



**HAL**  
open science

# Rôle des phosphodiesterases dans la compartimentation subcellulaire de l'AMPc dans la cellule musculaire lisse vasculaire : étude des altérations dans l'insuffisance cardiaque

Fabien Hubert

► **To cite this version:**

Fabien Hubert. Rôle des phosphodiesterases dans la compartimentation subcellulaire de l'AMPc dans la cellule musculaire lisse vasculaire : étude des altérations dans l'insuffisance cardiaque. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114861 . tel-00868792

**HAL Id: tel-00868792**

**<https://theses.hal.science/tel-00868792>**

Submitted on 2 Oct 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE PARIS-SUD

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ÉCOLE DOCTORALE 425 :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

*PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE*

**DISCIPLINE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**

ANNÉE : 2011-2012

SÉRIE DOCTORAT N° : 1201

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 17 Décembre 2012

par

**Fabien HUBERT**

### **Rôle des phosphodiésterases dans la compartimentation subcellulaire de l'AMPC dans la cellule musculaire lisse vasculaire : étude des altérations dans l'insuffisance cardiaque**

<b><u>Directeur de thèse :</u></b>	Véronique LEBLAIS	Professeur des Universités (Université Paris-Sud, France)
<b><u>Composition du jury :</u></b>		
<i>Président du jury :</i>	Jean-Louis PAUL	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier Université Paris-Sud, France)
<i>Rapporteurs :</i>	Chantal GAUTHIER	Professeur des Universités (Université de Nantes, France)
	Anne-Marie LOMPRES	DR Inserm (Université Pierre et Marie Curie, Paris, France)
<i>Examineurs :</i>	Donald H. MAURICE	Professeur (Queen's University, Kingston, Canada)
	Rodolphe FISCHMEISTER	DR Inserm (Université Paris-Sud, France)
	Véronique LEBLAIS	Professeur des Universités (Université Paris-Sud, France)

## Remerciements

*Cette thèse est le fruit d'un travail auquel de nombreuses personnes ont participé par le biais de riches discussions et réflexions scientifiques, d'aides techniques et administratives ou bien seulement par leur présence et leur soutien moral. Ainsi je souhaite remercier tout le monde en espérant n'oublier personne (Si par malheur je vous avais oublié, n'hésitez pas à me contacter pour que je rétablisse cet oubli impardonnable).*

*Tout d'abord je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance aux membres du jury : le Pr. Chantal Gauthier et le Dr. Anne-Marie Lompré de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse et de l'avoir jugée, le Pr. Jean-Louis Paul et le Dr. Donald H. Maurice pour avoir accepté de participer au jury et d'examiner mon travail.*

*Ces trois années de thèse sont passées à la vitesse de la lumière et ont été des plus agréables grâce à l'ambiance générale qui règne dans ce laboratoire dont la qualité scientifique n'est plus à démontrer. Je tiens donc à remercier Rodolphe Fischmeister de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire qu'il dirige d'une main de maître grâce à sa passion contagieuse de la recherche et à ses grandes qualités humaines. Tes nombreuses réflexions scientifiques, le partage de ton expérience et ton regard avisé sur mon travail m'ont été très enrichissants.*

*Sans directeur de thèse, le thésard n'est rien ! Ainsi, j'exprime mes plus sincères remerciements à Véronique Leblais auprès de qui j'ai beaucoup appris. Cela a été un honneur de faire partie de la team « Véro les bon tuyaux » qui a de beaux jours devant elle. Je n'aurai pu espérer meilleur chef pour m'accompagner lors de ce périple. Ton expérience et ta rigueur scientifiques, ton organisation sans faille, ta disponibilité, ta bonne humeur, ta patience, tes qualités didactiques et pédagogiques (j'en oublie sûrement) m'ont permis d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions. J'ai également beaucoup apprécié la liberté et l'autonomie que tu m'as accordée ainsi que ta compréhension et ton soutien au cours des moments difficiles que j'ai pu rencontrer.*

*La force de ce laboratoire est la richesse scientifique, la disponibilité des membres qui le constitue, ce qui crée un contexte propice aux échanges, idéal pour la recherche. Je remercie les chercheurs de l'équipe 2 pour les nombreuses discussions scientifiques (ou autres) endiablées et très instructives : Grégoire Vandecasteele (je t'attends toujours pour la revanche au badminton), Jérôme Leroy, Bertrand Crozatier, Boris Manoury (le sheriff du labo), Vincent Algalarrondo (n'oublie pas de me prévenir lors de la première de ton one man show) et Catherine Brenner.*

*Je tiens également à remercier les personnes qui m'ont initié aux différentes techniques : Dominique Fortin alias « Dom » (merci de m'avoir accueilli les bras ouverts dans ta salle pour les ARN), Audrey Varin (pour les Western-blot), Valérie Nicolas (pour la microscopie confocale), Claudine Deloménie (pour la PCR). Je remercie plus particulièrement Valérie Domergue-Dupont pour les opérations de sténose aortique et Philippe Matéo, le roi de l'échocardiographie.*

*Je remercie le « Steve Jobs » du labo, notre magicien du PC devenu patcheur professionnel, le bien nommé « Patricko », la reine de la dissoc' « Flo », « Sophy » la déesse du courrier et de l'autoclave et sans oublier Françoise, le couteau suisse de l'unité, la maman des doctorants sans qui la vie au labo serait beaucoup plus difficile.*

*La thèse m'a permis de rencontrer des « gens » extraordinaires (non, je n'en fais pas trop...) qui ont fait de ces trois dernières années, une expérience unique, marquée de nombreux instants mémorables (cf. cahier rouge !). Je remercie donc en premier lieu, les membres du « Burex » : les plus belles filles de Châtenay, Hindouda et Zeinouba (auteurs, compositeurs, metteurs en scène, actrices, chanteuses, danseuses...des comédies musicales du labo), Vinc' le cardiologue, Peng (champion du monde (enfin...de l'U769) de badminton et compatriote Poitevin) et Aziz l'Amarocain. Mais bien sûr, je n'oublie pas les autres qui ont participé à créer cet atmosphère de travail si plaisant qui règne à l'UUUUUU 769 : Jéjé (le chamois niortais ceinture noire de guitare), Delphina (mon pote de soirées foot et première voisine de bureau, qui aura marquée mes débuts au labo par sa bonne humeur communicative), Kui (qui m'a tout appris, mais en chinois...), Fanny (la photographe officielle du labo), Alex (surfeur à la perche), Mattiou (ambassadeur de l'accent Toulousaing' à Montreal), Milia (el phenomeno) et Giada (qui fait le meilleuuur Tiramisu du Monde !). L'ensemble des membres du laboratoire a participé à sa façon à mon travail et au bon déroulement de ma thèse, ainsi je souhaite remercier Renée, Anne, Volodia, Fred, Christophe, Anna-Maria, Jean-Pierre, Eric, Lagezz, Claire, Rana, Cristina, Cindy, Gregory, Maryline, Cécile, Eléonore, Gaëlle, Marianne, Alejandro, Ana, Sacha sans oublier nos expatriés Toulousains, Franck, Anne-Co, Alex et les Magalies.*

*Je remercie également mes amis Charentais (Toin', Dodo, le Kinder surprise, Vinc', Didou, Fred, Zav', Luccie, Lelex, Elo et le petit chouinon) qui ont toujours été présents malgré l'éloignement géographique.*

*Je souhaite remercier et exprimer toute ma reconnaissance à ma famille qui m'a toujours soutenue dans mes choix et aider à réaliser mes projets. Merci à ma maman pour tout, à mon frère Jérémy, à Maryline pour ton soutien, à Claude et Didier pour votre aide. Je remercie tout particulièrement mon papa pour m'avoir montré la voie à suivre et sans qui je n'en serais pas ici aujourd'hui. Merci du fond du cœur pour tout, ce travail est aussi le tien.*

*Je termine ces remerciements en rendant hommage à Morgane qui m'a supporté au quotidien (ce qui n'est pas une tâche facile, surtout en fin de thèse) et qui, par sa présence et son soutien sans faille, a grandement contribué à ce travail.*

## Liste des figures

**Figure 1** : Schéma de la circulation sanguine.

**Figure 2** : Représentation schématique de la structure d'une artère.

**Figure 3** : Caractéristiques ultra-structurelles des CMLs contractiles et synthétiques.

**Figure 4** : Représentation schématique des niveaux d'expression des gènes associés à un phénotype particulier des CMLs.

**Figure 5** : Facteurs impliqués dans le développement, la différenciation et la modulation phénotypique des CMLVs.

**Figure 6** : Représentation du mécanisme de contraction des CMLs.

**Figure 7** : Mécanismes de contrôle des concentrations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les CMLs.

**Figure 8** : Régulation de la concentration en calcium intracellulaire et de la contraction des CMLs.

**Figure 9** : Représentation schématique du canal calcique de type L.

**Figure 10** : Biosynthèse du NO.

**Figure 11** : Représentation schématique de la structure des NOS.

**Figure 12** : Cibles intracellulaire de la voie NO/CMPc favorisant la relaxation de la CML.

**Figure 13** : Métabolisme de l'acide arachidonique en prostanoïdes.

**Figure 14** : Couplage des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques aux protéines G hétérotrimériques.

**Figure 15** : Représentation schématique de la désensibilisation et de la resensibilisation d'un RCPG après activation par l'agoniste

**Figure 16** : Structure schématique des adénylates cyclases.

**Figure 17** : Représentation schématique de la PKA et de son activation.

**Figure 18** : Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines Epac.

**Figure 19** : Mécanisme d'hydrolyse des nucléotides cycliques par les phosphodiesterases.

**Figure 20** : Structure schématique des 11 familles de phosphodiesterases.

**Figure 21** : Structure de la PDE1 et mécanisme d'activation par  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ .

**Figure 22** : Structure des isoformes de PDE3.

**Figure 23** : Structure des isoformes de PDE4.

**Figure 24** : Les conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une YFP).

**Figure 25** : Représentation du phénomène de FRET de la sonde Epac.

**Figure 26** : Protocoles de stimulation utilisés lors des expériences de FRET.

**Figure 27** : Paramètres cinétiques des signaux AMPc en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique transitoire.

**Figure 28** : Représentation du système de cuves à organe isolé.

**Figure 29** : Représentation du système de myographie.

**Figure 30** : Quantification des produits de PCR par mesure de fluorescence du SYBR Green.

**Figure 31** : Quantification du gène de référence RPL32 en utilisant une gamme étalon.

**Figure 32** : Schémas récapitulatifs de l'implication des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs et du rôle des PDEs dans la compartimentation intracellulaire de l'AMPc dans les CMLVs en culture.

**Figure 33** : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPc dans le contrôle du tonus contractile basal dans les aortes de rats SHAM et IC.

**Figure 34** : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPc dans le contrôle du tonus contractile des artères mésentériques de rats SHAM et IC.

**Figure 35** : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPc dans le contrôle de la réponse relaxante  $\beta$ -adrénergique dans les aortes de rats SHAM et IC.

