A7r5 cells stimulated 24hours with 1mg/ml AGE-HSA, 1 mg/ml CML-HAS or PBS and challenged with 200 nM AVP. Each bar represents 9 independent experiments.

DICUSSION

Phenotypic modulation of VSMC plays a central role in vascular development and remodeling during diseases. In response to vascular injury, VSMC de-differentiate to a proliferative/synthetic phenotype, which is involved in the various pathological states such as atherosclerosis, neointimal hyperplasia and hypertension (36, 37). To our knowledge, little attention has been given on the functional effect of RAGE activation in VSMC other than the work of Suga *et al.* showing that VSMC, overexpressing RAGE and exposed to AGE, acquire properties that could be assimilated to osteoblast cells therefore contributing to vascular calcification in diabetes (38). The present study is the first one studying the phenotypic and functional effects of endogenous RAGE activation in a model of VSMC. We bring new data on the mechanical properties of those cells subjected or not to RAGE activation. We tested the effects of two ligands, AGE-HSA and CML-HSA, on many levels of VSMC cellular responses in order to propose a stronger model to study RAGE activation.

It is common, when studying RAGE signaling, to obtain ligands from incubation of albumin with glucose at temperatures above 37⁰C for durations of up to eight weeks (39). A variety of AGE structures having different affinities for the RAGE receptor can be obtained from such preparations making each of those a unique mixture of AGE (39). Such variations in AGE preparation and perhaps the degree of CML modifications, may explain discrepancies observed both in the the doses and effects reported in previous studies. CML protein adducts is a major immunological epitope in proteins, such as albumin, subjected to the Maillard reaction (40) and accumulation of CML-modified proteins *in vivo* has been reported in several human and animal tissues in normal and pathological conditions (41). Here, we suggest that CML-HSA may represent a better ligand in order to study RAGE activation; consequently, we evaluated the effects of both AGE-HSA and CML-HSA on cell signaling, transcription factor activation, mRNA and protein expression, and functional cellular responses such as cell contraction. As expected, our results showed more consistency and stronger effects with CML-HSA stimulations, supporting that CML-HSA represent a more suitable choice in order to study RAGE activation. Moreover, the various potencies in the effects observed are likely caused by the difference in the concentration of CML adducts found in between the mixed AGE-HSA and pure CML-HSA preparations. In a little number of experiments, AGE-HSA showed opposing results to CML-HSA, which may be explained

by considering that different levels of NF- κ B activation can affect the cellular activity in different and possibly in opposing ways. Indeed, while high NF- κ B activity may promote apoptosis, lower levels participate in the transcription of genes that favor cell survival (42). Thus, we believe that the ability of both ligands to activate ERK 1/2, AKT and induce NF- κ B activation in largely different degrees, could explain the discrepancies observed on VSMC differentiation and functionality.

VSMC differentiation is dependent on the expression of appropriate levels of smooth muscle contractile genes, whereas proliferating VSMC show reduced expression levels of these genes. Proteins such as SM- α -actin, SM-MHC and SM-22 α are established markers of functional smooth muscle cells contractile phenotype, which is finely regulated by a wide range of physiological cues (37). The premise of our study is that RAGE activation contributes to vascular diseases, by altering the VSMC contractile phenotype. A7r5 cells are derived from foetal rat thoracic and abdominal aortas and have been used extensively as model for the study of VSMC phenotype (43-45). These cells are capable of generating action potentials that can travel from cell to cell through low resistance junctions and synthesize muscle type creatine phosphokinase both markers of a differentiated and functional SMC (46). In our study, we confirmed the validity of this VSMC model by showing that A7r5 cells express extensive levels of SM- α -actin and SM-MHC mRNAs and proteins. We also showed that A7r5 cells transcript and translate important levels of MyoC: a protein involved in the control of smooth muscle cells contractile phenotype (47), and SM-22 α : a marker of smooth muscle cells contractile phenotype and regulator of cell contraction (48). But more importantly, using a single cell-based mechanical assay, we demonstrated that A7r5 cells are mechanically competent and capable of contraction as observed with the increased rigidity induced by AVP.

It is known that RAGE activation leads to increased MAPKs, PI3K/AKT and JAK/STAT activities which are involved in NF- κ B transcription factor activation. MAPK ERK 1/2 signaling in VSMC has been extensively studied and has been associated with increased cell proliferation, DNA synthesis and agonist-induced cell migration *in vitro* and *in vivo* (49). MAPKs JNK and p38 are stressed activated kinases involved in adaptation to stress such as inflammation, cell differentiation and apoptosis (50) whereas PI3K/AKT pathway plays a key role in multiple cellular processes such as glucose metabolism,

apoptosis, cell proliferation, transcription and cell migration (51). Here, we confirmed that A7r5 cells are a valid VSMC model to study RAGE activation by showing that A7r5 cells express endogenous levels of RAGE and when exposed to AGE, they have their ERK 1/2, JNK p38, PI3K/AKT and NF- κ B activities modulated.

Previous reports involving other receptors showed that NF- κ B signaling interfered with the expression of the VSMC contractile phenotype (15). Our results show that RAGE activation increased NF- κ B activation in VSMC; which correlated with decreased biochemical markers of VSMC contractile phenotype. Indeed SM- α -actin, MyoC and SM-22 α levels were reduced in AGE-HSA and CML-HSA stimulated cells. We believe that this is the result of MyoC degradation as reported by other groups (52) since mRNA levels were not affected by RAGE stimulation. However, the link between the lack of changes in mRNA levels and reduced protein expression of SM- α -actin is unclear and remains to be further investigated. On the other hand, the increase in MyoC degradation clearly affected SM-22 α gene and protein expression in cells stimulated with both AGE. These results support our hypothesis that RAGE activation in VSMC interferes with their contractile phenotype by altering the expression of proteins involved in regulation of cell contraction.

Interestingly, RAGE activation had no effect on the actin organization and density, nor had any significant effect on the activity of myosin in VSMC. However, the mechanical properties of A7r5 cells, such as cell rigidity and height were affected by AGE-dependent RAGE signaling. Cell rigidity is an important phenotypic characteristic of a mechanically competent cell, since it influences the cell's ability to contract, migrate and proliferate (53). It has been reported that undifferentiated cells (54) and invasive cancer cells (55) are often softer which seem to facilitate their migration process. On the other hand, increased cell rigidity was reported in aging cells (56) and many progressive diseases such as hypertension, renal failure, cataracts, Alzheimer and complications associated with diabetes (57, 58). Here, we show for the first time that RAGE activation increases cell rigidity in a model of VSMC which correlates with a lower cell height and the tendency observed in the increased basal phosphorylation of MLC; suggesting increased cellular tension and adhesion. Previous work has shown that VSMC respond to mechanical forces in their environment, such as stretch applied to their extracellular matrix, by adapting the expression of genes and phenotype (59). Therefore, it is proposed that increased rigidity induced by RAGE activation in VSMC is

responsible *in vivo* for changes in the phenotype of VSMC by altering these cells ability to respond to stretch forces. In line with the results presented in our study, an increase in stiffness of the extracellular matrix of blood vessels has been previously associated with reduced vessel compliance to stretch forces originating from blood flow and the promotion of a hypertensive state (60). Therefore, increased stiffness of VSMC induced by RAGE activation could contribute in a similar way to the development of hypertension and vascular diseases in diabetics.

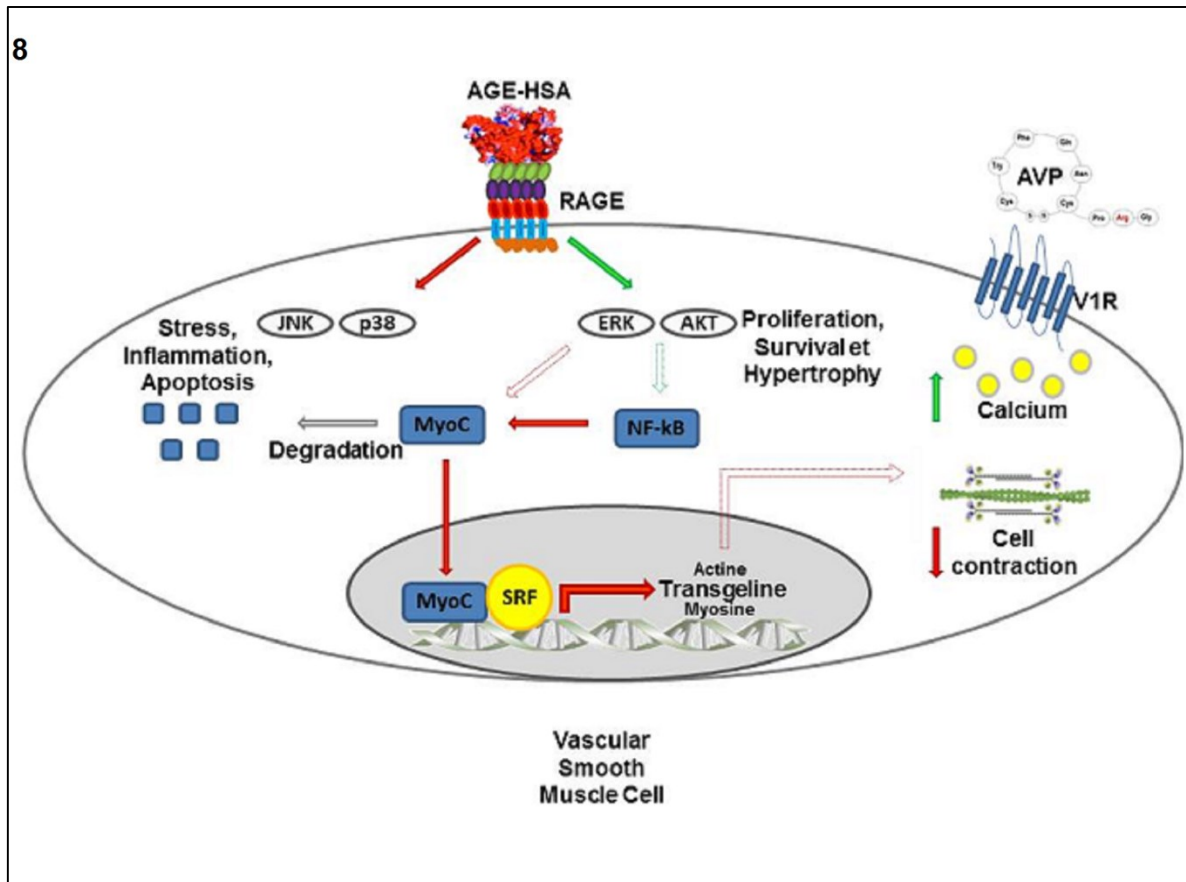
RAGE activation in VSMC, by altering the cell phenotype, ultimately interferes with their primary contractile function. Our results show that not only biomarkers of cell contraction such as MLC phosphorylation had their kinetic altered and overall level increased, but second messengers, such as calcium, were released in greater amount as well. Interestingly, it is well established that calcium signaling acts a regulator of gene expression in cells. In fact, it was recently shown that altered calcium entry in VSMC can promote the expression of an early-response c-fos gene and activated ERK 1/2. Those events potentially lead to VSMC growth and proliferation (61). Therefore, it is plausible that increased calcium entry, induced by RAGE activation in VSMC, leads to phenotypic alterations of VSMC *in vivo* and to a concomitant modulation of their ability to respond to contractile hormones. In this context, our results strongly suggest that RAGE activation participates in hypertensive state in diabetes by also amplifying VSMC responses to vasopressive hormones such as AVP.

A7r5 cell contraction has been previously reported indirectly using ultrasensitive microscopy and sophisticated image analysis methods pointing toward minimal reorganisation of the contractile machinery upon contraction (62) which is confirmed by our results showing no detectable changes to actin structures or density during RAGE activation or concomitant AVP stimulations. We previously reported that strong correlations exist between agonist-induced cell contraction and increase in cell rigidity, as measured by AFM (31). Here, we observe that despite increased calcium signaling and MLC phosphorylation in VSMC exposed to AGE ligands and stimulated with AVP; the VSMC contractile ability is impaired. Indeed, the cell rigidity of VSMC measured before and after the AVP stimulation did not increase in A7r5 cells pretreated with AGE ligands. We previously demonstrated that a correlation does not always exist between MLC phosphorylation levels and cell contractile response; such a discrepancy would usually reveal disturbances in the tightly

regulated pathways involved in cell contraction (63). Thus, the disturbances provoked by the decreased expression of contractile phenotype-associated proteins and regulators such as SM- α -actin, MyoC and SM-22 α in VSMC could lead to an uncoupling between the signaling normally associated with cell contraction (i.e. increased calcium and MLC phosphorylation) and the mechanical contraction *per se*. Altogether, our results support the hypothesis that RAGE activation in VSMC interferes with the functions associated to their contractile phenotype.