## Liste des tables

**Table 1** : Caractéristiques des vaisseaux sanguins chez l'Homme.

**Table 2** : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et leur concentration.

**Table 3** : Composition de la solution de Ringer utilisée lors des expériences de FRET.

**Table 4** : Composition des solutions utilisées lors des expériences de réactivité vasculaire.

**Table 5** : Caractéristiques des amorces utilisées et conditions de PCR en temps réel.

## Résumé

L'objectif de mon travail de thèse était d'une part, de mieux comprendre le rôle des différentes familles de phosphodiésterases (PDEs) dans la régulation de la signalisation dépendante de l'AMPc (PDE-AMPc) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), et d'autre part, d'évaluer leur implication fonctionnelle dans la réactivité vasculaire et leur altération potentielle dans un modèle physiopathologique, l'insuffisance cardiaque (IC). Mon travail s'est articulé autour de deux modèles de muscle lisse vasculaire :

(1) des CMLVs isolées en culture ayant acquis un phénotype synthétique sur lesquelles une approche d'imagerie en temps réel (FRET : Transfert d'Énergie de Fluorescence par Résonance) a été appliquée afin de visualiser *in situ* la dynamique spatiotemporelle des signaux dépendants de l'AMPc. Nos résultats indiquent que, dans ces cellules, l'augmentation des niveaux d'AMPc provoquée par la stimulation  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -AR) implique différents récepteurs suivant le compartiment intracellulaire considéré ( $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs dans le cytosol et seulement  $\beta_2$ -ARs dans le compartiment sous-membranaire). Nous avons par ailleurs observé que l'expression des ARNm des différentes isoformes de PDE-AMPc et la contribution fonctionnelle de ces enzymes dans la régulation des signaux AMPc intracellulaires étaient dépendantes de la densité des CMLVs en culture.

(2) des anneaux d'artères intactes issues de deux lits vasculaires différents (aorte et artère mésentérique) isolées à partir de rats sains et IC, permettant d'étudier leur fonction contractile et donc la régulation de celle-ci par la voie de l'AMPc. Nous avons montré que les familles de PDE-AMPc contribuent de façon différente au contrôle du tonus vasculaire dans l'aorte thoracique (PDE3 = PDE4 sans participation de la PDE2) et dans l'artère mésentérique (PDE4 > PDE2 sans participation de la PDE3), l'endothélium exerçant un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de ces PDEs musculaires lisses, notamment par le biais de la production de NO. Nous avons également mis en évidence des altérations de la réactivité vasculaire, et notamment de son contrôle par la voie de l'AMPc/PDE, dans notre modèle de rat IC. Dans l'aorte, la dysfonction endothéliale liée à l'altération de la voie du NO est à l'origine d'une augmentation de l'activité PDE3 masquant l'activité PDE4 et la relaxation  $\beta$ -adrénergique. Dans l'artère mésentérique des rats IC, dont la fonction endothéliale apparaît préservée, les PDE2, 3 et 4 restent fonctionnelles.

L'ensemble de nos travaux souligne le rôle essentiel des PDEs dans la régulation de la signalisation AMPc vasculaire, et montre que l'activité et la fonction des différentes familles de PDE-AMPc sont finement modulées par de nombreux paramètres (phénotype et densité cellulaire des CMLVs) ou situations physio-pathologiques (nature du lit vasculaire, présence de l'endothélium, situation d'IC).

**Mots clés** : Phosphodiésterases, AMPc, muscle lisse vasculaire, insuffisance cardiaque



## Abstract

The aim of my thesis was to investigate the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases (cAMP-PDEs) in the regulation of cAMP-dependent signaling in vascular smooth muscle cells (VSMCs), and to assess their functional involvement in vascular reactivity and their potential alteration in a pathophysiological model of heart failure (HF). My work was based on two models of vascular smooth muscle:

(1) Isolated VSMCs in culture having acquired a synthetic phenotype, in which an approach of real-time imaging (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) was applied *in situ* to visualize the spatiotemporal dynamics of cAMP-dependent signals. Our results indicate that, in these cells, increased levels of cAMP induced by  $\beta$ -adrenergic stimulation ( $\beta$ -AR) involve different  $\beta$ -ARs subtypes according to the intracellular compartment considered ( $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs in the cytosol and only  $\beta_2$ -ARs in the submembrane compartment). We also observed that the mRNA expression of cAMP-PDEs isoforms and the functional contribution of these enzymes in the regulation of intracellular cAMP signals were dependent on the VSMCs seeding density in culture.

(2) Arterial blood vessels from two different vascular beds (aorta and mesenteric artery) isolated from healthy and HF rats, to study their contractile function and thus the regulation by the cAMP pathway. We showed that cAMP-PDE families contribute differently to the control of vascular tone in the thoracic aorta (PDE3 = PDE4, no PDE2) and mesenteric artery (PDE4 > PDE2, no PDE3), endothelium exerting a crucial role in the regulation of their functional activities, especially through the production of nitric oxide (NO). We also demonstrated alterations in vascular reactivity during HF, including its control through the cAMP-PDEs. In the aorta, endothelial dysfunction associated with the alteration of the NO pathway leads to an increase in PDE3 activity which masks PDE4 activity and  $\beta$ -AR relaxation. In mesenteric artery from HF rats, endothelial function is preserved and PDE2, 3 and 4 are functional.

This study underlines the importance of PDEs in regulating vascular cAMP signaling, and shows that the activity and function of different cAMP-PDE families are tightly modulated by many parameters (VSMCs phenotype and seeding density) and/or physiopathological situations (vascular bed, endothelium and HF).

**Keywords:** phosphodiesterases, cAMP, vascular smooth muscle, heart failure

<b>PREAMBULE .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>I. Structure et fonction du système vasculaire .....</b>	<b>9</b>
<b>I.A. Généralités.....</b>	<b>9</b>
<b>I.B. Structure de la paroi vasculaire .....</b>	<b>13</b>
<b>I.B.1. L'intima.....</b>	<b>13</b>
<b>I.B.2. La média.....</b>	<b>14</b>
<b>I.B.3. L'adventice.....</b>	<b>14</b>
<b>I.B.4. Innervation.....</b>	<b>15</b>
<b>I.C. La cellule musculaire lisse.....</b>	<b>16</b>
<b>I.C.1. Généralités .....</b>	<b>16</b>
<b>I.C.2. Caractéristiques phénotypiques des CMLs .....</b>	<b>17</b>
<b>I.C.3. Modifications phénotypique des CMLVs.....</b>	<b>18</b>
<b>I.C.3.1. l'<math>\alpha</math>-actine du ML (SM-<math>\alpha</math>-actine).....</b>	<b>19</b>
<b>I.C.3.2. La chaîne lourde de myosine du ML (SM-MHC).....</b>	<b>20</b>
<b>I.C.3.3. La smootheline .....</b>	<b>21</b>
<b>I.C.3.4. La caldesmone .....</b>	<b>21</b>
<b>I.C.3.5. La calponine h1 .....</b>	<b>22</b>
<b>I.C.3.6. La matrice extracellulaire (MEC) .....</b>	<b>22</b>
<b>I.C.4. Facteurs de modulation phénotypique des CML .....</b>	<b>23</b>
<b>I.C.4.1. Modulation phénotypique par les facteurs solubles .....</b>	<b>24</b>
<b>I.C.4.2. Modulation phénotypique par la MEC.....</b>	<b>25</b>
<b>I.C.4.3. Modulation phénotypique par les facteurs mécaniques .....</b>	<b>26</b>
<b>I.C.4.4. Modulation phénotypique par les cellules endothéliales .....</b>	<b>28</b>
<b>I.D. Couplage excitation-contraction du ML vasculaire.....</b>	<b>29</b>
<b>I.D.1. Contraction de la CML par augmentation de la concentration intracellulaire de <math>Ca^{2+}</math> .....</b>	<b>32</b>
<b>I.D.1.1. Couplage électro-mécanique.....</b>	<b>34</b>
<b>I.D.1.2. Couplage pharmaco-mécanique .....</b>	<b>37</b>
<b>I.D.2. Sensibilisation-désensibilisation de l'appareil contractile .....</b>	<b>38</b>
<b>I.E. Contrôle du tonus vasculaire.....</b>	<b>40</b>
<b>I.E.1. Régulation neuro-hormonale du tonus vasculaire .....</b>	<b>41</b>
<b>I.E.1.1. Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux sympathique. 41</b>	
<b>I.E.1.2. Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux parasymphatique.....</b>	<b>43</b>
<b>I.E.1.3. Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux sensoriel.....</b>	<b>44</b>
<b>I.E.2. Influence de l'endothélium sur le tonus vasculaire .....</b>	<b>45</b>
<b>I.E.2.1. Les substances relaxantes dépendantes de l'endothélium (EDRF) .....</b>	<b>46</b>
<b>I.E.2.1.1. Le NO et la voie GMPc/PKG .....</b>	<b>46</b>

I.E.2.1.1.1. Le NO .....	47
I.E.2.1.1.2. Les NOS.....	48
I.E.2.1.1.3. Régulation de l'activité de la eNOS.....	49
I.E.2.1.1.4. Les cibles du NO .....	50
I.E.2.1.2. La prostacycline.....	52
I.E.2.1.3. Les substances hyperpolarisantes dépendantes de l'endothélium (EDHF) .....	53
I.E.2.2. Les substances contractantes dépendantes de l'endothélium (EDCF).56	
<b>II. Voie de l'AMPC dans le système vasculaire .....</b>	<b>59</b>
<b>II.A. Voie de synthèse de l'AMPC.....</b>	<b>59</b>
II.A.1. Les récepteurs $\beta$ -AR vasculaires .....	60
II.A.1.1. Structure et couplage des récepteurs $\beta$ -AR .....	60
II.A.1.2. Effets vasorelaxants $\beta$ -adrénergiques .....	62
II.A.1.3. Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	66
II.A.2. Les adénylates cyclases.....	67
<b>II.B. Les effecteurs de l'AMPC .....</b>	<b>71</b>
II.B.1. La protéine kinase A.....	71
II.B.2. Le facteur d'échange Epac.....	73
<b>II.C. La dégradation de l'AMPC par les PDEs .....</b>	<b>76</b>
II.C.1. Les PDEs de type 1 .....	79
II.C.1.1. Structure et régulation .....	79
II.C.1.2. Expression.....	80
II.C.1.3. Implication dans le tissu vasculaire.....	80
II.C.1.4. Inhibition pharmacologique.....	81
II.C.2. Les PDEs de type 2 .....	81
II.C.2.1. Structure et régulation .....	81
II.C.2.2. Expression et implication dans le tissu vasculaire .....	82
II.C.2.3. Inhibition pharmacologique.....	83
II.C.3. Les PDEs de type 3 .....	83
II.C.3.1. Structure et régulation .....	83
II.C.3.2. Expression.....	84
II.C.3.3. Implication dans le tissu vasculaire.....	85
II.C.3.4. Inhibition pharmacologique.....	87
II.C.4. Les PDEs de type 4 .....	88
II.C.4.1. Structure et régulation .....	88
II.C.4.2. Expression.....	88
II.C.4.3. Implication dans le tissu vasculaire.....	89
II.C.4.4. Inhibition pharmacologique.....	90
<b>II.D. L'efflux de l'AMPC par les MRP (Multidrug Resistance-associated Protein).....</b>	<b>91</b>