CONCLUSION

The activation of RAGE participates in numerous pathophysiological conditions such as Alzheimer's disease, arthritis, many pulmonary diseases (acute lung injury, acute respiratory syndrome and asthma), sepsis and atherosclerosis (64). Since, it has been shown that diabetes is an important risk factor for developing cardiovascular diseases such as atherosclerosis, coronary disease and cardiomyopathy (65) and that diabetics have higher AGE levels (66, 67), it has been proposed that a link may exist between RAGE and the increased vascular diseases in diabetics (68-71). Indeed, it was shown in diabetes that AGE contribute to impaired endothelial function and change vessel wall properties by promoting basement membrane thickening, increased vascular permeability, the pro-thrombotic state, which, altogether, results in damage to retina, nephron, peripheral and central nervous systems and atherosclerosis (65). Here, we provide further evidences summarised and illustrated in **Fig. 8**, and conclude, in line with previous findings, that RAGE activation in VSMC is also likely to be a keystone component in the development of vascular diseases associated to diabetes by interfering with the contractile phenotype of VSMC through the modification of their mechanical and functional properties.



Article 2, Figure 8. RAGE activation in VSMC interferes with their contractile phenotype and function.

RAGE is expressed in VSMC A7r5 and fully functional. Its activation, using short term stimulation with AGE-HSA or CML-HSA, lead to increased ERK 1/2 and AKT signaling, whereas p38 and JNK/SAPK activities are reduced. Long term exposure to AGE increases NF-κB activity affecting the protein levels of the contraction-related transcription factor MyoC and the mRNA and protein levels of SM-22α, a regulator of VSMC contraction. Finally, RAGE activation increases overall cell rigidity possibly caused by changes in myosin activity. Interestingly, although RAGE stimulation amplifies calcium signaling and myosin activity in VSMC challenged with AVP, those cells lose their contractile capacity while measured by AFM.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Ulrike Froehlich for her technical assistance and Mathieu Durand from the Laboratoire de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke for its assistance in the mRNA design and experiments. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (90463874) and Chaire de Recherche Canadienne en Nanopharmacologie et Microscopie à Force Atomique. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A "glycoxidation-centric" point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013 Oct;23(10):913-9.
2. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia*. 2001 Feb;44(2):129-46.
3. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM, Sacks DB. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2004 Jul;27(7):1761-73.
4. Bailey AJ, Sims TJ, Avery NC, Halligan EP. Non-enzymic glycation of fibrous collagen: Reaction products of glucose and ribose. *Biochem J*. 1995 Jan 15;305 (Pt 2)(Pt 2):385-90.
5. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):509-14.
6. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):354-60.
7. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006 Aug 8;114(6):597-605.

8. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012 Feb 1;26(3):203-34.
9. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994 Apr 1;269(13):9889-97.
10. Chuong C, Katz J, Pauley KM, Bulosan M, Cha S. RAGE expression and NF-kappaB activation attenuated by extracellular domain of RAGE in human salivary gland cell line. *J Cell Physiol.* 2009 Nov;221(2):430-4.
11. Tang DD, Anfinogenova Y. Physiologic properties and regulation of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2008 Jun;13(2):130-40.
12. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. the angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):415-72.
13. Miyazaki H, Hayashi K, Hasegawa Y. Tensile properties of fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Biorheology.* 2003;40(1-3):207-12.
14. Mack CP. Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1495-505.
15. Xie C, Ritchie RP, Huang H, Zhang J, Chen YE. Smooth muscle cell differentiation in vitro: Models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1485-94.
16. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem.* 1999 Oct 29;274(44):31740-9.

17. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85.
18. Temple A, Yen TY, Gronert S. Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006 Aug;17(8):1172-80.
19. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):671-5.
20. Brosseau J, Lucier J, Lapointe E, Durand M, Gendron D, Gervais-Bird J, Tremblay K, Perreault J, Elela SA. High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA.* 2010 feb;16(2):442-9.
21. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2):R19.
22. Cuerrier CM, Benoit M, Guillemette G, Gobeil F, Jr, Grandbois M. Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* 2009 Apr;457(6):1361-72.
23. Butt H-, Jashke M. Thermal noise in atomic force spectroscopy. *Nanotechnology.* 1995;6:1-7.
24. Boucher J, Simard E, Froehlich U, Grandbois M. Amplification of AngII-dependent cell contraction by glyoxal: Implication of cell mechanical properties and actomyosin activity. *Integr Biol (Camb).* 2014 Feb 7
25. Tsien RY, Rink TJ, Poenie M. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium.* 1985 Apr;6(1-2):145-57.

26. Nguyen N, Biet M, Simard E, Beliveau E, Francoeur N, Guillemette G, Dumaine R, Grandbois M, Boulay G. STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca^{2+} channel activity. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jun;1833(6):1294-303.
27. Bovenzi V, Savard M, Morin J, Cuerrier CM, Grandbois M, Gobeil F, Jr. Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli. *J Cell Physiol*. 2010 Jan;222(1):168-76.
28. Cuerrier CM, Chabot V, Vigneux S, Aimez V, Escher E, Gobeil F, Charette PG, Grandbois M. Surface plasmon resonance monitoring of cell monolayer integrity: Implication of signaling pathways involved in actin-driven morphological remodeling. *Cell Mol Bioeng*. 2008 Dec 1;1(4):229-39.
29. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care*. 2003 Dec;7(6):427-34.
30. Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*. 2007 Mar 9;25(5):635-46.
31. Cuerrier CM, Benoit M, Guillemette G, Jr Gobeil F, Grandbois M. Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2008
32. Hubmayr RD, Shore SA, Fredberg JJ, Planus E, Panettieri RA, Jr, Moller W, Heyder J, Wang N. Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1660-8.
33. Ikebe R, Reardon S, Mitsui T, Ikebe M. Role of the N-terminal region of the regulatory light chain in the dephosphorylation of myosin by myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*. 1999 Oct;274(42):30122-6.

34. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Jan;22(1):32-9.
35. Rasmussen H, Takuwa Y, Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J.* 1987 Sep;1(3):177-85.
36. Olson ES, Dong W. Nonlinearity in intracochlear pressure. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006;68(6):359-64.
37. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):767-801.
38. Suga T, Iso T, Shimizu T, Tanaka T, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Kurabayashi M. Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(8):670-83.
39. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, Hughes TE. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: Biochemical characterization and formation kinetics. *Anal Biochem.* 2004 Jan 1;324(1):68-78.
40. Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, Ueda S, Horiuchi S. N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the maillard reaction. *Biochemistry.* 1996 Jun 18;35(24):8075-83.
41. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry.* 1995 Aug 29;34(34):10872-8.
42. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(11):1493-505.

43. Liu L, Abramowitz J, Askari A, Allen JC. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Nov;287(5):H2173-82.
44. Zhang X, Meng H, Wang MM. Collagen represses canonical notch signaling and binds to notch ectodomain. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Jul;45(7):1274-80.
45. Schad JF, Meltzer KR, Hicks MR, Beutler DS, Cao TV, Standley PR. Cyclic strain upregulates VEGF and attenuates proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vasc Cell*. 2011 Sep 19;3:21,824X-3-21.
46. Kimes BW, Brandt BL. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res*. 1976 Mar 15;98(2):349-66.
47. Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):7129-34.
48. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. 2007;15(3):100-8.
49. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Jan;19(1):73-82.
50. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001 Apr;22(2):153-83.
51. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Sep 1;4(9):a011189.
52. Xie P, Fan Y, Zhang H, Zhang Y, She M, Gu D, Patterson C, Li H. CHIP represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation via ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*. 2009 May;29(9):2398-408.

53. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):362-74.
54. Holle AW, Engler AJ. Cell rheology: Stressed-out stem cells. *Nat Mater*. 2010 Jan;9(1):4-6.
55. Swaminathan V, Mythreye K, O'Brien ET, Berchuck A, Blobe GC, Superfine R. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5075-80.
56. Berdyeva TK, Woodworth CD, Sokolov I. Human epithelial cells increase their rigidity with ageing in vitro: Direct measurements. *Phys Med Biol*. 2005 Jan 7;50(1):81-92.
57. Ulrich P, Zhang X. Pharmacological reversal of advanced glycation end-product-mediated protein crosslinking. *Diabetologia*. 1997 Jul;40 Suppl 2:S157-9.
58. Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: Chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol*. 1992;23:1-34.
59. Halka AT, Turner NJ, Carter A, Ghosh J, Murphy MO, Kirton JP, Kielty CM, Walker MG. The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Cardiovasc Pathol*. 2008 Mar-Apr;17(2):98-102.
60. Briones AM, Arribas SM, Salaices M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010 Mar;19(2):187-94.
61. Ren J, Albinsson S, Hellstrand P. Distinct effects of voltage- and store-dependent calcium influx on stretch-induced differentiation and growth in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 2010 Oct 8;285(41):31829-39.
62. Thatcher, SE, Marshall University. MLCK/actin Interaction in the Contracting A7r5 Cell and Vascular Smooth Muscle. Marshall University; 2007.

63. Simard E, Kovacs JJ, Miller WE, Kim J, Grandbois M, Lefkowitz RJ. B-arrestin regulation of myosin light chain phosphorylation promotes AT1aR-mediated cell contraction and migration. *PloS one*. 2013;In Press
64. Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int J Inflam*. 2013;2013:403460.
65. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Jr, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation*. 1999 Sep 7;100(10):1134-46.
66. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Accumulation of maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2463-9.
67. McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2470-8.
68. Yamamoto Y, Yamamoto H. RAGE-mediated inflammation, type 2 diabetes, and diabetic vascular complication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Aug 21;4:105.
69. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: A fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res*. 2010 mar;106(5):842-53.
70. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res*. 2003 Dec 12;93(12):1159-69.
71. Goldin A, Beckman J, Schmidt A, Creager M. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.

DISCUSSION

La pharmacologie s'intéresse à l'effet des médicaments qu'ils soient d'origine synthétique, naturelle ou endogène et couvre plusieurs champs d'expertise tels que la composition et les propriétés physico-chimiques des médicaments, leur synthèse ou leur conceptualisation et les interactions entre les médicaments. Tout comme la présente thèse, la pharmacologie s'intéresse également aux mécanismes cellulaires impliqués dans la transduction de signaux impliqués dans l'initiation ou la régulation de diverses fonctions cellulaires. Ainsi, étant donné l'importance de l'activité contractile cellulaire, les travaux présentés ici explorent les mécanismes impliqués dans la transduction de signaux menant à la contraction cellulaire et les mécanismes impliqués dans la régulation de celle-ci. Ces nouveaux mécanismes pourraient permettre d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles lorsque l'activité contractile cellulaire est compromise tel que lors de l'hypertension ou la dysfonction vasculaire associée au diabète.

Un aspect important et novateur des travaux présentés repose sur l'utilisation d'essais fonctionnels afin de mesurer l'activité contractile et les propriétés mécaniques de la cellule. En effet, tel que démontré dans cette thèse et les travaux précédents du Pr. Grandbois (Cuerrier *et al.*, 2009) ; les mesures de contraction cellulaire par AFM en temps réel ou basée sur la variation de rigidité cellulaire sont particulièrement intéressantes puisqu'elles permettent de faire le lien direct entre les effets d'une drogue sur la signalisation cellulaire et la fonction contractile. Ainsi, les données obtenues par AFM permettent d'ajouter une nouvelle perspective concernant l'activité contractile cellulaire souvent caractérisée sur la base d'observations sur la morphologie cellulaire, l'état du cytosquelette ou le niveau d'activité de la myosine (MLC phosphorylée). Malheureusement, au niveau fonctionnel, il existe peu d'outils permettant de mesurer directement et de façon quantitative la fonction contractile cellulaire autre que les mesures de migration cellulaire souvent indirectes. Toutefois, à l'aide de l'AFM, les résultats obtenus ont permis de montrer pour la première fois au niveau fonctionnel l'implication des β -arrestines dans la contraction cellulaire induite par l'activation d'AT1aR par le ligand naturel Ang II, mais également par le ligand biaisé SII. De plus, la mesure de contraction cellulaire par AFM réalisée sur les VSMC A7r5 a mis

en évidence les effets de la signalisation RAGE sur le phénotype et la fonction contractile de ces cellules. Les impacts fondamentaux et thérapeutiques de ces découvertes seront d'ailleurs discutés dans les prochaines sections de cette discussion.