<b>III. Voie de signalisation de l'AMPC dans l'insuffisance cardiaque .....</b>	<b>93</b>
<b>III.A. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque.....</b>	<b>94</b>
<b>III.B. Altérations vasculaires associées à l'IC.....</b>	<b>95</b>
<b>III.C. Altération de la voie AMPC au cours de l'IC.....</b>	<b>97</b>
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>99</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>100</b>
<b>I. Modèles expérimentaux .....</b>	<b>100</b>
<b>I.A. Isolement et culture des CML d'aorte de rat .....</b>	<b>100</b>
<b>I.A.1. Dissociation des CML aortiques .....</b>	<b>100</b>
<b>I.A.2. Culture des CML aortiques.....</b>	<b>101</b>
<b>I.B. Modèle animal d'IC.....</b>	<b>101</b>
<b>I.B.1. Procédure chirurgicale .....</b>	<b>102</b>
<b>I.B.2. Evaluation échocardiographique et anatomique de l'IC.....</b>	<b>102</b>
<b>II. Agents pharmacologiques.....</b>	<b>104</b>
<b>III. Technique d'imagerie par FRET.....</b>	<b>104</b>
<b>III.A. Principe.....</b>	<b>104</b>
<b>III.B. Installation de FRET .....</b>	<b>106</b>
<b>III.C. Sondes FRET sensibles à l'AMPC .....</b>	<b>106</b>
<b>III.D. Expression des sondes FRET AMPC dans les CML.....</b>	<b>107</b>
<b>III.D.1. Infection adénovirale.....</b>	<b>107</b>
<b>III.D.2. Transfection plasmidique.....</b>	<b>108</b>
<b>III.E. Protocoles expérimentaux de FRET.....</b>	<b>108</b>
<b>III.F. Analyses des données de FRET .....</b>	<b>110</b>
<b>IV. Réactivité vasculaire .....</b>	<b>111</b>
<b>IV.A. Isolement des artères.....</b>	<b>111</b>
<b>IV.B. Mesures de la réactivité vasculaire .....</b>	<b>112</b>
<b>IV.B.1. Exploration fonctionnelle de l'aorte : Le système de cuves à organe isolé .....</b>	<b>112</b>
<b>IV.B.2. Exploration fonctionnelle des artères mésentériques : Le myographe de Mulvany .....</b>	<b>114</b>
<b>IV.C. Analyse des données de réactivité vasculaire.....</b>	<b>116</b>
<b>V. Dosage d'activité des PDE-AMPC.....</b>	<b>116</b>

V.A.	Principe.....	116
V.B.	Préparation des extraits protéiques.....	116
V.C.	Dosage des protéines.....	117
V.D.	Protocole de dosage d'activité PDE-AMPC.....	117
<b>VI.</b>	<b>Mesure du niveau d'expression génique par RT-PCR quantitative en temps réel.....</b>	<b>118</b>
VI.A.	Extraction et dosage des ARN totaux.....	118
VI.B.	PCR quantitative en temps réel .....	119
VI.B.1.	Transcription inverse (RT).....	121
VI.B.2.	Choix des amorces PCR.....	121
VI.B.3.	Protocole de PCR.....	123
VI.C.	Analyse des résultats .....	123
<b>RESULTATS</b>	<b>.....</b>	<b>125</b>
<b>Partie I: Rôle des PDEs dans la compartimentation intracellulaire de l'AMPC dans les CML vasculaires .....</b>	<b>.....</b>	<b>125</b>
I.	Introduction.....	125
II.	Résultats.....	127
II.A.	Article "β-adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells".....	127
II.B.	Rôle des sous-types de récepteurs β <sub>1</sub> - et β <sub>2</sub> -AR dans le signal AMPC sous-membranaire induit par une stimulation β-adrénérique dans les CML d'aorte de rat en culture .....	128
II.C.	Influence des conditions expérimentales sur la nature des signaux AMPC enregistrés dans les CML d'aorte de rat en culture .....	131
II.C.1.	Influence des conditions de culture cellulaire sur le signal AMPC cytosolique enregistré à l'aide de la sonde Epac2-camps dans les CML d'aorte de rat en culture.....	132
II.C.2.	Influence des conditions de culture cellulaire sur l'expression des ARNm codant pour les familles de PDE-AMPC dans les CML d'aorte de rat en culture .....	136
III.	Conclusions.....	137
<b>Partie II: Rôle des PDE-AMPC dans la réactivité vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque .....</b>	<b>.....</b>	<b>140</b>
I.	Introduction.....	140
II.	Résultats.....	142

II.A.	Altération de la fonction vasculaire de l'aorte au cours de l'IC : rôle des PDEs de type 3 et 4.....	142
II.B.	Altération de la fonction vasculaire dans l'artère mésentérique de rat au cours de l'IC : rôle des PDE-AMPC.....	143
II.B.1.	Activité PDE-AMPC dans les artères mésentériques de rats SHAM et IC .....	143
II.B.2.	Etude de la capacité contractile et de la fonction endothéliale des artères mésentériques de rats SHAM et IC .....	144
II.B.3.	Effet de l'inhibition des PDE-AMPC sur la réponse contractile au U46619 des artères mésentériques de rats SHAM et IC.....	147
II.B.4.	Effet des inhibiteurs de PDE-AMPC sur les artères mésentériques de rats SHAM et IC précontractées au U46619 .....	150
III.	Conclusions.....	152
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>154</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>		<b>178</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>179</b>

# **PREAMBULE**

L'ensemble de ce travail de thèse a permis d'élucider certains aspects de la voie de signalisation de l'AMPc dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) mais également son altération au niveau vasculaire dans un modèle intégré pathologique d'insuffisance cardiaque (IC). Dans le système cardiovasculaire, les artères jouent un rôle clé en régulant la distribution en sang oxygéné, nutriments et hormones aux tissus et organes. Les CMLVs de la media contrôlent les résistances vasculaires par des processus de contraction et de relaxation et de ce fait, influencent de nombreux paramètres physiologiques tels que le volume de sang acheminé aux différents tissus, ainsi que la pression sanguine. Les vaisseaux sanguins sains sont composés de CMLVs présentant un phénotype contractile (Pugsley & Tabrizchi, 2000). Dans cet état différencié, les CMLVs expriment un large répertoire de protéines impliquées dans le processus contractile (Owens *et al.*, 2004) et possèdent un faible taux de prolifération et de migration (Kocher *et al.*, 1991; Aikawa *et al.*, 1997). De manière similaire, dans des conditions physiologiques, les cellules endothéliales de l'intima ont un faible indice de prolifération et de migration et, dans ce contexte, exercent un contrôle fondamentale de la fonction vasculaire en libérant de nombreux facteurs qui régulent l'activité des CMLVs.

L'AMPc régule une grande variété de processus dans la plupart des cellules, notamment celles du système cardiovasculaire. Ainsi, ce second messager intracellulaire est un facteur anti-prolifératif et vasorelaxant majeur dans les myocytes vasculaires (Brophy *et al.*, 1997; Indolfi *et al.*, 1997; Morgado *et al.*, 2012). La diversité et la spécificité des fonctions de l'AMPc sont susceptibles d'être associées à des réponses spatio-temporelles différentes des nucléotides cycliques suivant la nature du stimulus et suivant l'organisation macromoléculaire intracellulaire. De nombreuses observations dans différents types cellulaires étayent l'hypothèse d'une compartimentation de l'AMPc qui a été largement étudiée dans les cellules cardiaques (Steinberg & Brunton, 2001). Ce concept repose sur une organisation très complexe des multiples composants de la voie AMPc qui permet de limiter la diffusion de ce second messager au niveau de structures intracellulaires spécifiques. La compartimentation du signal AMPc commence dès sa production par une localisation distincte des différents acteurs de sa synthèse comme les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les adénylates cyclase (ACs) dans des structures intracellulaires spécialisées (Ostrom *et al.*, 2000; Ostrom *et al.*, 2001; Nikolaev *et al.*, 2010). En plus de ces microdomaines intracellulaires qui créent une barrière physique limitant la diffusion de l'AMPc (Rich *et al.*, 2000), des protéines d'ancrage



(AKAP, A kinase anchoring protein) génèrent une organisation en complexes multiprotéiques des composants de la voie de signalisation de l'AMPc, augmentant ainsi l'efficacité et la spécificité de la cascade de transduction (Scott & Santana, 2010). Lors de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à un autre mécanisme essentiel de régulation de la fonction et de la compartimentation spatio-temporelle des signaux AMPc intracellulaires : Les acteurs clés de cet aspect sont les phosphodiésterases (PDEs) qui sont les seules enzymes capables d'hydrolyser les nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) en nucléotides inactifs et coordonnent ainsi les effets de ces seconds messagers en agissant en tant que tampon intracellulaire afin de limiter la diffusion et de créer des microdomaines dynamiques de l'AMPc. L'objectif de mon étude était de mieux comprendre le rôle des différentes isoformes de PDE dans la compartimentation intracellulaire de la signalisation dépendante de l'AMPc dans les CMLVs ainsi que leur implication fonctionnelle dans la réactivité vasculaire et son altération dans un modèle physiopathologique (IC). Ce projet de thèse, effectué au sein de l'unité INSERM UMR-S 769, s'inscrit dans la continuité des travaux du laboratoire et s'appuie sur l'expertise dans le domaine de la compartimentation de l'AMPc par les PDEs dans les cardiomyocytes et son rôle dans la régulation de la fonction du cœur, sain ou pathologique, développée dans l'équipe de signalisation et physiopathologie cardiaque dirigée par le Dr. Rodolphe Fischmeister (Fischmeister *et al.*, 2006; Abi-Gerges *et al.*, 2009; Mika *et al.*, 2012). Un nouvel axe de recherche dans le domaine vasculaire a été développé suite à l'arrivée de mon directeur de thèse, le Pr. Véronique Leblais, dans cette équipe en 2008. L'implication des PDEs dans la compartimentation du signal AMPc a été pour la première fois suggérée par une étude sur les myocytes vasculaires de grenouille au sein même du laboratoire (Jurevicius & Fischmeister, 1996). Il a été mis en évidence que les PDEs jouent un rôle crucial dans le contrôle de la diffusion de l'AMPc de la membrane plasmique vers le cytosol, et génèrent ainsi des microdomaines locaux d'AMPc impliqués dans la régulation  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -AR) du canal calcique de type L.

Ces dernières années, le laboratoire a développé de nouvelles techniques d'imagerie de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et d'électrophysiologie (canal CNG) qui ont permis d'étudier la signalisation de l'AMPc en temps réel dans des différents compartiments de la cellule cardiaque (Rochais *et al.*, 2004; Rochais *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2008; Abi-Gerges *et al.*, 2009; Leroy *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2012). Compte tenu de l'importance de la voie de l'AMPc dans la régulation de la fonction cardiaque, le laboratoire a

également explorer l'implication des PDEs dans l'altération de cette voie de signalisation au cours de l'hypertrophie (Abi-Gerges *et al.*, 2009). Bien que le rôle fondamental des PDEs dans la signalisation et la compartimentation de l'AMPC émerge principalement d'études dans les myocytes cardiaques, les PDEs sont aussi exprimées dans d'autres composants cellulaires du système cardiovasculaire, tels que les CMLVs, et des études récentes montrent qu'elles régulent des fonctions importantes dans ces cellules par des mécanismes similaires.

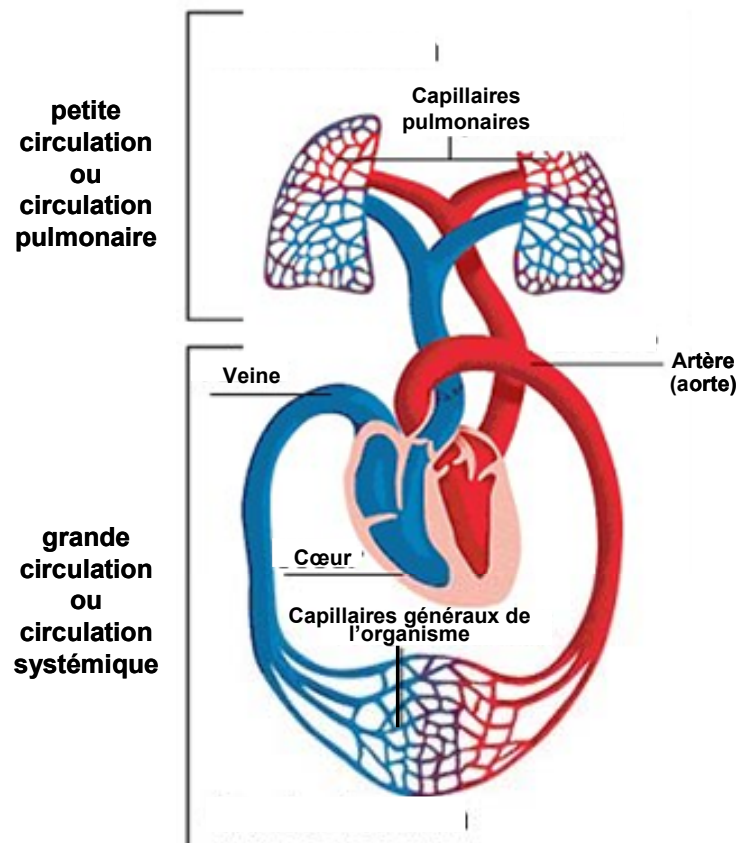
# INTRODUCTION

# I. Structure et fonction du système vasculaire

## I.A. Généralités

Le système cardiovasculaire joue un rôle prépondérant car il permet d’approvisionner les différents tissus et organes du corps en oxygène, en nutriments et en hormones contenus dans le sang. Il exerce également un rôle clé dans l’excrétion hors de l’organisme des déchets produits par les tissus. Ce système d’une haute complexité, est constitué d’une pompe centrale, le cœur et d’un réseau de distribution du sang, le système vasculaire.

De plus, le système cardiovasculaire joue un rôle de régulateur acido-basique au niveau respiratoire par le système tampon bicarbonate. Il intervient aussi dans la thermorégulation en transportant l’excès de chaleur jusqu’à la surface du corps. Il est un acteur clé du système immunitaire en acheminant les leucocytes jusqu’aux sites de blessures et d’infections ainsi qu’en participant à l’hémostase par la production de cellules plaquettaires.



**Figure 1** : Schéma de la circulation sanguine.

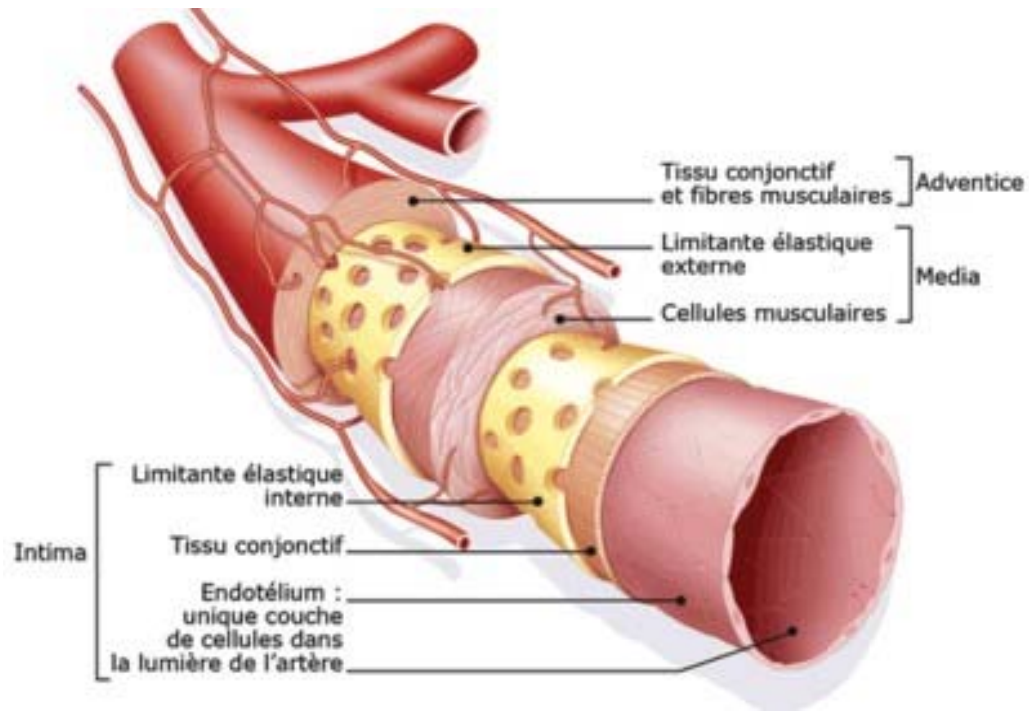
Le système vasculaire se divise en deux circulations sanguines parallèles (**Figure 1**) : La « petite circulation » ou circulation pulmonaire qui prend naissance à partir de l'artère pulmonaire au niveau du cœur droit, et qui se divise en deux artères pulmonaires gauche et droite. Lorsque le sang parcourt le réseau capillaire pulmonaire, il se charge de grandes quantités d'oxygène pour ensuite regagner le cœur gauche par les veines pulmonaires. Ce sang riche en oxygène intègre alors la « grande circulation » ou circulation systémique. Il est expulsé par le ventricule gauche dans l'aorte qui va ensuite se diviser en de nombreuses artères de plus petit calibre pour finalement irriguer les différents tissus de l'organisme sous forme de capillaires. Le retour du sang appauvri en oxygène est effectué grâce au système veineux composé de veinules qui se regroupent en veines de diamètre plus important pour enfin pénétrer dans le cœur droit par deux grosses veines : la veine cave supérieure qui est issue des membres supérieurs et la veine cave inférieure issue des membres inférieurs.

Les différents types de vaisseaux sanguins possèdent des caractéristiques propres à chacun selon leur fonction et leur taille. Les artères se classent en deux groupes : les artères élastiques ou de conductance et les artères musculaires ou de résistance. Les artères de conductance, de diamètre important, sont situées près du cœur (aorte et principales ramifications) et possèdent une faible résistance à l'écoulement. Elles sont dotées d'une élasticité importante qui va leur permettre d'amortir le débit discontinu pulsé du sang engendré par les battements du cœur. Lors de la systole, les artères élastiques se dilatent, formant ainsi un réservoir de pression. Le retour à leur étirement initial, après la fermeture des valves aortiques permet de maintenir un flux continu de sang à la périphérie y compris durant la diastole, en opposition au flux discontinu imposé par le travail du cœur. Les artères de résistance mettent plus à profit leurs propriétés vasoconstrictrices que les artères élastiques afin d'adapter leur débit aux besoins des organes. L'augmentation de résistance dans les artères musculaire amortit totalement la pression en amont, transformant ainsi la circulation artérielle pulsatile en circulation capillaire continue.

Selon la loi de Poiseuille :  $R=8l\eta/\pi r^4$  ( $\eta$  : la viscosité ;  $l$  : la longueur du vaisseau ;  $r$  : rayon du vaisseau) qui définit la résistance vasculaire à l'écoulement du sang ( $R$ ), les variations du rayon du vaisseau (élevé à la puissance 4 dans cette formule) ont un impact considérable sur la résistance vasculaire périphérique (RVP). Ce phénomène est très important au niveau des artères de résistance qui ont un petit diamètre et qui peuvent se dilater ou se contracter en réponse à de nombreux stimuli nerveux ou chimiques. La circulation du

sang et la perfusion tissulaire présentent un haut degré de variabilité temporelle qui n'est pas simplement attribuable aux fluctuations de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. Un important mécanisme contributif est l'activité rythmique contractile vasculaire qui est omniprésente dans les artérioles et les artères de résistance, et connue sous le nom de vasomotricité.

Afin de répondre aux besoins précis des divers organes et de maintenir une pression artérielle (PA) moyenne, il existe plusieurs mécanismes de régulation qui ciblent la vasomotricité. Les fibres musculaires lisses sont innervées par des neurofibres vasomotrices dont l'activité est coordonnée par le centre vasomoteur constitué de neurones sympathiques qui imposent aux artérioles une contraction basale appelée tonus vasomoteur. Des variations de PA peuvent induire des modifications du diamètre des vaisseaux suite à un réflexe déclenché par les barorécepteurs situés dans la paroi vasculaire. Une hypoxémie ou une acidose peuvent déclencher une vasoconstriction réflexe via les chimiorécepteurs dont les plus marquants sont ceux de la crosse aortique. De nombreux médiateurs hormonaux, tels que l'adrénaline, l'angiotensine II ou les peptides natriurétiques, modulent directement le tonus contractile vasculaire. L'endothélium vasculaire qui tapisse l'intérieur des vaisseaux et fait office d'interface entre le sang et le muscle lisse (ML), est source de nombreux médiateurs du tonus vasculaire. En effet, il joue un rôle central et essentiel dans le maintien de l'homéostasie vasculaire en libérant aussi bien des substances vasoconstrictrices (Endothelium-Derived Contractile Factors ou EDCFs) que vasorelaxantes (Endothelium-Derived Relaxing Factors ou EDRFs tels que le monoxyde d'azote ou NO) en réponse à des stimuli chimiques ou mécaniques. De nombreuses études ont exploré le déséquilibre entre les deux voies opposées de médiateurs dérivés de l'endothélium, en particulier le NO et les EDCFs, et le rôle de cette dysfonction endothéliale dans la genèse de pathologies vasculaires (Vanhoutte *et al.*, 2009).