5.1 Contributions respectives des β -arrestines dans la réponse contractile induite par l'activation d'AT1aR

L'activation des GPCR a été impliquée à mainte reprise dans la régulation de plusieurs processus physiologiques tels que la contraction des cellules musculaires et non-musculaires. Dans ce contexte, les effets du récepteur AT1a dans la contraction cellulaire sont bien connus que ce soit tant au niveau des cellules musculaires ou non musculaires (Mehta et Griendling, 2007). Il a été montré que l'Ang II induit une activité contractile importante dans les cellules HEK-293 surexprimant le récepteur AT1R humain : un modèle établi pour étudier la signalisation dépendante du récepteur AT1 (Auger-Messier *et al.*, 2005; Cuerrier *et al.*, 2009). En plus de leur signalisation via les protéines $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, les GPCR recrutent et activent les β -arrestines. D'ailleurs, il a été montré que la β -arrestine-1 est nécessaire à l'activation de Rho A et de son effecteur ROCK dans la formation des fibres de stress (Barnes *et al.*, 2005), que les β -arrestine-1 et 2 sont impliquées dans le bourgeonnement cellulaire induit par Rho A (Godin et Ferguson, 2010) et que la β -arrestine-2 était nécessaire dans la chimiotaxie induite par l'Ang II chez les cellules embryonnaires de rein HEK 293 surexprimant le récepteur AT1aR (Hunton *et al.*, 2005). À la lumière de ces informations, la présente thèse s'est premièrement intéressée à élucider la contribution associée à la signalisation des β -arrestine-1 et 2 dans la contraction cellulaire induite suite à l'activation du récepteur AT1a.

Ainsi, il a premièrement été montré que la régulation de la phosphorylation de la MLC par les β -arrestines est impliquée dans la réponse contractile induite par l'activation du récepteur AT1a. En effet, la déplétion en β -arrestine-1 dans les cellules 293-AT1aR nuit à l'augmentation des niveaux de phospho-MLC suite à la réponse d'AT1aR. Ces résultats, suggèrent donc un rôle positif de la β -arrestine-1 dans la régulation de la phosphorylation de la myosine. Ce rôle pourrait être rempli de diverses façons. Premièrement, via son interaction

avec le domaine MYPT-1 de MLCP, la β -arrestine-1 pourrait empêcher le domaine MYPT-1 d'interagir avec le domaine catalytique de MLCP favorisant ainsi la phosphorylation de la myosine. Deuxièmement, tel que suggéré dans une publication récente du groupe du Pr. Lefkowitz (Xiao *et al.*, 2007), l'activité Rho A/ROCK dépendante de la β -arrestine-1 pourrait être également à l'origine de cette régulation positive de la phosphorylation de la myosine. En effet, ROCK possède comme substrat la chaîne légère de la myosine ainsi que la MLCP activant et inhibant, respectivement, ces derniers. De toute évidence, il est fort probable qu'une combinaison de ces mécanismes est à l'origine du phénotype observé en absence de β -arrestine-1.

De surcroît, les résultats présentés précédemment montrent que la β -arrestine-2 était impliquée dans la régulation de la myosine via l'inhibition de la phosphorylation de sa chaîne légère. Ainsi, la stimulation Ang II chez les cellules dont l'expression de la β -arrestine-2 a été réprimée, montre une augmentation de phospho-MLC similaire à celle observée dans les expériences de déplétion en MYPT-1. Ces résultats suggèrent donc que l'interaction entre la β -arrestine-2 et MYPT-1 favorise l'activité de la phosphatase contrairement à la β -arrestine-1. Toutefois, les mécanismes responsables de cette régulation demeurent à être identifiés tout comme l'importance des paramètres temporel et spatial de l'interaction entre les β -arrestines et MYPT-1 dans l'activité de MLCP. De façon intéressante, il a également été montré que la kinase ERK est en mesure de phosphoryler MLCK et favoriser, de façon modeste, la phosphorylation de la myosine, la génération de force et la contraction cellulaire (D'Angelo et Adam, 2002). Cependant, à ce jour, aucun lien n'a encore été établi entre l'activation d'ERK dépendante des β -arrestines, la régulation de MLCK et la contraction cellulaire.

En 2008, Matsumura *et al* ont proposé un modèle où la régulation de la contraction cellulaire ne dépend pas uniquement de niveaux élevés de myosine phosphorylée, mais fait intervenir l'importance de l'activité de MLCP. Dans ce modèle, des niveaux élevés de phospho-MLC associés à une faible activité de MLCP, donc un taux de renouvellement faible de la phospho-MLC, menaient à la formation de fibres de stress et une augmentation de l'adhésion cellulaire. D'un autre côté, des niveaux élevés de phospho-MLC et une activité élevée de MLCP étaient nécessaires pour induire un taux de renouvellement élevé de phospho-MLC

requis pour induire des changements morphologiques associés à la contraction et un taux de renouvellement des points focaux d'adhésion favorable à la migration (Matsumura et Hartshorne, 2008). L'importance de l'activité MLCP dans le maintien d'un taux de renouvellement élevé de phospho-MLC a d'ailleurs été mise en évidence dans cette thèse, puisqu'en absence de MYPT-1 la migration induite par l'AngII ou le SII chez les rVSMC est diminuée malgré des niveaux de phospho-MLC supérieurs. Encore une fois, ces résultats corroborent ceux obtenus en absence de β -arrestine-2 chez les cellules 293-AT1aR où l'activité de MLCP semblait être diminuée tout comme la contraction cellulaire mesurée par AFM.

5.2 L'impact thérapeutique du rôle des β -arrestines dans la réponse contractile induite par l'activation d'AT1aR

Cette thèse a montré que la signalisation des β -arrestines dépendante de l'activation d'AT1aR induit augmentation de la phosphorylation de MLC pouvant être associée à la contraction cellulaire. De plus, il a été observé que le SII, un ligand biaisé du récepteur AT1a pour la voie des β -arrestines, est en mesure d'induire de la contraction et de la migration cellulaire confirmant le rôle des β -arrestines dans ces événements. Toutefois, malgré les rôles opposés des β -arrestine-1 et 2 sur la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, cette thèse suggère que les β -arrestine-1 et 2 jouent un rôle complémentaire en régulant le cycle de phosphorylation de MLC puisque ce dernier joue un rôle majeur dans la contraction et la migration cellulaire (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009).

Dans un contexte plus large, les résultats présentés dans cette thèse confirment également le potentiel pharmacologique des ligands biaisés. En effet, cette thèse a été en mesure de montrer pour la première fois que le SII, un ligand biaisé du récepteur AT1a pour la voie des β -arrestines, est en mesure d'induire de la contraction cellulaire. Ceci pourrait être particulièrement intéressant dans un contexte pharmacologique où la signalisation biaisée d'AT1aR dépendante des β -arrestines serait bénéfique pour ses effets contractiles modérés et cardioprotecteurs (Rakesh *et al.*, 2010). En effet, ces résultats sont particulièrement intéressants pour le traitement de l'insuffisance cardiaque aigüe. Dans cette pathologie,

malgré une activation exacerbée du système rénine-angiotensine, les ACEI et les ARA ne peuvent être utilisés puisqu'ils engendrent une hypotension qui diminue la performance du cœur et exacerbe l'insuffisance cardiaque. Ainsi, avec les traitements actuels, le système rénine-angiotensine demeure actif chez les individus et favorise ainsi le remodelage cardiaque pouvant mener à l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque chronique. C'est pourquoi l'efficacité du TRV027 ([Sar¹, D-Ala⁸-OH]-Ang II), un ligand biaisé du récepteur AT1aR activant la voie des β -arrestines de façon similaire au SII, a été évaluée dans le contrôle et le traitement de l'insuffisance cardiaque aigüe. Ainsi, les premiers résultats cliniques ont montré que ce dernier était en mesure d'activer la voie des β -arrestines et limiter les effets hypertenseurs du système rénine-angiotensine endogène en générant seulement une hypotension limitée (5-10 mmHg) (Violin *et al.*, 2013).

5.3 L'inhibition du phénotype contractile des VSMC dépendante de l'activation de RAGE

Le phénotype cellulaire est défini comme la somme des processus cellulaires impliquant l'expression de gènes et de protéines spécifiques qui résultent dans l'élaboration de caractéristiques cellulaires particulières telles que la morphologie et la fonction. Il est établi que les cellules dites différenciées possèdent une faible plasticité phénotypique. Toutefois, certaines conditions pathologiques modifiant l'environnement cellulaire sont capables d'engendrer une modification du phénotype cellulaire et par extension les fonctions de ces dernières. Ceci est particulièrement important au niveau des VSMC puisque la modulation du phénotype contractile des VSMC joue un rôle central dans le développement du système vasculaire ainsi que dans le remodelage de ce dernier observé dans plusieurs pathologies. En effet, en réponse à des dommages vasculaires, les VSMC se dédifférencient vers un phénotype prolifératif et synthétique. D'ailleurs cette dédifférenciation est impliquée dans le développement et la progression de l'athérosclérose et l'hypertension (Olson et Dong, 2006; Owens *et al.*, 2004).

Il existe plusieurs façons de définir le phénotype cellulaire. L'étude du transcriptome ou la caractérisation du protéome d'une cellule révèle les gènes clés associés aux fonctions

spécifiques d'un type cellulaire. Ainsi, les cellules musculaires lisses doivent exprimer la MyoC afin de permettre leur différenciation et l'expression de leur phénotype contractile (Mack, 2011). De plus, il a été montré que le transfert du transcriptome d'une cellule différenciée pouvait induire et conférer, chez la cellule réceptrice, des propriétés fonctionnelles similaires au donneur (Sul *et al.*, 2009). Il peut également s'agir de marqueurs de différenciation comme le récepteur CD4 exprimé dans certains sous-types de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T « helper » 1 et 2 (Larsen *et al.*, 2011) ou de protéines jouant un rôle direct dans la fonction spécifique d'un type cellulaire, par exemple l'alcaline phosphatase des ostéoblastes impliquée dans la densification osseuse (Rawadi *et al.*, 2003). L'apparence d'une cellule, ou sa morphologie, traduit également le phénotype cellulaire, car l'organisation du cytosquelette et des protéines responsables de la morphologie cellulaire influence non seulement l'aspect visuel des cellules, mais également ses propriétés mécaniques telles que sa rigidité qui influence sa capacité à générer des forces nécessaires pour la contraction ou la migration. Ainsi, on classe les cellules neuronales selon la forme de leur arbre somato-dendritique : on retrouve les cellules nerveuses pyramidales, en panier ou en chandelier (Migliore et Shepherd, 2005). Chez les VSMC, le réseau d'actine doit être dense et organisé de façon particulière pour que la cellule soit en mesure d'avoir un appareil contractile fonctionnel (Ye *et al.*, 2014). Ultimement, c'est la fonction d'un type cellulaire qui permet d'établir le phénotype. À titre d'exemple, un cardiomyocyte doit être capable de se contracter de façon régulière et organisée suite à une entrée de calcium extracellulaire (Bers, 2002). Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique doivent également exprimer les jonctions serrées nécessaires pour effectuer leur fonction barrière qui est d'empêcher le passage de certaines molécules vers le système nerveux central (Wolburg *et al.*, 1994). Les cellules bêta du pancréas doivent être capables de produire et sécréter l'insuline pour exprimer leur phénotype fonctionnel (Orsi *et al.*, 1972). Les VSMC doivent être en mesure de répondre à un agent vasoactif comme l'AVP et induire l'activation de leur machinerie contractile.