**Figure 2** : Représentation schématique de la structure d'une artère.

	Diamètre de la lumière	Épaisseur de la paroi	CML	Composition de la média		Innervation
				Elastine	Type de Collagène	
<b>Artères élastiques</b>	1 à 2 cm	2 mm	+++	+++	I, III	+
<b>Artères musculaires</b>	1 mm à 1 cm	1 mm	+++	+	I, III	++
<b>Artérioles</b>	30 µm	20 µm	+	+/-	I, III	+++
<b>Capillaires</b>	5 à 8 µm	1 µm	0	0	IV, V	+/-
<b>Veinules post-capillaires</b>	20 µm	2 µm	0	+/-		+/-
<b>Veinules</b>	0,5 cm	0,5 cm	+	+/-		+
<b>Veines</b>	1 à 3 cm	1,5 cm	+	+/-		+

**Table 1** : Caractéristiques des vaisseaux sanguins chez l'Homme.

+/- : indique l'importance du constituant ; 0 : indique l'absence du constituant.

## **I.B. Structure de la paroi vasculaire**

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches, ou tuniques, morphologiquement distinctes entourant un espace central dans lequel circule le sang, la lumière. La paroi vasculaire est donc composée de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice (**Figure 2**). En fonction de la localisation et de la fonction des vaisseaux, la composition de ces trois tuniques est complexe et hautement structurée ou bien limitée à une simple monocouche de cellules (**Table 1**).

### **I.B.1. L'intima**

L'intima, ou tunique interne, est constituée exclusivement de cellules endothéliales reposant sur une fine couche de tissu conjonctif lâche externe. En absence de contraintes mécaniques, les cellules endothéliales sont de formes polygonales, mais lorsque le flux circulant impose des forces de cisaillement, elles deviennent allongées et orientent leur grand axe dans le sens du flux. Ce phénomène est notamment observé dans les artères de conductance où le flux est laminaire et les contraintes de cisaillement présentes (rapport longueur/largeur des cellules endothéliales d'environ 4). Les cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang circulant. La monocouche de cellules endothéliales n'est pas seulement une simple barrière de perméabilité entre les macromolécules du sang et les cellules musculaires lisses (CMLs) vasculaires, mais assure aussi un grand nombre de fonctions homéostatiques. Ainsi, les cellules endothéliales influencent le remodelage vasculaire par la production de substances pro- ou anti-prolifératives, modulent l'hémostase et la thrombose en sécrétant des agents pro- ou anti-coagulants et fibrinolytiques, régulent les réponses inflammatoires au moyen de l'expression de molécules chimiotactiques et d'adhérence à la surface de leur membrane, et enfin contrôlent le tonus vasculaire.

Ainsi, l'importance de l'endothélium a d'abord été mise en évidence par son effet sur le tonus vasculaire. En 1980, Furchgott et Zawadzski ont démontré la présence d'un EDRF qui fut par la suite identifié comme étant le NO (Furchgott & Zawadzki, 1980). D'autres facteurs vasorelaxant et vasoconstricteur ont depuis été démontrés comme pouvant être produits par l'endothélium (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Un équilibre essentiel entre les différents



facteurs dérivés de l'endothélium gouverne les fonctions hémodynamiques vasculaires et la prolifération cellulaire.

Cette capacité de l'endothélium à s'adapter aux conditions physiologiques le rend évidemment très sensible aux modifications pathologiques. Par conséquent, l'endothélium vasculaire est une cible privilégiée des facteurs de risque des pathologies vasculaires et les modifications qu'il subit en réponse à ces derniers sont regroupées sous le terme de dysfonction endothéliale.

Même si la structure de l'intima est conservée quelque soit le territoire vasculaire, les cellules endothéliales sont très hétérogènes du point de vue de leur phénotype selon l'arbre vasculaire et les organes impliqués (Aird, 2007). Les multiples rôles ainsi que la diversité de l'endothélium rendent la compréhension de sa physiologie et son implication physiopathologique très complexe et de ce fait, il serait pertinent de le considérer comme un système intégré à lui seul.

### **I.B.2. La média**

La média, appelée aussi tunique moyenne, est composée principalement de CMLs et de matrice extracellulaire (fibres élastiques, fibrilles d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène, protéoglycanes). La média est constituée de plusieurs feuillets élastiques concentriques liés entre eux par une couche de CMLs formant ainsi une unité lamellaire. Le nombre d'unités lamellaires est proportionnel au diamètre du vaisseau et cette organisation est propre aux artères élastiques, les artères musculaires ne présentant pas cette architecture. La média des artères musculaires est proportionnellement la plus épaisse de tous les vaisseaux, et contient plus de ML et moins de tissu élastique que celle des artères élastiques. Une limitante élastique interne et externe séparent la média respectivement de l'intima et de l'adventice.

### **I.B.3. L'adventice**

Aussi nommée tunique externe, l'adventice est une matrice conjonctive et adipeuse constituée essentiellement de fibroblastes et de quelques monocytes macrophages. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse des éléments constitutifs du tissu conjonctif dont

le collagène et la fibronectine. Par sa localisation externe, l'adventice protège et renforce les vaisseaux grâce à ses fibres de collagène lâchement entrelacées qui exercent aussi un rôle d'ancrage aux structures environnantes. Il est parcouru par de minuscules vaisseaux sanguins appelés *vasa vasorum*. Ils ont pour but d'approvisionner en oxygène et nutriments l'adventice ainsi que la partie externe de la média ; la nutrition de l'intima et des 2/3 internes de la média étant assurée par le sang circulant dans la lumière du vaisseau. La présence et la composition de l'adventice dépendent du type de vaisseaux : dans les artères élastiques, elle est relativement mince, riche en fibres élastiques et comporte obligatoirement des *vasa vasorum* et fibres nerveuses (le *nervi vasorum*). Les artères musculaires possèdent le plus souvent une adventice bien développée, richement innervée et composée essentiellement de faisceaux de fibres de collagène où se mêlent des fibres élastiques.

#### **I.B.4. Innervation**

Le ML est sous le contrôle du système nerveux autonome (SNA), essentiellement par le système sympathique. Les fibres nerveuses sympathiques dont les afférences aboutissent au niveau de la limitante élastique externe de la média, sont très présentes dans les artérioles et sont responsables d'un état de vasoconstriction permanent appelé tonus vasomoteur qui en fait les principales responsables de la résistance vasculaire périphérique. Ces nerfs vasomoteurs contiennent des vésicules synaptiques (le plus souvent noradrénergiques, mais aussi cholinergiques) qui libèrent ces neuromédiateurs dans les jonctions diffuses où ils se propagent vers les CMLs. L'excitation se transmet ensuite de proche en proche par l'intermédiaires de jonctions serrées de faible résistance électrique afin d'uniformiser la réponse à l'ensemble de la tunique musculaire. Ce phénomène est très important lorsque la média est composée de plusieurs feuillets musculaires, et il peut être complété par la diffusion du neuromédiateur. Un certain nombre de substances, en plus des neurotransmetteurs classique tels que la noradrénaline (NA) et l'acétylcholine, sont connues pour fonctionner comme co-transmetteurs, tels que le neuropeptide Y et l'ATP. Outre ses fonctions physiologiques, de nombreuses évidences suggèrent que le système nerveux sympathique joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle (HTA) et de l'insuffisance cardiaque (IC) congestive.

## **I.C. La cellule musculaire lisse**

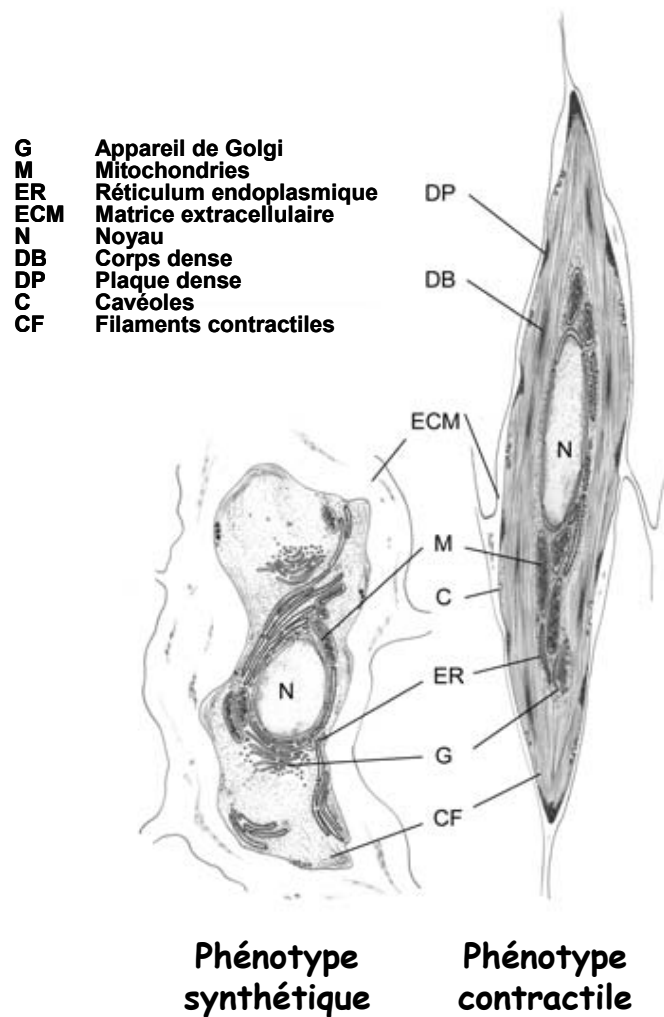
### **I.C.1. Généralités**

Les CMLs sont fusiformes d'un diamètre de 2 à 5  $\mu\text{m}$  pour une longueur très variable selon les tissus (de 15 à 500  $\mu\text{m}$  pour les cellules utérines). Chez l'adulte, la CML vasculaire (CMLV) est dotée d'un haut degré de spécialisation dont la fonction principale est la contraction, qui permet d'assurer le tonus vasculaire des artères, indispensable à la régulation du débit sanguin ainsi que de la PA.

Dans un contexte non pathologique, les CMLs sont qualifiées de cellules quiescentes car elles prolifèrent à un rythme extrêmement faible, présentent de très faibles activités de synthèse et expriment un répertoire unique de protéines contractiles, de canaux ioniques et de molécules de signalisation caractéristiques, mis en place lors d'un processus de différenciation et d'expression protéique propre à leur phénotype « contractile ». Contrairement au muscle squelettique ou cardiaque qui possèdent un état de différenciation terminal, les CMLs conservent chez l'adulte une plasticité remarquable et peuvent ainsi subir de profondes et réversibles modifications phénotypiques en réponse à des changements locaux de signaux environnementaux (Lesh *et al.*, 1995). Cette plasticité est bénéfique dans le développement vasculaire lorsque les CML jouent un rôle clé dans la morphogénèse des vaisseaux sanguins ou encore lors de lésions vasculaires où les CMLs augmentent leur niveau de prolifération et de migration afin de participer au phénomène de cicatrisation. Cependant, ces cellules sont capables de se dédifférencier sous l'influence de signaux d'ordres pathologiques et acquièrent un phénotype « synthétique » qui, dans ce contexte, peut contribuer au développement et à la progression de la maladie vasculaire. Cette modulation phénotypique est associée à une perte de la propriété contractile des cellules musculaires, ce qui leur confère la possibilité de proliférer, de migrer et de synthétiser des protéines de la matrice extracellulaire qui est notamment à l'origine de la chape fibreuse des plaques d'athéromes. La mise en culture des CMLs entraîne également une transition vers le phénotype « synthétique ».