Tel que mentionné plus tôt, des perturbations dans l'homéostasie des voies de signalisation activées chez une cellule peuvent influencer le phénotype transcriptionnel, protéomique et ultimement fonctionnel de cette dernière. Ainsi l'hyperactivité signalétique des MAPK

ERK1/2 peut amplifier la réponse fonctionnelle contractile de l'Endothéline-1 dans les cellules musculaires lisses des coronaires (Cain *et al.*, 2002). Il a été montré que l'activation de NF- κ B chez les cellules du muscle lisse de côlon entraîne des modifications du phénotype mécanique de ces cellules : leur fonction contractile se retrouve diminuée (Shi *et al.*, 2003). Également, l'activation du facteur de transcription NF- κ B entraîne l'expression d'un phénotype inflammatoire chez la cellule endothéliale caractérisé par la transcription de plusieurs gènes pro inflammatoires tels que des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, la synthétase inductible de monoxyde d'azote, la cyclooxygénase inductible et des facteurs d'adhésion cellulaire (Siebenlist *et al.*, 1994). D'ailleurs, il a été rapporté que les AGE qui font l'objet de la présente thèse, interféreraient avec la fonction de barrière de l'endothélium vasculaire via l'activation de RhoA/ROCK (Wang *et al.*, 2012). À ce jour, peu d'études se sont intéressées aux effets fonctionnels de l'activation du récepteur RAGE chez les VSMC à l'exception peut-être des travaux de Suga *et al.* (Suga *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude montraient principalement que la surexpression et l'activation de RAGE permettait aux VSMC d'acquérir des propriétés pouvant être assimilées à des ostéoblastes impliquant ainsi RAGE dans la calcification vasculaire observée dans le diabète. Néanmoins, les résultats ici présentés sont les premiers à montrer les effets phénotypiques et fonctionnels de l'activation de RAGE chez les VSMC. De plus, cette thèse amène de nouvelles données sur l'état mécanique des VSMC exposées ou non aux AGE. Finalement les effets de deux types de ligands pour RAGE, soient AGE-HSA et CML-HSA, ont été caractérisés au niveau de l'homéostasie des VSMC.

L'état de différenciation des VSMC dépend largement de l'expression de gènes associés au phénotype contractile. Ainsi, une diminution de l'expression de ces gènes entraîne l'expression du phénotype prolifératif et synthétique. Les protéines SM- α -actine, SM-MHC et SM-22 α sont des marqueurs établis du phénotype contractile et peuvent être régulés par une variété de signaux physiopathologiques associés à l'altération de l'environnement cellulaire pouvant être causées, entre autre, par des dommages vasculaires. Parmi ces altérations, on retrouve l'accumulation de lipides et les produits de peroxydation de ces derniers, la présence accrue de cytokines inflammatoires telle que l'interleukine-6, l'altération des contacts cellule-cellule ou de ces dernières avec les éléments de la matrice

extracellulaire, l'exposition aux éléments du sang tels que les molécules dérivées de l'activité plaquettaire, et la présence accrue de facteurs de croissance tel que le TGF- β (Owens *et al.*, 2004). L'une des prémisses de cette thèse est que l'activation de RAGE est impliquée dans le développement de pathologies vasculaires puisqu'elle interfère avec l'expression du phénotype contractile des VSMC. Le modèle de VSMC étudié utilise les cellules A7r5 dérivées d'aortes thoraciques et abdominales de rat et couramment utilisées pour étudier la régulation du phénotype des VSMC (Liu *et al.*, 2004; Schad *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Ces cellules peuvent générer un potentiel d'action pouvant être transmis d'une cellule à l'autre via des jonctions de faible résistance et expriment la créatine phosphokinase de type musculaire : des caractéristiques propres aux cellules du muscle lisses différenciées et fonctionnelles (Kimes et Brandt, 1976). De plus, ces dernières expriment les récepteurs V1 de la vasopressine qui, dans les VSMC, induit la contraction cellulaire *via* les mêmes mécanismes associés au récepteur AT-1 à l'angiotensine, tel que mentionné dans l'introduction. Ainsi, l'utilisation d'AVP comme agoniste pouvant induire la contraction cellulaire a été priorisée dans ces travaux puisque la signalisation de V1R dans les cellules A7r5 a été davantage établie que la signalisation et les effets contractiles de l'activation d'AT1R. Les résultats présentés dans cette thèse ont, dans un premier temps, permis d'établir la validité des cellules A7r5 comme modèle de VSMC, puisqu'il a été montré que ces cellules possèdent des niveaux importants d'ARNm codant pour SM- α -actine et SM-MHC ainsi que les protéines associées. Il a également été montré que les cellules A7r5 transcrivent et traduisent des niveaux importants de MyoC et SM-22 α : respectivement un cofacteur de transcription impliqué dans le contrôle du phénotype contractile des cellules du muscle lisse (Wang *et al.*, 2003) et un marqueur du phénotype contractile de cellules du muscle lisse (Rensen *et al.*, 2007). Finalement, à l'aide de mesures de rigidité par AFM, il a été mis en évidence que les cellules A7r5 sont compétentes mécaniquement puisque ces dernières contractent lorsque stimulées avec l'AVP.

Il est connu que l'activation de RAGE induit la signalisation dépendante des protéines de la famille des MAPKs, PI3 kinase et JAK/STAT (Goldin *et al.*, 2006) et que cette signalisation est responsable de l'activation de facteurs de transcription tel que NF- κ B. Dans les résultats présentés précédemment, la validité du modèle A7r5 a été également confirmée puisqu'il a

été montré que RAGE est exprimé et fonctionnel puisque les cellules exposées aux AGE montrent une modulation, quoi que globalement modérée, de plusieurs voies de signalisation associées au contrôle du phénotype des VSMC. Ainsi, il a été montré que l'activation de RAGE entraîne une augmentation de l'activité d'ERK 1/2, PI3K/AKT et du facteur de transcription NF- κ B alors qu'elle diminue l'activité des voies JNK et p38. La signalisation des MAPK ERK 1/2 a été étudiée à de multiples reprises chez les VSMC et a été associée à une augmentation de la prolifération, de la synthèse d'ADN et la migration cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Xi *et al.*, 1999). D'un autre côté, les MAPK JNK et p38 sont des kinases associées au stress et sont impliquées dans l'adaptation à ce stress via l'induction de l'inflammation, la différenciation cellulaire ou l'apoptose (Pearson *et al.*, 2001). Finalement, la voie PI3K/AKT joue un rôle clé dans plusieurs processus cellulaires tels que le métabolisme du glucose, l'apoptose, la prolifération cellulaire, la transcription de gènes et la migration (Hemmings et Restuccia, 2012). Sachant que l'activité de p38 et JNK est diminuée chez les cellules A7r5 exposées aux AGE et que l'activité d'ERK1/2 et PI3K/AKT est augmentée dans les mêmes conditions; l'activation de RAGE chez les VSMC pourrait jouer un rôle anti-apoptotique à court terme. Toutefois, le rôle aiguë et chronique de l'activation RAGE et de ses voies de signalisation sur la survie cellulaire demeurent à être déterminés étant donné la durée limitée des stimulations effectuées dans les présentes études.

Plusieurs études ont montré que l'activation de NF- κ B interfère avec l'expression du phénotype contractile des VSMC (Xie *et al.*, 2011). De façon intéressante, les résultats présentés confirment que l'exposition des cellules A7r5 aux AGE induit l'activation de NF- κ B ce qui corrèle avec la diminution observée dans l'expression de plusieurs marqueurs biochimiques associés au phénotype contractile des VSMC. En effet, les niveaux de SM- α -actine, MyoC et SM-22 α sont diminués chez les cellules exposées à AGE-HSA ou CML-HSA. Tel que rapporté par d'autres groupes (Xie *et al.*, 2009), il est suggéré que ces diminutions pourraient être attribuées à la dégradation de MyoC puisque les niveaux des ARNm codant pour cette protéine n'ont pas été affectés par l'activation de RAGE. Toutefois, le lien entre l'absence de changements au niveau de l'ARNm codant pour SM- α -actine et la diminution de l'expression de cette protéine demande à être investigué davantage. Néanmoins, ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle l'activation de RAGE chez

les VSMC interfère avec l'expression du phénotype contractile en altérant l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la contraction cellulaire.

Sachant que la signalisation RAGE est en mesure d'activer les petites protéines G Rho, Rac et cdc42 et de potentiellement moduler l'activité de MLCK via ERK 1/2, il est surprenant que l'activation de RAGE n'ait pas entraîné de changements notables dans l'organisation générale du cytosquelette, la densité des filaments d'actine ou l'activité de la myosine. Toutefois, grâce à la technique d'AFM, nous avons été en mesure de montrer que l'exposition aux AGE entraînait des changements au niveau des propriétés mécaniques (rigidité et hauteur cellulaire) des cellules A7r5. La rigidité cellulaire est une caractéristique phénotypique importante pour les cellules compétentes mécaniquement puisqu'elle est normalement associée à la capacité d'une cellule de se contracter, migrer ou proliférer (Friedl et Wolf, 2003). D'ailleurs, il s'agit ici de la première étude où il est montré que l'activation de RAGE augmente la rigidité cellulaire dans un modèle de VSMC. Une augmentation qui corrèle également avec une hauteur cellulaire diminuée et la tendance à la hausse observée dans la phosphorylation de la MLC; suggérant une augmentation de tension intracellulaire et d'adhésion cellulaire. Une propriété importante des VSMC est la capacité de répondre aux forces mécaniques présentes dans leur environnement telles que l'étirement de la matrice extracellulaire, en modulant l'expression de plusieurs gènes (Halka *et al.*, 2008). Ainsi, il est proposé que l'augmentation de rigidité des VSMC causée par l'activation de RAGE puisse affecter la capacité de ces cellules de répondre aux forces mécaniques auxquelles elles sont normalement exposées *in vivo* ce qui pourrait entraîner les changements phénotypiques observés dans plusieurs pathologies vasculaires. D'ailleurs, il a été observé précédemment que l'augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins diminue la compliance vasculaire aux forces exercées par le flot sanguin ce qui favorise le développement de l'hypertension (Briones *et al.*, 2010). Une fois de plus, l'augmentation de rigidité des VSMC induite par l'activation de RAGE pourrait contribuer de façon similaire au développement de l'hypertension observée en condition diabétique.

5.4 Les effets de l'activation de RAGE sur la fonction contractile des VSMC

L'activation de RAGE dans les VSMC, en interférant avec l'expression de protéines clés associées au phénotype contractile de ces cellules, affecte également leur fonction primaire de contraction. En effet, les résultats présentés montrent que la phosphorylation de MLC, un marqueur biochimique de la contraction cellulaire, et la signalisation calcique, un second messenger impliqué dans la contraction cellulaire, ont été altérés voire amplifiés. Dans ce contexte, les résultats obtenus suggèrent fortement que l'activation de RAGE pourrait participer à la condition hypertensive associée au diabète en amplifiant la réponse des VSMC aux hormones vasopressives telles que l'AVP, l'endothéline ou l'angiotensine II. De façon intéressante, il est connu que la signalisation calcique est impliquée dans la régulation de plusieurs gènes. En fait, une étude récente a montré qu'une augmentation de l'activité SOCE chez les VSMC, similaire à celle observée dans la présente thèse, favorisait l'expression de gènes associée à la réponse précoce de c-fos et ERK 1/2 : deux événements pouvant mener à l'hypertrophie et la prolifération des VSMC (Ren *et al.*, 2010). Ainsi, il devient envisageable que l'augmentation de l'activité SOCE induite par l'activation de RAGE dans les cellules A7r5 serait en mesure d'influencer leur phénotype contractile et ultimement moduler leur capacité à répondre à des hormones vasopressives.

Peu d'études ont été capables de mesurer directement la contraction des cellules A7r5. Toutefois, à l'aide de la microscopie à haute résolution et de méthodes sophistiquées d'imagerie quelques études ont été en mesure de montrer de fins changements au niveau de l'organisation du cytosquelette de ces cellules lorsque stimulées avec un agoniste contractile ((Thatcher, S.E., 2007)). Il n'est donc pas étonnant qu'aucun changement significatif au niveau du cytosquelette d'actine chez les cellules stimulées à l'AVP n'ait été observé par microscopie à épifluorescence. Toutefois, notre laboratoire a montré précédemment que la résolution et la sensibilité de l'AFM permettent de quantifier des variations au niveau des propriétés mécaniques cellulaires et qu'une forte corrélation existe entre la contraction cellulaire induite par un agoniste et l'augmentation de la rigidité cellulaire (Cuerrier *et al.*, 2008). Ainsi, à l'aide de l'AFM, il est montré pour la première fois, qu'en dépit de l'amplification de la réponse calcique et de la phosphorylation de MLC, les VSMC exposées aux AGE perdent leur capacité contractile. En effet, le module de Young des cellules stimulées à l'AVP n'a pas augmenté chez les cellules A7r5 prétraitées avec CML-HSA. Il

est donc suggéré que les perturbations provoquées par l'activation de RAGE sur l'expression de protéines associées au phénotype contractile des VSMC participeraient au découplage entre la signalisation cellulaire associée à la contraction cellulaire (calcium et phospho-MLC) et la contraction cellulaire *per se*. Finalement, l'ensemble de ces résultats supporte l'hypothèse où l'activation de RAGE dans les VSMC interfère avec la fonction contractile associé au phénotype de même nature.