## I.C.2. Caractéristiques phénotypiques des CMLs

*In vivo*, les CMLs sont impliquées dans une large gamme de fonctions nécessitant donc que leur phénotype s'étende sur un continuum allant de quiescent et contractile à synthétique et prolifératif (Owens, 1995; Stegemann *et al.*, 2005). Les CMLs de la paroi vasculaire normale adulte sont dites matures et possèdent un phénotype contractile. Dans les premières études, ces cellules ont été caractérisées par leur ultrastructure qui a ainsi permis de déterminer leur phénotype (**Figure 3**). Des observations en microscopie électronique à transmission ont mis en évidence des cellules présentant une morphologie allongée et fusiforme avec des myofilaments étroitement groupés ainsi qu'un réticulum endoplasmique (RE) granuleux et un appareil de golgi peu développés qui témoignent d'une faible activité de synthèse (Chamley-Campbell *et al.*, 1979; Hedin & Thyberg, 1987; Campbell *et al.*, 1987). Les CMLs arborant un phénotype «synthétique» sont moins allongées et présentent une morphologie pavimenteuse avec un aspect épithélioïde ou rhomboïde (Chamley-Campbell *et al.*, 1979; Hao *et al.*, 2003). Les CMLs synthétiques contiennent un nombre important d'organelles impliqués dans la synthèse protéique tels que le RE granuleux et l'appareil de Golgi qui sont très développés et témoignent d'une grande activité de synthèse. Leur cytosol présente un appareil contractile restreint.

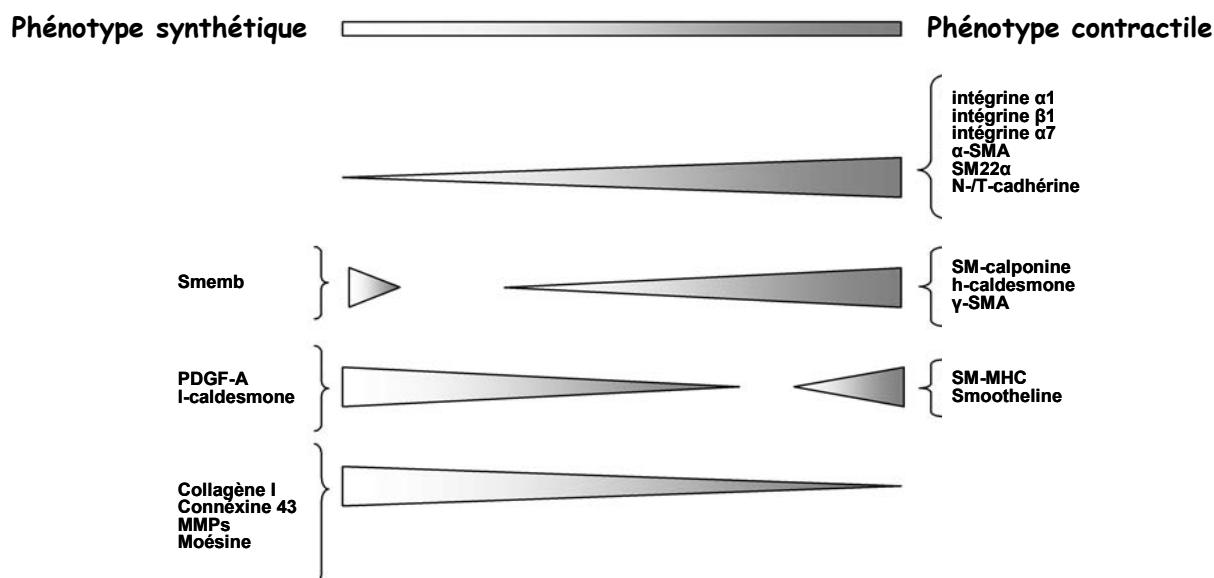


**Figure 3** : Caractéristiques ultra-structurelles des CMLs contractiles et synthétiques.

(Modifié de (Rensen *et al.*, 2007))

### I.C.3. Modifications phénotypique des CMLVs

Des études plus récentes ont caractérisé l'expression de marqueurs protéiques permettant de définir le phénotype des CMLs et ainsi suivre l'état de différenciation de ces cellules (Owens *et al.*, 2004). La plupart de ces protéines sont impliquées dans la contraction des CMLs, en tant que composant structural de l'appareil contractile ou comme régulateur de cette fonction (**Figure 4**).



**Figure 4** : Représentation schématique des niveaux d'expression des gènes associés à un phénotype particulier des CMLs.

**Smemb** : smooth muscle/non-muscle myosin heavy chain, **PDGF-A** : platelet-derived growth factor A, **MMPs** : matrix metalloproteinases, **α-SMA** : α-smooth muscle actin, **SM22α** : Smooth muscle protein of 22kDa, **SM-MHC** : smooth muscle-myosin heavy chain. (Modifié de (Rensen *et al.*, 2007)).

### I.C.3.1. l'α-actine du ML (SM-α-actine)

Chez les mammifères, il existe 7 isoformes d'actine qui sont le produit de gènes différents ayant de fortes homologies de séquences : 4 isoformes α (présentes dans les MLs et les muscles striés squelettique et cardiaque), 1 isoforme β (non musculaire) et 2 isoformes γ (présentes dans le ML entérique et dans les tissus non musculaires) (Owens & Thompson, 1986). Cette protéine de 42 kDa fut le premier marqueur de différenciation identifié dans les CMLs (Gabbiani *et al.*, 1981). Dans les CMLV présentant un phénotype contractile, la SM-α-actine est la forme la plus abondante de l'actine (70%) et représente également une part importante des protéines totales (40%) (Fatigati & Murphy, 1984). Bien que cette isoforme soit spécifique des CMLV différenciées chez l'adulte (Woodcock-Mitchell *et al.*, 1988), elle est aussi exprimée dans les fibroblastes lors des processus de cicatrisation et de revascularisation tumorales (Darby *et al.*, 1990; Cintonino *et al.*, 1991). L'actine existe sous forme de molécules monomériques (actine G ou globulaire) ou de polymères filamenteux (actine F), ces derniers représentant sa configuration fonctionnelle. Ainsi, les monomères

d'actine globulaire s'associent pour former les filaments fins qui sont des polymères d'un diamètre d'environ 7 nm. Ces filaments sont regroupés de manière hexagonale pour former des câbles parallèles orientés tout au long du grand axe de la CML.

### **I.C.3.2. La chaîne lourde de myosine du ML (SM-MHC)**

La myosine est un composant majeur de l'appareil contractile des cellules musculaires squelettiques, cardiaques et lisses ainsi que des cellules non musculaires. C'est un complexe hexamérique composé de 2 chaînes lourdes (MHC pour Myosin Heavy Chain) d'environ 200 kDa chacune et de 2 paires de chaînes légères, la chaîne de 20 kDa (chaîne régulatrice phosphorylable) et la chaîne de 17kDa (chaîne essentielle) (Eddinger & Meer, 1997). Ce complexe réalise une structure dissymétrique composée d'une partie bilobée N-terminale branchée sur une partie fibrillaire en forme de bâtonnet. Dans les CMLs, comme dans le muscle strié squelettique, les molécules de myosine s'associent pour constituer les filaments épais d'environ 12 à 15 nm de diamètre et d'une longueur moyenne de 2  $\mu$ m.

La SM-MHC est composée d'environ 2000 acides aminés qui réalisent en N-terminal une structure globulaire (appelée « tête ») associée à une queue en hélice  $\alpha$  rigide pour la partie C-terminale. La tête de myosine a une activité ATPasique et peut transformer l'énergie chimique due à l'hydrolyse de l'ATP en fonction mécanique permettant ainsi la contraction musculaire. La SM-MHC présente 4 isoformes 1A, 1B, 2A et 2B qui sont le produit de l'épissage alternatif d'un ARNm produit à partir d'un seul gène. Les variantes SM1B-MHC (200 kDa) et SM2B-MHC (204 kDa) représentent environ 80% des chaînes lourdes de myosine dans les CMLV (Loukianov *et al.*, 1997). Ces isoformes sont spécifiques des CMLs puisqu'elles ne sont pas exprimées dans les autres cellules vasculaires comme les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les péricytes (Loukianov *et al.*, 1997; Babu *et al.*, 2000). De plus, les isoformes SM1B-MHC et SM2B-MHC ont été décrites comme étant les marqueurs les plus rigoureux pour identifier l'état de différenciation des CMLs (Owens, 1995). En effet, au cours de l'embryogenèse, les CMLs expriment davantage les isoformes non-musculaires des chaînes lourdes de myosine (NM-MHC), et la diminution de l'expression de ces isoformes non-musculaire dans le développement corrèle avec l'augmentation de l'expression des isoformes SM1B-MHC et SM2B-MHC (Eddinger & Murphy, 1991). En culture, on observe à l'inverse une augmentation de l'expression de NM-MHC et une diminution de l'expression de SM-MHC.

### I.C.3.3. La smootheline

Cette protéine est un constituant majeur du cytosquelette des CMLV et possède 2 isoformes : la smootheline-A (59 KDa) et la smootheline-B (environ 110 KDa) codées par le même gène localisé sur le chromosome 22. Ce gène présente un domaine d'homologie avec la calponine et des études ont montré que ce domaine se lie préférentiellement à l'actine dans le cas d'autres protéines structurales (Gimona *et al.*, 2002; Korenbaum & Rivero, 2002). La co-localisation avec la SM- $\alpha$ -actine a effectivement été mise en évidence dans des cultures primaires de CML (van der Loop *et al.*, 1996; Christen *et al.*, 1999). L'isoforme B de la smootheline est exclusivement exprimée dans les CMLV de phénotype contractile ce qui en fait un très bon marqueur phénotypique. De plus, dans le cas de lésions vasculaires ou lors de la resténose, la concentration en smootheline dans les CMLV de la zone affectée est totalement réprimée (Christen *et al.*, 2001; Bar *et al.*, 2002; Maeng *et al.*, 2003). Ces études montrent que la smootheline est le premier marqueur à disparaître après une angioplastie et le seul à réapparaître après le remodelage. Bien que la smootheline B soit devenue un marqueur de choix du phénotype contractile, les connaissances concernant sa fonction dans la CML restent encore limitées. Il semble cependant que la smootheline B soit impliquée dans la stabilisation et la régulation de l'appareil contractile de la CML (Niessen *et al.*, 2004).