5.5 Les agonistes de RAGE et leurs impacts sur la signalisation cellulaire

La plupart des études s'intéressant à l'activation de RAGE utilisent des ligands issus de l'incubation d'albumine avec du glucose pendant deux à huit semaines à des températures allant de 37°C à 65°C (Valencia *et al.*, 2004). Dans ces conditions, une variété de structures d'AGE peuvent être obtenues dont la composition est un mélange plus ou moins unique d'AGE possédants différentes affinités pour RAGE. Ces variations inhérentes à la préparation des AGE pourraient expliquer une certaine variabilité et/ou incongruité entre les différentes études que ce soit au niveau des doses utilisées ou des effets observés. C'est mes travaux ont également porté sur les effets de CML-HSA puisque ce dernier est constitué d'un seul type d'AGE soit l'épitope CML. D'ailleurs, l'épitope CML est la modification la plus commune chez les protéines sujettes à la réaction de Maillard (Ikeda *et al.*, 1996). De plus, l'accumulation de protéines arborant la modification CML a été rapportée à de multiples reprises *in vivo* dans plusieurs tissus d'origine humaine ou animale, et ce, que ce soit en condition physiologique ou pathologique (Reddy *et al.*, 1995). Il est donc suggéré que les préparations CML-HSA représentent un meilleur ligand pour étudier l'activation de RAGE.

Afin de valider cette affirmation, les effets d'AGE-HSA et de CML-HSA ont été évalués au niveau de la signalisation cellulaire, l'activation de facteurs de transcription, la transcription d'ARNm, l'expression de protéines et la fonction cellulaire contractile des VSMC. Tel qu'attendu, les résultats obtenus avec CML-HSA semblent être, de façon générale, plus robuste et constants. Ainsi, il semblerait que CML-HSA soit un ligand plus approprié afin d'étudier l'activation de RAGE. Toutefois, certains résultats incohérents ont pu être observés en comparant les réponses dépendantes d'AGE-HSA et CML-HSA. Il est suggéré que ces

dissimilitudes pourraient être attribuables aux niveaux d'activation de NF- κ B qui diffèrent grandement suite à l'exposition à ces deux ligands : le contenu en CML de AGE-HSA étant plus faible, il est possible que l'activation de RAGE et l'activation subséquente de NF- κ B aient pu être limitées. D'ailleurs, il est connu que différents niveaux d'activité de NF- κ B peuvent induire des réponses pouvant être opposées chez la cellule : alors qu'une activité importante peut favoriser l'apoptose, des niveaux d'activation faibles sont connus pour favoriser la transcription de gènes impliquée dans la survie cellulaire (Gloire *et al.*, 2006). Nous proposons que la différence de puissance observée pour les deux ligands dans l'activation NF- κ B, puisse potentiellement expliquer la divergence des réponses obtenues auprès de la différenciation et la fonctionnalité des VSMC. Toutefois, de plus amples travaux sur la nature des ligands de RAGE et leur signalisation s'avéreraient nécessaires afin d'adresser adéquatement cette question.

5.6 Les antagonistes de RAGE et leur potentiel pharmacologique

Ici, de nouvelles évidences ont été présentées et renforcent les études publiées précédemment suggérant que l'activation de RAGE dans les VSMC est potentiellement une pierre angulaire dans le développement des maladies vasculaires associées au diabète, et ce, en interférant avec leurs propriétés mécaniques et en modifiant leur phénotype contractile. Les résultats présentés ainsi que l'implication de RAGE dans plusieurs pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, l'arthrite, plusieurs maladies pulmonaires (dommages pulmonaires aigües, syndrome respiratoire aigüe et l'asthme), le sepsis et l'athérosclérose (Chuah *et al.*, 2013), suggèrent, une fois de plus, que le développement d'antagonistes de RAGE pourrait s'avérer intéressant comme classe d'agents pharmacologiques. D'autant plus que l'administration de la forme soluble de RAGE (sRAGE) chez des animaux diabétiques prévient et traite plusieurs maladies inflammatoires. En effet, il a été montré que sRAGE prévient le développement de complications au niveau de la micro (Bierhaus *et al.*, 2001; Wendt *et al.*, 2003) et macrocirculation (Bucciarelli *et al.*, 2002; Kislinger *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1998) en plus de restaurer la réponse angiogénique (Shoji *et al.*, 2006). Il demeure, qu'à ce jour, aucun antagoniste n'ait été caractérisé au niveau de la signalisation RAGE chez les VSMC et leur impact potentiel dans la préservation du phénotype fonctionnel.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La contraction cellulaire joue un rôle central dans plusieurs processus biologiques, pour ce, elle fait l'objet d'une fine régulation. Tel que discuté, l'activité contractile des VSMC est particulièrement critique dans l'homéostasie et le fonctionnement du système cardiovasculaire (Tang et Anfinogenova, 2008) et qu'une dérégulation de l'activité contractile de ces dernières est associée à plusieurs pathologies telle que l'hypertension et le diabète. Ainsi, dans le but d'identifier de nouveaux axes d'intervention thérapeutique, il est d'intérêt d'étudier les mécanismes régulant la contraction cellulaire en contexte physiologique et pathologique. Cette thèse s'est donc intéressée à divers aspects de la contraction cellulaire. Premièrement, à la signalisation impliquée directement dans sa régulation, et, deuxièmement, aux effets de la perturbation de l'environnement biochimique cellulaire sur la régulation de la contraction cellulaire. De plus, cette thèse confirme l'importance d'intégrer les nouveaux outils biophysiques en biologie cellulaire puisque que sans l'utilisation de l'AFM, il aurait été impossible de mesurer avec précision l'activité contractile et les propriétés mécaniques cellulaires.

Ainsi, étant donné le rôle important du système angiotensinergique dans l'hypertension et la régulation de l'activité contractile des VSMC (Kim et Iwao, 2000), le rôle de la signalisation des β -arrestines dans la régulation de la contraction cellulaire induite par l'activation d'AT1aR a été interrogé. Les résultats présentés ont permis de déterminer de façon précise les rôles respectifs de la β -arrestine-1 et 2 dans la régulation de la phosphorylation de la MLC et l'impact de cette régulation sur la contraction cellulaire. Plus précisément, il a été montré pour la première fois que la signalisation des β -arrestines participe à la contraction cellulaire en exerçant des effets opposés sur la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. D'ailleurs, la contraction cellulaire modérée induite par le SII pourrait expliquer les effets hypotenseurs limités du TRV027 et conférer un nouvel avantage à cette option thérapeutique et renforcer l'utilisation de ligand biaisé du récepteur AT1a pour la voie des β -arrestines dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aigüe.

En seconde partie de cette thèse, le rôle de l'activation de RAGE sur la fonction contractile des VSMC a été déterminé. D'ailleurs, il est connu qu'en conditions diabétiques la formation des AGE est augmentée et qu'un revirement phénotypique des VSMC a été observé (Etienne *et al.*, 1998; Pandolfi *et al.*, 2003). Ainsi les résultats présentés ont permis de déterminer que l'exposition aux AGE inhibait le phénotype contractile des VSMC en affectant leurs propriétés mécaniques et diverses fonctions cellulaires telles que la signalisation et la contraction cellulaire.

Une limite de l'étude présentée, malgré le fait que nous avons été en mesure d'établir une corrélation entre l'administration d'AGE et les effets sur le phénotype et la fonction des VSMC, est que nous n'avons pas été en mesure de confirmer directement le rôle de RAGE dans les différents phénomènes observés. Une stratégie basée sur l'utilisation de petits ARN interférents afin d'interférer avec l'expression de RAGE ou encore en utilisant divers antagonistes pour bloquer le récepteur, aurait pu être utilisée dans les différentes expériences pour cette fin. Toutefois, parmi les antagonistes de RAGE identifiés à ce jour, leur activité antagoniste face à la liaison AGE/RAGE demande encore à être déterminée. Finalement, il est évident que la réalisation d'études *in vivo* est requise afin de s'assurer de l'impact physiologique réel des AGE sur la fonction des VSMC. Dans ce contexte, l'utilisation d'antagonistes, dont l'activité a été démontrée et validée face aux AGE, ou de souris RAGE -/- pourrait être particulièrement intéressante afin de confirmer le rôle de RAGE dans les effets observés suite à l'administration de AGE exogènes.

Il a été montré que le diabète est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, les maladies coronaires et la cardiomyopathie (Grundy *et al.*, 1999). et que les diabétiques montrent des niveaux supérieurs et élevés d'AGE (Dyer *et al.*, 1993; McCance *et al.*, 1993) ; il a été proposé à de multiples reprises qu'un lien puisse exister entre l'activation de RAGE et le développement de maladies cardiovasculaires chez les diabétiques (Goldin *et al.*, 2006; Yamamoto et Yamamoto, 2013; Yan *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2010). En effet, il a été montré qu'en conditions diabétiques, les AGE contribuent à la dysfonction endothéliale, aux changements dans les propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins en favorisant l'épaississement de la membrane basale, à l'augmentation de la perméabilité

vasculaire et à promouvoir un état pro-thrombotique qui, ensembles, mènent à des dommages au niveau de la rétine, des reins et au niveau des systèmes vasculaires et nerveux (Grundy *et al.*, 1999). Enfin, pour la première fois, cette thèse rapporte les effets délétères des AGE au niveau des VSMC en montrant l'impact fonctionnel de ces derniers sur la contraction cellulaire.

Bien que plusieurs indices dans la littérature montrent une dysfonction vasculaire dans les modèles animaux et les individus atteints de diabète, la contribution relative des AGE et de l'activation de RAGE demeure à être identifiée. Parmi les modèles animaux existants, on retrouve, pour le diabète de type I, les animaux traités à la streptozotocine et les souris NOD; les modèles pré-diabétiques que sont les souris ob/ob et les rat Zucker (fa/fa) atteints d'obésité et d'une résistance à l'insuline; et les modèles de diabète de type II que sont les souris db/db et les rats Zucker diabétiques également obèses, mais sévèrement diabétiques. Il serait donc intéressant de déterminer si la signalisation RAGE est impliquée dans le dysfonctionnement vasculaire associé au diabète, et ce, en bloquant l'interaction AGE/RAGE dans ces modèles animaux. Toutefois, en absence d'antagoniste valide pour les AGE, l'utilisation de souris RAGE *-/-* diabétiques offrirait la meilleure alternative pour répondre à cette importante question. Sachant que les résultats présentés précédemment suggèrent que bloquer l'interaction entre RAGE et les AGE seraient potentiellement utiles dans la prévention des maladies cardiovasculaires associées au diabète et qu'à ce jour aucun antagoniste pour l'interaction AGE/RAGE n'ait été caractérisé; des peptides de 11 acides aminés ont été conçus et synthétisés par notre groupe dans le but de bloquer cette interaction. Ces peptides, dont la séquence est basés sur régions les plus glyquées de l'albumine humaine, contiennent la modification CML. D'ailleurs, dans une série d'expériences préliminaires, certains d'entre eux ont été en mesure de prévenir l'activation du facteur de transcription NF- κ B chez les cellules A7r5 stimulées avec AGE-HSA et CML-HSA. De tout évidence, l'efficacité de ces peptides demeure à être davantage caractérisée, toutefois ces derniers pourraient représenter la première classe de molécules développées spécifiquement pour bloquer les interactions entre les AGE et RAGE *in vitro* et *in vivo* si leur utilisation est tolérée chez l'animal.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abou-Saleh, H., Pathan, A.R., Daalis, A., Hubrack, S., Abou-Jassoum, H., Al-Naeimi, H., Rusch, N.J. et Machaca, K. (2013) Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor up-regulation in hypertension is associated with sensitization of Ca²⁺ release and vascular smooth muscle contractility. *The Journal of biological chemistry* 288(46): 32941-32951.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. et Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal of biological chemistry* 271(34): 20246-20249.
- Aplin, M., Christensen, G.L., Schneider, M., Heydorn, A., Gammeltoft, S., Kjolbye, A.L., Sheikh, S.P. et Hansen, J.L. (2007) Differential extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation by the angiotensin type 1 receptor supports distinct phenotypes of cardiac myocytes. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 100(5): 296-301.
- Arumugam, T., Ramachandran, V., Gomez, S.B., Schmidt, A.M. et Logsdon, C.D. (2012) S100P-derived RAGE antagonistic peptide reduces tumor growth and metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18(16): 4356-4364.
- Auger-Messier, M., Turgeon, E.S., Leduc, R., Escher, E. et Guillemette, G. (2005) The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II modifies the morphology and cytoskeletal organization of HEK-293 cells. *Experimental cell research* 308(1): 188-195.
- Bailey, A.J., Sims, T.J., Avery, N.C. et Halligan, E.P. (1995) Non-enzymic glycation of fibrous collagen: reaction products of glucose and ribose. *The Biochemical journal* 305 (Pt 2): 385-390.
- Barnes, W.G., Reiter, E., Violin, J.D., Ren, X., Milligan, G. et Lefkowitz, R.J. (2005) beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *Journal of Biological Chemistry* 280(9): 8041-8050.
- Basta, G., Schmidt, A.M. et De Caterina, R. (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular research* 63(4): 582-592.
- Baylor, D.A. et Burns, M.E. (1998) Control of rhodopsin activity in vision. *Eye (London, England)* 12 (Pt 3b): 521-525.