### I.C.3.4. La caldesmone

La caldesmone est une protéine régulatrice de la fonction contractile et de la formation du cytosquelette des CML par sa liaison à l'actine et à la myosine (Sobue *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 1997). Elle est présente sous 2 isoformes générées par épissage alternatif : la h-caldesmone de 140 kDa qui est spécifique des CML, alors que la l-caldesmone de 60 kDa est exprimée dans les cellules non-musculaires et dans les CML dédifférenciées (Humphrey *et al.*, 1992). Dans les CML, la caldesmone est capable de stabiliser les filaments d'actine (Dabrowska *et al.*, 1996), de bloquer la polymérisation de l'actine (Yamakita *et al.*, 2003), d'inhiber l'activité ATPase de l'actomyosine (Marston & Redwood, 1992) et ainsi réguler la contraction des CML en bloquant l'interaction actine-myosine (Lee *et al.*, 2000). L'effet inhibiteur de la fonction contractile de la caldesmone peut être reversé par la fixation de la calmoduline sur son domaine C-terminale (Horiuchi *et al.*, 1986) ou par sa phosphorylation (Yamashiro *et al.*, 1991).



### **I.C.3.5. La calponine h1**

La calponine est une protéine se liant à l'actine et aux filaments intermédiaires de manière calcium-dépendante (Winder & Walsh, 1990). La calponine h1 (34 kDa) est, parmi les 3 isoformes connues, l'isoforme spécifique du ML (Takahashi *et al.*, 1988; Jin *et al.*, 1996). Le rôle fonctionnel de la calponine h1 dans la régulation de la contraction du ML est controversé. Certaines études montrent que cette protéine peut directement réguler la contraction en inhibant l'activité ATPase de l'actomyosine empêchant ainsi la fixation des têtes de myosine sur les filaments d'actine (Winder & Walsh, 1990), et qu'elle est également capable de réguler négativement la motilité des filaments d'actine *in vitro* (Shirinsky *et al.*, 1992). Cependant, d'autres groupes suggèrent que dans les CMLV, la calponine h1 agit en tant que protéine adaptatrice en interagissant avec des protéines de signalisation (la protéine kinase C ou PKC, et les Extracellular-signal Regulated Kinases ou ERK1/2) afin de faciliter la transduction de signaux induits par des agonistes (Leinweber *et al.*, 1999; Leinweber *et al.*, 2000). De plus, la calponine h1 peut être utilisée comme marqueur de différenciation des CMLs en raison de son absence dans les cellules en prolifération (Winder & Walsh, 1993).

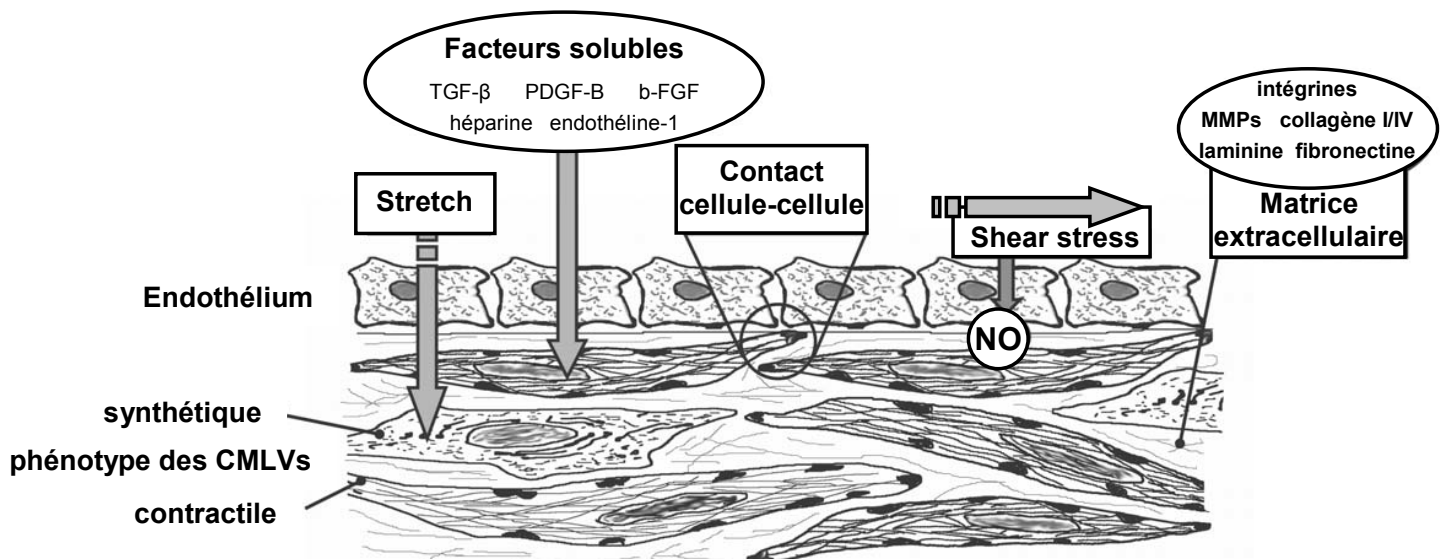
### **I.C.3.6. La matrice extracellulaire (MEC)**

Il est admis que les CMLs en culture perdent rapidement leur appareil contractile et adoptent un phénotype synthétique (Chamley-Campbell *et al.*, 1979). Dans des conditions normales, les CMLs sont entourées par une lame basale composée principalement de collagène de type IV et de laminine. Il semble que cette lame basale soit essentielle au maintien du phénotype contractile des CMLs, en partie parce qu'elle constitue l'interface entre l'appareil contractile des CMLs et la matrice extracellulaire (Moiseeva, 2001). L'ensemble des études indiquent que la composition et l'organisation de la MEC ont des conséquences phénotypiques majeures sur les CMLs. Compte tenu de la diversité des composants de la MEC qui modulent le phénotype des CMLs, il reste encore à identifier les mécanismes mis en jeu pour comprendre les effets complexes de la MEC sur le phénotype des CMLs. En outre, il faut considérer que la MEC est un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance qui sont associés à des composants spécifiques de la MEC. En conséquence, des changements dans la composition de la MEC influencent directement la biodisponibilité de ces facteurs ce qui ajoute une autre dimension à l'interaction entre les composants de la MEC et les molécules biochimiques dans la régulation du phénotype des CMLs.

#### I.C.4. Facteurs de modulation phénotypique des CML

En raison du rôle de la prolifération des CMLs dans la pathologie vasculaire, de nombreuses études ont été allouées à l'étude des mécanismes qui favorisent la prolifération des CMLs et la migration, et des marqueurs associés. Le plus grand défi pour l'ingénierie des tissus vasculaires est d'identifier les facteurs qui favorisent le phénotype contractile des CMLs, en particulier dans le contexte de la re-différenciation des cellules synthétiques vers un phénotype contractile.

Dans des conditions pathologiques, les CMLVs peuvent subir un changement phénotypique de l'état normal contractile à l'état prolifératif qui leur permet de migrer dans la média vers l'intima. Des modifications phénotypiques similaires sont observées lorsque les CMLVs sont retirées de leur milieu d'origine et mises en culture cellulaire. Ces observations mettent en avant l'influence de signaux physiologiques qui permettent de maintenir et de réguler le phénotype des CMLVs dans la paroi du vaisseau. La composition en facteurs solubles, la nature et l'organisation de la matrice extracellulaire environnante, les contraintes mécaniques liées au flux sanguin et l'endothélium exercent un contrôle étroit sur le phénotype des CMLVs (Stegemann *et al.*, 2005; Rensen *et al.*, 2007) (**Figure 5**).



**Figure 5** : Facteurs impliqués dans le développement, la différenciation et la modulation phénotypique des CMLVs. (Modifié de (Rensen *et al.*, 2007))

#### I.C.4.1. Modulation phénotypique par les facteurs solubles

De nombreux facteurs biochimiques affectant l'expression de marqueurs phénotypiques des CMLs ont été décrits, dont certains ont même des effets dépendant du phénotype. Cette large variété de facteurs de signalisation comprend le PDGF (platelet-derived growth factor), le TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), le b-FGF (basic fibroblast growth factor), les IGFs (insulin-like growth factors), l'angiotensine II, le TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ ), l'endothéline-1 ou encore l'héparine (Pukac *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1998; Rauch *et al.*, 2004).

La capacité de l'héparine à inhiber la prolifération des CMLs a été largement décrite *in vivo* et *in vitro* (Lindner *et al.*, 1992; Daum *et al.*, 1997; Bingley *et al.*, 1998). Bien que l'effet de l'héparine soit connu depuis longtemps, son mécanisme d'action reste mal compris et semble être multifactoriel. En effet, certaines études montrent que l'héparine inhibe la prolifération stimulée par le PDGF (Pukac *et al.*, 1997; Savage *et al.*, 2001) alors que d'autres ne décèlent aucun effet (Kenagy & Clowes, 1995; Daum *et al.*, 1997). Toutefois, l'héparine bloque systématiquement la prolifération des CMLs induite par le sérum (Kenagy & Clowes, 1995; Daum *et al.*, 1997; Kazi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). Selon d'autres travaux, l'héparine pourrait agir directement sur le cycle cellulaire en activant la protéine kinase de l'ARN double brin (PKR) qui bloque la transition en phase G1-S (Patel *et al.*, 2002). L'effet anti-prolifératif bien établi de l'héparine ne signifie pas nécessairement que l'héparine peut favoriser un phénotype contractile SMC. Un nombre limité d'études a montré que l'héparine peut induire l'expression de SM- $\alpha$ -actine et d'autres marqueurs du phénotype contractile (Orlandi *et al.*, 1994; Beamish *et al.*, 2009) et retarder la perte d'expression de la smoothelin dans les CML en culture (Christen *et al.*, 1999). Toutefois, le rôle des voies de signalisation anti-prolifératives de l'héparine dans l'expression des gènes contractiles reste incertain.

Le facteur de croissance PDGF est important pour les étapes initiales de la différenciation des CML au cours du développement vasculaire, qui sont caractérisées par le recrutement de cellules mésenchymateuses suivi d'un processus de prolifération (Schattemann *et al.*, 1996; Hellstrom *et al.*, 1999). Dans les CMLs adultes, le PDGF induit généralement un phénotype synthétique. Par exemple, le PDGF diminue l'expression de la SM- $\alpha$ -actine dans les CML aortiques de rat en culture (Li *et al.*, 1997). De même, des clones de CMLs contractiles d'artères coronaires de porc soumis à un traitement au PDGF adoptent

une morphologie en losange, et présentent une augmentation de leur niveau de prolifération et de migration (Hao *et al.*, 2002). Ces résultats *in vitro* ont été confirmés par des études *in vivo* démontrant que l'inhibition de PDGF réduit la prolifération et la migration des CMLs à la suite d'une lésion artérielle chez l'adulte, ce qui conduit à réduire la formation néo-intimale (Deguchi *et al.*, 1999; Kotani *et al.*, 2003).