- Beaulieu, J.M., Marion, S., Rodriguiz, R.M., Medvedev, I.O., Sotnikova, T.D., Ghisi, V., Wetsel, W.C., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R. et Caron, M.G. (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132(1): 125-136.
- Berdyeva, T.K., Woodworth, C.D. et Sokolov, I. (2005) Human epithelial cells increase their rigidity with ageing in vitro: direct measurements. *Physics in Medicine and Biology* 50(1): 81-92.
- Bernard, O. (2007) Lim kinases, regulators of actin dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(6): 1071-1076.
- Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868): 198-205.
- Bierhaus, A., Stern, D.M. et Nawroth, P.P. (2006) RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 7(11): 985-991.
- Bierhaus, A., Haslbeck, K.M., Humpert, P.M., Liliensiek, B., Dehmer, T., Morcos, M., Sayed, A.A., Andrassy, M., Schiekofer, S., Schneider, J.G., Schulz, J.B., Heuss, D., Neundorfer, B., Dierl, S., Huber, J., Tritschler, H., Schmidt, A.M., Schwaninger, M., Haering, H.U., Schleicher, E., Kasper, M., Stern, D.M., Arnold, B. et Nawroth, P.P. (2004) Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of clinical investigation* 114(12): 1741-1751.
- Birnbaumer, L. (2009) The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca²⁺ concentrations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49:395-426.
- Brenner, R., Perez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T. et Aldrich, R.W. (2000) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407(6806): 870-876.
- Brett, J., Schmidt, A.M., Yan, S.D., Zou, Y.S., Weidman, E., Pinsky, D., Nowygrod, R., Neeper, M., Przywiecki, C. et Shaw, A. (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *The American journal of pathology* 143(6): 1699-1712.
- Briones, A.M., Arribas, S.M. et Salaices, M. (2010) Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* 19(2): 187-194.
- Broustas, C.G., Grammatikakis, N., Eto, M., Dent, P., Brautigan, D.L. et Kasid, U. (2002) Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by

Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *The Journal of biological chemistry* 277(4): 3053-3059.

- Bucala, R. et Cerami, A. (1992) Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif)* 231-34.
- Bucciarelli, L.G., Wendt, T., Qu, W., Lu, Y., Lalla, E., Rong, L.L., Goova, M.T., Moser, B., Kislinger, T., Lee, D.C., Kashyap, Y., Stern, D.M. et Schmidt, A.M. (2002) RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106(22): 2827-2835.
- Burstein, A.H., Grimes, I., Galasko, D.R., Aisen, P.S., Sabbagh, M. et Mjalli, A.M. (2014) Effect of TTP488 in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *BMC neurology* 1412-2377-14-12.
- Cain, A.E., Tanner, D.M. et Khalil, R.A. (2002) Endothelin-1--induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent [Ca(2+)](i) sensitization pathways. *Hypertension* 39(2 Pt 2): 543-549.
- Campbell, N.R., Gilbert, R.E., Leiter, L.A., Larochelle, P., Tobe, S., Chockalingam, A., Ward, R., Morris, D., Tsuyuki, R.T. et Harris, S.B. (2011) Hypertension in people with type 2 diabetes: Update on pharmacologic management. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 57(9): 997-1002, e347-53.
- Cecelja, M. et Chowienczyk, P. (2012) Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *JRSM cardiovascular disease* 1(4): 10.1258/cvd.2012.012016.
- Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P. et Evans, R.M. (2001) PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature medicine* 7(1): 48-52.
- Chen, X., Pavlish, K., Zhang, H.Y. et Benoit, J.N. (2006) Effects of chronic portal hypertension on agonist-induced actin polymerization in small mesenteric arteries. *American journal of physiology.Heart and circulatory physiology* 290(5): H1915-21.
- Chen, Y., Akirav, E.M., Chen, W., Henegariu, O., Moser, B., Desai, D., Shen, J.M., Webster, J.C., Andrews, R.C., Mjalli, A.M., Rothlein, R., Schmidt, A.M., Clynes, R. et Herold, K.C. (2008) RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181(6): 4272-4278.
- Cheung, B.M. et Li, C. (2012) Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? *Current atherosclerosis reports* 14(2): 160-166.
- Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C., Green, L.A., Izzo, J.L., Jr, Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S., Wright, J.T., Jr, Roccella, E.J., Joint National

Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute et National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee (2003) Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42(6): 1206-1252.

Chuah, Y.K., Basir, R., Talib, H., Tie, T.H. et Nordin, N. (2013) Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *International journal of inflammation* 2013, Article ID 403460, 15 pages.

Clynes, R., Moser, B., Yan, S.F., Ramasamy, R., Herold, K. et Schmidt, A.M. (2007) Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Current Molecular Medicine* 7(8): 743-751.

Cooke, R. (2004) The sliding filament model: 1972-2004. *The Journal of general physiology* 123(6): 643-656.

Cuerrier, C.M., Benoit, M., Guillemette, G., Gobeil, F., Jr et Grandbois, M. (2009) Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457(6): 1361-1372.

Cyron, C.J. et Humphrey, J.D. (2014) Vascular homeostasis and the concept of mechanobiological stability. *International Journal of Engineering Science* 85203-223.

Dahlof, B., Devereux, R.B., Kjeldsen, S.E., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Ibsen, H., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Lindholm, L.H., Nieminen, M.S., Omvik, P., Oparil, S., Wedel, H. et LIFE Study Group (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359(9311): 995-1003.

D'Angelo, G. et Adam, L.P. (2002) Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282(2): H602-10.

Dasgupta, K., Quinn, R.R., Zarnke, K.B., Rabi, D.M., Ravani, P., Daskalopoulou, S.S., Rabkin, S.W., Trudeau, L., Feldman, R.D., Cloutier, L., Prebtani, A., Herman, R.J., Bacon, S.L., Gilbert, R.E., Ruzicka, M., McKay, D.W., Campbell, T.S., Grover, S., Honos, G., Schiffrin, E.L., Bolli, P., Wilson, T.W., Lindsay, P., Hill, M.D., Coutts, S.B., Gubitz, G., Gelfer, M., Vallee, M., Prasad, G.V., Lebel, M., McLean, D., Arnold, J.M., Moe, G.W., Howlett, J.G., Boulanger, J.M., Laroche, P., Leiter, L.A., Jones, C., Ogilvie, R.I., Woo, V., Kaczorowski, J., Burns, K.D., Petrella, R.J., Hiremath, S., Milot, A., Stone, J.A., Drouin, D., Lavoie, K.L., Lamarre-Cliche, M., Tremblay, G., Hamet, P., Fodor, G., Carruthers, S.G., Pylypchuk, G.B., Burgess, E.,

- Lewanczuk, R., Dresser, G.K., Penner, S.B., Hegele, R.A., McFarlane, P.A., Khara, M., Pipe, A., Oh, P., Selby, P., Sharma, M., Reid, D.J., Tobe, S.W., Padwal, R.S., Poirier, L. et Canadian Hypertension Education Program (2014) The 2014 Canadian Hypertension Education Program recommendations for blood pressure measurement, diagnosis, assessment of risk, prevention, and treatment of hypertension. *The Canadian journal of cardiology* 30(5): 485-501.
- Davy, K.P., Seals, D.R. (1994) Total blood volume in healthy young and older men. *Journal of applied physiology* 75(5): 2059-2062.
- de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W. et Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* 52(3): 415-472.
- de Rooij, J., Kerstens, A., Danuser, G., Schwartz, M.A. et Waterman-Storer, C.M. (2005) Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. *The Journal of cell biology* 171(1): 153-164.
- Deane, R., Singh, I., Sagare, A.P., Bell, R.D., Ross, N.T., LaRue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R.J., Thiyagarajan, M., Zarcone, T., Fritz, G., Friedman, A.E., Miller, B.L. et Zlokovic, B.V. (2012) A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid-beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation* 122(4): 1377-1392.
- DeGroot, J., Verzijl, N., Wenting-Van Wijk, M.J., Bank, R.A., Lafeber, F.P., Bijlsma, J.W. et TeKoppele, J.M. (2001) Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation: the role of advanced glycation end products. *Arthritis and Rheumatism* 44(11): 2562-2571.
- Domke, J., Parak, W.J., George, M., Gaub, H.E. et Radmacher, M. (1999) Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscope. *European biophysics journal : EBJ* 28(3): 179-186.
- Drinda, S., Franke, S., Ruster, M., Petrow, P., Pullig, O., Stein, G. et Hein, G. (2005) Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 25(6): 411-413.
- Dyer, D.G., Dunn, J.A., Thorpe, S.R., Bailie, K.E., Lyons, T.J., McCance, D.R. et Baynes, J.W. (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *The Journal of clinical investigation* 91(6): 2463-2469.
- Emmert, D.A., Fee, J.A., Goeckeler, Z.M., Grojean, J.M., Wakatsuki, T., Elson, E.L., Herring, B.P., Gallagher, P.J. et Wysolmerski, R.B. (2004) Rho-kinase-mediated Ca²⁺-independent contraction in rat embryo fibroblasts. *American journal of physiology. Cell physiology* 286(1): C8-21.

- Etienne, P., Pares-Herbute, N., Mani-Ponset, L., Gabrion, J., Rabesandratana, H., Herbute, S. et Monnier, L. (1998) Phenotype modulation in primary cultures of aortic smooth muscle cells from streptozotocin-diabetic rats. *Differentiation; research in biological diversity* 63(4): 225-236.
- Fiuza, C., Bustin, M., Talwar, S., Tropea, M., Gerstenberger, E., Shelhamer, J.H. et Suffredini, A.F. (2003) Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101(7): 2652-2660.
- Fletcher, D.A. et Mullins, R.D. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463(7280): 485-492.
- Forbes, J.M. et Cooper, M.E. (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* 93(1): 137-188.
- Friedl, P. et Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews. Cancer* 3(5): 362-374.
- Fritz, G. (2011) RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in biochemical sciences* 36(12): 625-632.
- Gebhardt, C., Riehl, A., Durchdewald, M., Nemeth, J., Furstenberger, G., Muller-Decker, K., Enk, A., Arnold, B., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., Hess, J. et Angel, P. (2008) RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *The Journal of experimental medicine* 205(2): 275-285.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. et Piette, J. (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology* 72(11): 1493-1505.
- Godin, C.M. et Ferguson, S.S.G. (2010) The angiotensin II type 1 receptor induces membrane blebbing by coupling to Rho A, Rho kinase, and myosin light chain kinase. *Molecular Pharmacology* 77(6): 903-911.
- Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M. et Creager, M.A. (2006) Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114(6): 597-605.
- Goldstein, D.E., Little, R.R., Lorenz, R.A., Malone, J.I., Nathan, D., Peterson, C.M. et Sacks, D.B. (2004) Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes care* 27(7): 1761-1773.
- Goodman, O.B., Jr, Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H. et Benovic, J.L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383(6599): 447-450.
- Grosse, R. et Vartiainen, M.K. (2013) To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14(11): 693-697.

- Grundy, S.M., Benjamin, I.J., Burke, G.L., Chait, A., Eckel, R.H., Howard, B.V., Mitch, W., Smith, S.C., Jr et Sowers, J.R. (1999) Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 100(10): 1134-1146.
- Gupta, R. et Guptha, S. (2010) Strategies for initial management of hypertension. *The Indian journal of medical research* 132531-542.
- Halka, A.T., Turner, N.J., Carter, A., Ghosh, J., Murphy, M.O., Kirton, J.P., Kielty, C.M. et Walker, M.G. (2008) The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 17(2): 98-102.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)* 279(5350): 509-514.
- Hansson, L., Lindholm, L.H., Niskanen, L., Lanke, J., Hedner, T., Niklason, A., Luomanmaki, K., Dahlof, B., de Faire, U., Morlin, C., Karlberg, B.E., Wester, P.O. et Bjorck, J.E. (1999) Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 353(9153): 611-616.
- Hartshorne, D.J., Ito, M. et Erdodi, F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *Journal of muscle research and cell motility* 19(4): 325-341.
- Hayreh, SS. (1996) Duke-elder lecture. Systemic arterial blood pressure and the eye. *Eye (Lond)*, 10 (Pt 1), Pt 1, 5-28.
- Hemmings, B.A. et Restuccia, D.F. (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(9): a011189.
- Hill, M.A., Sun, Z., Martinez-Lemus, L. et Meininger, G.A. (2007) New technologies for dissecting the arteriolar myogenic response. *Trends in pharmacological sciences* 28(7): 308-315.
- Holle, A.W. et Engler, A.J. (2010) Cell rheology: Stressed-out stem cells. *Nature materials* 9(1): 4-6.
- Holmes, C.L., Landry, D.W. et Granton, J.T. (2004) Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Critical care (London, England)* 8(1): 15-23.

- Hong, F., Haldeman, B.D., Jackson, D., Carter, M., Baker, J.E. et Cremonese, C.R. (2011) Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 510(2): 135-146.
- Horiuchi, S., Sakamoto, Y. et Sakai, M. (2003) Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino acids* 25(3-4): 283-292.
- Hu, X. et Lazar, M.A. (2000) Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 11(1): 6-10.
- Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A. et Fishman, M.C. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377(6546): 239-242.
- Hunton, D.L., Barnes, W.G., Kim, J., Violin, Xiu-Rong Ren and Jonathan D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D.D. et Lefkowitz, R.J. (2005) Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Molecular Pharmacology* 67(4): 1229-1236.
- Huttunen, H.J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A.J. et Rauvala, H. (2002) Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphotericin B inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer research* 62(16): 4805-4811.
- Huttunen, H.J., Fages, C. et Rauvala, H. (1999) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 274(28): 19919-19924.
- Ikebe, R., Reardon, S., Mitsui, T. et Ikebe, M. (1999) Role of the N-terminal region of the regulatory light chain in the dephosphorylation of myosin by myosin light chain phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 274(42): 30122-30126.
- Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H., Jinnouchi, Y., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S. et Horiuchi, S. (1996) N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry* 35(24): 8075-8083.
- Jesmin, J., Rashid, M.S., Jamil, H., Hontecillas, R. et Bassaganya-Riera, J. (2010) Gene regulatory network reveals oxidative stress as the underlying molecular mechanism of type 2 diabetes and hypertension. *BMC medical genomics* 345-8794-3-45. Epub 2010 Oct 13.
- Kim, S. et Iwao, H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological reviews* 52(1): 11-34.

- Kimes, B.W. et Brandt, B.L. (1976) Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Experimental cell research* 98(2): 349-366.
- Kislinger, T., Fu, C., Huber, B., Qu, W., Taguchi, A., Du Yan, S., Hofmann, M., Yan, S.F., Pischetsrieder, M., Stern, D. et Schmidt, A.M. (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *The Journal of biological chemistry* 274(44): 31740-31749.
- Kislinger, T., Tanji, N., Wendt, T., Qu, W., Lu, Y., Ferran, L.J., Jr, Taguchi, A., Olson, K., Bucciarelli, L., Goova, M., Hofmann, M.A., Cataldegirmen, G., D'Agati, V., Pischetsrieder, M., Stern, D.M. et Schmidt, A.M. (2001) Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21(6): 905-910.
- Kolodney, M.S., Thimban, M.S., Honda, H.M., Tsai, G. et Yee, H.F. (1999) Ca²⁺-independent myosin II phosphorylation and contraction in chicken embryo fibroblasts. *Journal of Physiology* 515 (Pt 1)87-92.
- Kolosova, I.A., Ma, S., Adyshev, D.M., Wang, P., Ohba, M., Natarajan, V. et Verin, Joe G N Garcia and Alexander D. (2004) Role of CPI-17 in the regulation of endothelial cytoskeleton. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 287(5): 970-980.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G. et Barak, L.S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(7): 3712-3717.
- Larsen, M., Arnaud, L., Hie, M., Parizot, C., Dorgham, K., Shoukry, M., Kemula, M., Barete, S., Derai, D., Sauce, D., Amoura, Z., Pene, J., Yssel, H. et Gorochoff, G. (2011) Multiparameter grouping delineates heterogeneous populations of human IL-17 and/or IL-22 T-cell producers that share antigen specificities with other T-cell subsets. *European journal of immunology* 41(9): 2596-2605.
- Le Clainche, C. et Carlier, M.F. (2008) Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews* 88(2): 489-513.
- Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R. et Prospective Studies Collaboration (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360(9349): 1903-1913.
- Liliensiek, B., Weigand, M.A., Bierhaus, A., Nicklas, W., Kasper, M., Hofer, S., Plachky, J., Grone, H.J., Kurschus, F.C., Schmidt, A.M., Yan, S.D., Martin, E., Schleicher, E.,

- Stern, D.M., Hammerling, G.G., Nawroth, P.P. et Arnold, B. (2004) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *The Journal of clinical investigation* 113(11): 1641-1650.
- Lincoln, T.M. (2007) Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions? *Circ Res* 100(1): 10-12.
- Liu, L., Abramowitz, J., Askari, A. et Allen, J.C. (2004) Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287(5): H2173-82.
- Lonn, E.M., Yusuf, S., Jha, P., Montague, T.J., Teo, K.K., Benedict, C.R. et Pitt, B. (1994) Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation* 90(4): 2056-2069.
- Lue, L.F., Walker, D.G., Jacobson, S. et Sabbagh, M. (2009) Receptor for advanced glycation end products: its role in Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Future neurology* 4(2): 167-177.
- Luttrell, L.M. et Gesty-Palmer, D. (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacological reviews* 62(2): 305-330.
- Lymperopoulos, A., Rengo, G., Zincarelli, C., Kim, J., Soltys, S. et Koch, W.J. (2009) An adrenal beta-arrestin 1-mediated signaling pathway underlies angiotensin II-induced aldosterone production in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(14): 5825-5830.
- MacDonald, J.A., Borman, M.A., Muranyi, A., Somlyo, A.V., Hartshorne, D.J. et Haystead, T.A. (2001) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(5): 2419-2424.
- Mack, C.P. (2011) Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31(7): 1495-1505.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. et Narumiya, S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science (New York, N.Y.)* 285(5429): 895-898.
- Matsumura, F. et Hartshorne, D.J. (2008) Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochemical and biophysical research communications* 369(1): 149-156.

- McCance, D.R., Dyer, D.G., Dunn, J.A., Bailie, K.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. et Lyons, T.J. (1993) Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 91(6): 2470-2478.
- Mehta, P.K. et Griendling, K.K. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology* 292(1): C82-97.
- Miano, J.M. (2010) Vascular smooth muscle cell differentiation-2010. *Journal of biomedical research* 24(3): 169-180.
- Migliore, M. et Shepherd, G.M. (2005) Opinion: an integrated approach to classifying neuronal phenotypes. *Nature reviews. Neuroscience* 6(10): 810-818.
- Miller, M.C., Tavares, R., Johanson, C.E., Hovanesian, V., Donahue, J.E., Gonzalez, L., Silverberg, G.D. et Stopa, E.G. (2008) Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain research* 1230273-280.
- Miyazaki, H., Hayashi, K. et Hasegawa, Y. (2003) Tensile properties of fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Biorheology* 40(1-3): 207-212.
- Moheimani, F., Morgan, P.E., van Reyk, D.M. et Davies, M.J. (2010) Deleterious effects of reactive aldehydes and glycated proteins on macrophage proteasomal function: possible links between diabetes and atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1802(6): 561-571.
- Muranyi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H.F. et Hartshorne, D.J. (2001) Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS letters* 493(2-3): 80-84.
- Navar, L.G. (2010) Counterpoint: Activation of the intrarenal renin-angiotensin system is the dominant contributor to systemic hypertension. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 109(6): 1998-2000; discussion 2015.
- Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D. et Shaw, A. (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry* 267(21): 14998-15004.
- Nguyen, N., Biet, M., Simard, E., Beliveau, E., Francoeur, N., Guillemette, G., Dumaine, R., Grandbois, M. et Boulay, G. (2013) STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca(2+) channel activity. *Biochimica et biophysica acta* 1833(6): 1294-1303.

- Niuro, N., Koga, Y. et Ikebe, M. (2003) Agonist-induced changes in the phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase and CPI17, two regulatory factors of myosin light chain phosphatase, in smooth muscle. *The Biochemical journal* 369(Pt 1): 117-128.
- Olson, E.S. et Dong, W. (2006) Nonlinearity in intracochlear pressure. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 68(6): 359-364.
- Orci, L., Gabbay, K.H. et Malaisse, W.J. (1972) Pancreatic beta-cell web: its possible role in insulin secretion. *Science (New York, N.Y.)* 175(4026): 1128-1130.
- Ostendorp, T., Leclerc, E., Galichet, A., Koch, M., Demling, N., Weigle, B., Heizmann, C.W., Kroneck, P.M. et Fritz, G. (2007) Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *The EMBO journal* 26(16): 3868-3878.
- Owens, G.K., Kumar, M.S. et Wamhoff, B.R. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews* 84(3): 767-801.
- Padwal, R.S., Hemmelgarn, B.R., McAlister, F.A., McKay, D.W., Grover, S., Wilson, T., Penner, B., Burgess, E., Bolli, P., Hill, M., Mahon, J., Myers, M.G., Abbott, C., Schiffrin, E.L., Honos, G., Mann, K., Tremblay, G., Milot, A., Cloutier, L., Chockalingam, A., Khan, N.A., Rabkin, S.W., Dawes, M., Touyz, R.M., Tobe, S.W. et Canadian Hypertension Education Program (2007) The 2007 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 1- blood pressure measurement, diagnosis and assessment of risk. *The Canadian journal of cardiology* 23(7): 529-538.
- Pandolfi, A., Grilli, A., Cilli, C., Patruno, A., Giaccari, A., Di Silvestre, S., De Lutiis, M.A., Pellegrini, G., Capani, F., Consoli, A. et Felaco, M. (2003) Phenotype modulation in cultures of vascular smooth muscle cells from diabetic rats: association with increased nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation. *Journal of cellular physiology* 196(2): 378-385.
- Park, J.K., Lee, S.O., Kim, Y.G., Kim, S.H., Koh, G.Y. et Cho, K.W. (2002) Role of rho-kinase activity in angiotensin II-induced contraction of rabbit clitoral cavernosum smooth muscle. *International Journal of Impotence Research* 14(6): 472-477.
- Park, L., Raman, K.G., Lee, K.J., Lu, Y., Ferran, L.J., Jr, Chow, W.S., Stern, D. et Schmidt, A.M. (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature medicine* 4(9): 1025-1031.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. et Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22(2): 153-183.

- Pelling, A.E., Sehati, S., Gralla, E.B. et Gimzewski, J.K. (2005) Time dependence of the frequency and amplitude of the local nanomechanical motion of yeast. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 1(2): 178-183.
- Pelling, A.E., Sehati, S., Gralla, E.B., Valentine, J.S. et Gimzewski, J.K. (2004) Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)* 305(5687): 1147-1150.
- Phung, O.J., Sood, N.A., Sill, B.E. et Coleman, C.I. (2011) Oral anti-diabetic drugs for the prevention of Type 2 diabetes. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 28(8): 948-964.
- Potier, M. et Trebak, M. (2008) New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 457(2): 405-415.
- Rajagopal, K., Whalen, E.J., Violin, J.D., Stiber, J.A., Rosenberg, P.B., Premont, R.T., Coffman, T.M., Rockman, H.A. et Lefkowitz, R.J. (2006) Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(44): 16284-16289.
- Rakesh, K., Yoo, B., Kim, I.M., Salazar, N., Kim, K.S. et Rockman, H.A. (2010) beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Science signaling* 3(125): ra46.
- Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R. et Roman-Roman, S. (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18(10): 1842-1853.
- Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L. et Enwemeka, C.S. (2002) Glycation-induced matrix stability in the rabbit achilles tendon. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 399(2): 174-180.
- Reddy, S., Bichler, J., Wells-Knecht, K.J., Thorpe, S.R. et Baynes, J.W. (1995) N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 34(34): 10872-10878.
- Ren, J., Albinsson, S. et Hellstrand, P. (2010) Distinct effects of voltage- and store-dependent calcium influx on stretch-induced differentiation and growth in vascular smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* 285(41): 31829-31839.
- Rensen, S.S., Doevendans, P.A. et van Eys, G.J. (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands heart journal:*

monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation 15(3): 100-108.

- Reynolds, P.R., Schmitt, R.E., Kasteler, S.D., Sturrock, A., Sanders, K., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., Paine, R., 3rd et Hoidal, J.R. (2010) Receptors for advanced glycation end-products targeting protect against hyperoxia-induced lung injury in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 42(5): 545-551.
- Roman, H.N., Zitouni, N.B., Kachmar, L., Benedetti, A., Sobieszek, A. et Lauzon, A.M. (2014) The role of caldesmon and its phosphorylation by ERK on the binding force of unphosphorylated myosin to actin. *Biochimica et biophysica acta* 1840(11): 3218-3225.
- Sabbagh, M.N., Agro, A., Bell, J., Aisen, P.S., Schweizer, E. et Galasko, D. (2011) PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 25(3): 206-212.
- Safar, M.E. et Lacolley, P. (2007) Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293(1): H1-7.
- Saiman, Y., Agarwal, R., Hickman, D.A., Fausther, M., El-Shamy, A., Dranoff, J.A., Friedman, S.L. et Bansal, M.B. (2013) CXCL12 induces hepatic stellate cell contraction through a calcium-independent pathway. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 305(5): G375-82.
- Sakaguchi, T., Yan, S.F., Yan, S.D., Belov, D., Rong, L.L., Sousa, M., Andrassy, M., Marso, S.P., Duda, S., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P.P., Stern, D.M., Schmidt, A.M. et Naka, Y. (2003) Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *The Journal of clinical investigation* 111(7): 959-972.
- Samarin, S.N., Ivanov, A.I., Flatau, G., Parkos, C.A. et Nusrat, A. (2007) Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Molecular biology of the cell* 18(9): 3429-3439.
- Schad, J.F., Meltzer, K.R., Hicks, M.R., Beutler, D.S., Cao, T.V. et Standley, P.R. (2011) Cyclic strain upregulates VEGF and attenuates proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vascular cell* 321-824X-3-21.
- Schmidt, A.M., Yan, S.D., Brett, J., Mora, R., Nowygrad, R. et Stern, D. (1993) Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *The Journal of clinical investigation* 91(5): 2155-2168.

- Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B. et Van Aelst, L. (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Experimental cell research* 261(1): 1-12.
- Shi, X.Z., Lindholm, P.F. et Sarna, S.K. (2003) NF-kappa B activation by oxidative stress and inflammation suppresses contractility in colonic circular smooth muscle cells. *Gastroenterology* 124(5): 1369-1380.
- Shoji, T., Koyama, H., Morioka, T., Tanaka, S., Kizu, A., Motoyama, K., Mori, K., Fukumoto, S., Shioi, A., Shimogaito, N., Takeuchi, M., Yamamoto, Y., Yonekura, H., Yamamoto, H. et Nishizawa, Y. (2006) Receptor for advanced glycation end products is involved in impaired angiogenic response in diabetes. *Diabetes* 55(8): 2245-2255.
- Shroff, S.G., Saner, D.R. et Lal, R. (1995) Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *The American Journal of Physiology* 269(1 Pt 1): C286-92.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. et Brown, K. (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annual Review of Cell Biology* 10:405-455.
- Simard, E., Kovacs, J.J., Miller, W.E., Kim, J., Grandbois, M. et Lefkowitz, R.J. (2013) beta-Arrestin regulation of myosin light chain phosphorylation promotes AT1aR-mediated cell contraction and migration. *PLoS one* 8(11): e80532.
- Simmons, M.A. (2005) Functional selectivity, ligand-directed trafficking, conformation-specific agonism: what's in a name? *Molecular interventions* 5(3): 154-157.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T. et Beilin, L. (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44(2): 129-146.
- Song, X., Gurevich, E.V. et Gurevich, V.V. (2007) Cone arrestin binding to JNK3 and Mdm2: conformational preference and localization of interaction sites. *Journal of neurochemistry* 103(3): 1053-1062.
- Song, X., Raman, D., Gurevich, E.V., Vishnivetskiy, S.A. et Gurevich, V.V. (2006) Visual and both non-visual arrestins in their "inactive" conformation bind JNK3 and Mdm2 and relocalize them from the nucleus to the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 281(30): 21491-21499.
- Statistics Canada - Government of Canada (2014-10-29). Blood pressure of adults, 2012 to 2013. In *Health Fact Sheets*, [En ligne]. <http://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2014001/article/14101-eng.htm> (Page consultée le 03/04 2015).
- Staus, D.P., Weise-Cross, L., Mangum, K.D., Medlin, M.D., Mangiante, L., Taylor, J.M. et Mack, C.P. (2014) Nuclear RhoA signaling regulates MRTF-dependent SMC-

specific transcription. *American journal of physiology.Heart and circulatory physiology* 307(3): H379-90.

- Strigrow, F. et Ehrlich, B.E. (1996) Ligand-gated calcium channels inside and out. *Current opinion in cell biology* 8(4): 490-495.
- Suga, T., Iso, T., Shimizu, T., Tanaka, T., Yamagishi, S., Takeuchi, M., Imaizumi, T. et Kurabayashi, M. (2011) Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 18(8): 670-683.
- Sul, J.Y., Wu, C.W., Zeng, F., Jochems, J., Lee, M.T., Kim, T.K., Peritz, T., Buckley, P., Cappelleri, D.J., Maronski, M., Kim, M., Kumar, V., Meaney, D., Kim, J. et Eberwine, J. (2009) Transcriptome transfer produces a predictable cellular phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(18): 7624-7629.
- Sumpio, B.E., Riley, J.T. et Dardik, A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34(12): 1508-1512.
- Swaminathan, V., Mythreye, K., O'Brien, E.T., Berchuck, A., Blobel, G.C. et Superfine, R. (2011) Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer research* 71(15): 5075-5080.
- Taguchi, A., Blood, D.C., del Toro, G., Canet, A., Lee, D.C., Qu, W., Tanji, N., Lu, Y., Lalla, E., Fu, C., Hofmann, M.A., Kislinger, T., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D.M. et Schmidt, A.M. (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405(6784): 354-360.
- Takeuchi, M., Makita, Z., Bucala, R., Suzuki, T., Koike, T. et Kameda, Y. (2000) Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 6(2): 114-125.
- Takizawa, N., Koga, Y. et Ikebe, M. (2002) Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 297(4): 773-778.
- Tamura, M., Nakayama, T., Sato, I., Sato, N., Izawa, N., Hishiki, M., Mizutani, Y., Furuya, K. et Yamamoto, T. (2008) Haplotype-based case-control study of estrogen receptor alpha (ESR1) gene and pregnancy-induced hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 31(2): 221-228.

- Tang, D.D. et Anfinogenova, Y. (2008) Physiologic properties and regulation of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 13(2): 130-140.
- Tang, K.M., Wang, G.R., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y. et Mendelsohn, M.E. (2003) Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature medicine* 9(12): 1506-1512.
- Thatcher, S.E. et Marshall University (2007). *MLCK/actin Interaction in the Contracting A7r5 Cell and Vascular Smooth Muscle*. Marshall University,
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 329(14): 977-986.
- Tsai, M.H. et Jiang, M.J. (2006) Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453(2): 223-232.
- Ulrich, P. et Zhang, X. (1997) Pharmacological reversal of advanced glycation end-product-mediated protein crosslinking. *Diabetologia* 40 Suppl 2S157-9.
- Unbekandt, M. et Olson, M.F. (2014) The actin-myosin regulatory MRCK kinases: regulation, biological functions and associations with human cancer. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 92(3): 217-225.
- Urena, J., Fernandez-Tenorio, M., Porrás-Gonzalez, C., Gonzalez-Rodriguez, P., Castellano, A. et Lopez-Barneo, J. (2013) A new metabotropic role for L-type Ca(2+) channels in vascular smooth muscle contraction. *Current vascular pharmacology* 11(4): 490-496.
- Valencia, J.V., Weldon, S.C., Quinn, D., Kiers, G.H., DeGroot, J., TeKoppele, J.M. et Hughes, T.E. (2004) Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry* 324(1): 68-78.
- Valero, C., Javierre, E., Garcia-Aznar, J.M. et Gomez-Benito, M.J. (2014) A cell-regulatory mechanism involving feedback between contraction and tissue formation guides wound healing progression. *PLoS one* 9(3): e92774.
- Van Citters, K.M., Hoffman, B.D., Massiera, G. et Crocker, J.C. (2006) The role of F-actin and myosin in epithelial cell rheology. *Biophysical journal* 91(10): 3946-3956.

- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S. et Horwitz, A.R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(11): 778-790.
- Vijan, S. (2010) Type 2 diabetes. *Annals of Internal Medicine* 152(5): ITC31-15; quiz ITC316.
- Violin, J.D., Soergel, D.G. et Lark, M.W. (2013) Beta-arrestin-biased ligands at the AT1R: a novel approach to the treatment of acute heart failure. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 9(4): e149-e154.
- Wang, J., Liu, H., Chen, B., Li, Q., Huang, X., Wang, L., Guo, X. et Huang, Q. (2012) RhoA/ROCK-dependent moesin phosphorylation regulates AGE-induced endothelial cellular response. *Cardiovascular diabetology* 117.
- Wang, Z., Wang, D.Z., Pipes, G.C. et Olson, E.N. (2003) Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12): 7129-7134.
- Webb, R.C. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education* 27(1-4): 201-206.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M. et Lefkowitz, R.J. (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19): 10782-10787.
- Wei, H., Ahn, S., Barnes, W.G. et Lefkowitz, R.J. (2004) Stable interaction between beta-arrestin 2 and angiotensin type 1A receptor is required for beta-arrestin 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry* 279(46): 48255-48261.
- Wendt, T.M., Tanji, N., Guo, J., Kislinger, T.R., Qu, W., Lu, Y., Bucciarelli, L.G., Rong, L.L., Moser, B., Markowitz, G.S., Stein, G., Bierhaus, A., Liliensiek, B., Arnold, B., Nawroth, P.P., Stern, D.M., D'Agati, V.D. et Schmidt, A.M. (2003) RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *The American journal of pathology* 162(4): 1123-1137.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E.M., Ocalan, M., Farrell, C. et Risau, W. (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of cell science* 107 (Pt 5): 1347-1357.

- Xi, X.P., Graf, K., Goetze, S., Fleck, E., Hsueh, W.A. et Law, R.E. (1999) Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19(1): 73-82.
- Xiao, K., McClatchy, D.B., Shukla, A.K., Chen, Y.Z.a.M., Shenoy, S.K., Yates, J.R. et Lefkowitz, R.J. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(29): 12011-12016.
- Xie, C., Ritchie, R.P., Huang, H., Zhang, J. et Chen, Y.E. (2011) Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31(7): 1485-1494.
- Xie, P., Fan, Y., Zhang, H., Zhang, Y., She, M., Gu, D., Patterson, C. et Li, H. (2009) CHIP represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation via ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology* 29(9): 2398-2408.
- Yamamoto, Y. et Yamamoto, H. (2013) RAGE-Mediated Inflammation, Type 2 Diabetes, and Diabetic Vascular Complication. *Frontiers in endocrinology* 4105.
- Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D. et Stern, D. (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 269(13): 9889-9897.
- Yan, S.F., Ramasamy, R., Naka, Y. et Schmidt, A.M. (2003) Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circulation research* 93(12): 1159-1169.
- Yan, S.F., Ramasamy, R. et Schmidt, A.M. (2010) The RAGE Axis: A Fundamental Mechanism Signaling Danger to the Vulnerable Vasculature. *Circulation research* 106(5): 842-853.
- Ye, G.J., Aratyn-Schaus, Y., Nesmith, A.P., Pasqualini, F.S., Alford, P.W. et Parker, K.K. (2014) The contractile strength of vascular smooth muscle myocytes is shape dependent. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* 6(2): 152-163.
- Zhang, L., Bukulin, M., Kojro, E., Roth, A., Metz, V.V., Fahrenholz, F., Nawroth, P.P., Bierhaus, A. et Postina, R. (2008) Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 283(51): 35507-35516.

Zhang, P.C., Keleshian, A.M. et Sachs, F. (2001) Voltage-induced membrane movement. *Nature* 413(6854): 428-432.

Zhang, X., Meng, H. et Wang, M.M. (2013) Collagen represses canonical Notch signaling and binds to Notch ectodomain. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45(7): 1274-1280.

Zieman, S.J., Melenovsky, V. et Kass, D.A. (2005) Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25(5): 932-943.