D'autre part, un autre facteur de croissance, le TGF- $\beta$ , semble être essentiel pour le maintien du phénotype contractile des CML (Wang *et al.*, 2011). Tout comme le PDGF, il joue un rôle dans la migration des précurseurs de CMLs vers les cellules endothéliales et leurs interactions futures, comme l'a révélé la souris déficiente en TGF- $\beta$  (Sanford *et al.*, 1997). Contrairement au PDGF, le TGF- $\beta$  module clairement le phénotype des CML adultes vers le phénotype contractile. En effet, le TGF- $\beta$  augmente les niveaux d'expression de la SM- $\alpha$ -actine, de la SM-MHC et de la calponine dans les CML en culture (Hautmann *et al.*, 1997). Dans cette même optique, le TGF- $\beta$  induit l'expression de protéines du cycle cellulaire tels que p21, qui bloque la division cellulaire, et supprime la dégradation des protéines matricielles (Hocevar & Howe, 2000; Moustakas *et al.*, 2002).

#### **I.C.4.2. Modulation phénotypique par la MEC**

Il est évident que le phénotype des CMLVs peut être modulé par les composants de la MEC. La liaison des constituants spécifiques de la matrice peut induire une réponse cellulaire par interaction avec les intégrines. En outre, il est connu que les récepteurs membranaires de médiateurs solubles (par exemple, les récepteurs aux facteurs de croissance) peuvent interagir avec les intégrines de la MEC ce qui cause une interaction entre ces deux voies de signalisation (Ross, 2004). Les premiers travaux ont montré que la fibronectine, dérivée du sérum, et généralement utilisée comme support de culture cellulaire, favorise la perte du phénotype contractile (Hedin & Thyberg, 1987). Il a été découvert plus tard que, contrairement à la fibronectine, les protéines de la membrane basale laminine et/ou le collagène de type IV pourraient retarder, sans toutefois éliminer la transition vers le phénotype synthétique, même lorsque les cellules ont été cultivées en absence de sérum (Hedin *et al.*, 1988; Thyberg & Hultgardh-Nilsson, 1994; Hayward *et al.*, 1995).

Les voies de signalisation dépendantes de la MEC et impliquées dans la modulation du phénotype des CML ont été explorées de façon limitée. Toutefois, il est connu que les protéines de la MEC s'associent entre elles et avec les CML selon une organisation

tridimensionnelle extrêmement complexe qui va conditionner la cohésion du tissu vasculaire. Les candidats impliqués dans ces interactions sont les protéines d'adhésion de la MEC et leurs récepteurs membranaires, les intégrines (Ingber, 1991; Heerkens *et al.*, 2007). Ainsi, la perte de l'intégrine  $\alpha_7\beta_1$ , qui est un récepteur de la laminine liant l'appareil contractile à la membrane basale (Moiseeva, 2001), engendre une diminution de l'expression des marqueurs du phénotype contractile des CMLs et une augmentation de la prolifération à travers une voie de signalisation Ras-MAPK (pour mitogen-activated protein kinase) (Welser *et al.*, 2007). Ceci suggère que l'interaction MEC- $\alpha_7\beta_1$  peut, dans des conditions normales, contrôler cette voie de signalisation et en conséquence la prolifération (Wilson, 2007). De plus, Il a été démontré que la liaison des intégrines  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_4\beta_1$  avec les protéines de la MEC module l'influx de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) par les canaux calciques voltage-dépendants (Wu *et al.*, 1998b; Waitkus-Edwards *et al.*, 2002). Ainsi, les intégrines participent au phénomène de mécanotransduction et seraient impliquées dans le tonus myogénique (Davis *et al.*, 2001).

Le remodelage de la paroi vasculaire, qu'il soit physiologique ou pathologique, est associé à une dégradation, une réorganisation et/ou à une accumulation de la MEC. Ces phénomènes sont coordonnés par les métalloprotéases de la matrice (MMPs) qui modulent la dynamique de la MEC, jouent un rôle important dans la migration des CMLs synthétiques et contribuent au processus de dédifférenciation (Filippov *et al.*, 2005; Dollery & Libby, 2006). Les MMPs sont clairement responsables de la rupture de la matrice vasculaire et plus particulièrement de la limitante élastique interne, qui est composée de collagène de type IV et de laminine favorisant le phénotype contractile des CMLV. Il a été observé que la dédifférenciation des CMLs isolées d'aorte de souris est précédée par une hausse dramatique de l'isoforme 1 des MMPS membranaires (MT1-MMP) (Lehti *et al.*, 2009). Cependant, il reste à savoir si l'expression des MMPs conduit à la dédifférenciation en soi ou si la surexpression des MMPs est tout simplement une caractéristique des CMLs synthétiques générées par le processus de dédifférenciation.

#### **I.C.4.3. Modulation phénotypique par les facteurs mécaniques**

La média vasculaire est continuellement soumise à des contraintes mécaniques *in vivo*. En conséquence, il a été supposé que l'environnement mécanique joue un rôle important dans la détermination du phénotype des CMLVs. Bien que les effets de la contrainte mécanique

aient été largement étudiés, les mécanismes précis qui dictent les effets de la déformation sur le phénotype des CML sont encore peu compris (Williams, 1998).

Les CMLs du système artériel sont principalement exposées à des contraintes circonférentielles cycliques qui résultent de la PA pulsatile produite par le cœur. Les grosses artères répondent passivement à la PA du fait de leur élasticité intrinsèque. Ces artères, en particulier l'aorte, s'élargissent à chaque systole, puis se relâchent progressivement lors de la diastole, libérant le sang en aval. L'élasticité des gros vaisseaux amortit ainsi les variations périodiques de la pression, et adaptent la pression sanguine au cours du cycle cardiaque dans les petits vaisseaux de résistances moins élastiques. Ces contraintes circonférentielles cycliques imposées aux parois artérielles favorise un état quiescent et contractile aux CMLVs qui expriment une gamme complète de marqueurs de différenciation (Birukov *et al.*, 1998). Afin d'étudier *in vitro* l'influence des facteurs mécaniques sur le phénotype des CMLs, les contraintes cycliques sont fréquemment appliquées à des CMLVs cultivées en monocouche bidimensionnelle sur des substrats qui peuvent être distendus de façon contrôlée. Par l'utilisation de ce système bidimensionnel, les contraintes mécaniques cycliques induisent une modulation de l'expression de nombreux marqueurs biochimiques (le PDGF (Wilson *et al.*, 1993), l'IGF (Standley *et al.*, 1999)), de molécules de la MEC (la fibronectine (Tamura *et al.*, 2000), le collagène de type IV (Joki *et al.*, 2000)) ou encore de protéines contractiles telles que la SM- $\alpha$ -actine (Tock *et al.*, 2003), la calponine (Qu *et al.*, 2008), la h-caldesmone (Birukov *et al.*, 1995) et la SM-MHC (Reusch *et al.*, 1996). Cependant ces résultats restent contradictoires car il a aussi bien été mis en évidence une augmentation (Kim *et al.*, 1999) qu'une diminution (Chapman *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2003) de la prolifération cellulaire en réponse à ces contraintes mécaniques. Cela laisse penser que les caractéristiques expérimentales de la force appliquée (amplitude, fréquence, durée...) peuvent modifier la réponse proliférative des CMLVs (Qu *et al.*, 2007). En outre, il a été montré que leur phénotype initial peut également moduler la réponse, tel que les cellules contractiles prolifèrent en présence d'une contrainte mécanique, tandis que les cellules synthétiques ne présentent pas d'augmentation de leur indice de prolifération (Cappadona *et al.*, 1999). Ce concept est intéressant car il soutient l'idée que non seulement les contraintes mécaniques affectent le phénotype cellulaire, mais aussi que la réponse mécano-sensible est elle-même dépendante du phénotype. Dans des conditions pathologiques où les pressions sont élevées, l'ampleur de ces forces est augmentée et associée à un remodelage de la paroi artérielle

pouvant compromettre l'élasticité du vaisseau, diminuant alors sa capacité à s'adapter aux changements brusques de pression.

Le flux sanguin est responsable d'un second type de contrainte mécanique appelée contraintes de cisaillement (ou shear stress), qui est le plus souvent associé aux cellules endothéliales qui tapissent la paroi vasculaire. Il existe une vaste littérature sur les réponses des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement, mais concernant les CMLVs, leurs réponses n'ont pas été aussi bien caractérisées. Des CMLs de porc en forme de fuseau en co-culture avec des cellules endothéliales adultes acquièrent un phénotype synthétique. Elles présentent une forme en losange et une diminution de l'expression de la SM- $\alpha$ -actine et de la SM-MHC, ainsi qu'une perte de l'expression de la smootheline (Hao *et al.*, 2002). De plus, une augmentation de la prolifération des CMLVs a été observée dans un modèle de culture en matrice tridimensionnelle avec une monocouche de cellules endothéliales et sous l'influence de contraintes de cisaillement (Williams & Wick, 2005). Cependant, il est évident que les interactions physiques et biochimiques entre les CMLVs et les cellules endothéliales sont difficiles à reproduire *in vitro*.

#### **I.C.4.4. Modulation phénotypique par les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans l'orientation phénotypique des CMLs (Davies *et al.*, 1988). Des molécules libérées par les cellules endothéliales tels que le NO (Thomae *et al.*, 1995) et l'endothéline-1 (Janakidevi *et al.*, 1992) ont des effets opposés *in vitro*, inhibant ou stimulant la croissance des CMLs, respectivement. Afin d'exercer ce rôle de façon optimale, les cellules endothéliales doivent se trouver dans un environnement humoral et mécanique adéquat. Une cellule exposée à un flux bidirectionnel, typique des régions prédisposées au développement de la plaque d'athérosclérose ou soumises à des stimuli inflammatoires, synthétisera moins de NO et plus d'endothéline-1, amplifiant ainsi le signal de prolifération. Différents systèmes de co-culture ont été utilisés pour explorer ces interactions : la co-culture directe (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003), la culture transmembranaire (Yoshida *et al.*, 1996; Rose & Babensee, 2007) et le système de bioréacteur (Williams & Wick, 2005; Bulick *et al.*, 2009). Les résultats de ces travaux montrent que les CE ont tendance à augmenter la prolifération des CMLs (Yoshida *et al.*, 1996; Fillinger *et al.*, 1997; Williams & Wick, 2005) suggérant que la présence de cellules endothéliales favorise le phénotype synthétique des CMLVs. Cependant, bon nombre de ces études est réalisé dans des

conditions de culture statique, ce qui modifie la réponse des cellules endothéliales par rapport à des cellules endothéliales confrontées à des contraintes mécaniques de type shear stress. Pourtant, l'augmentation de la prolifération des CMLs a également été observée dans un modèle de culture tridimensionnelle avec une monocouche de cellules endothéliales sous l'influence de contraintes de cisaillement (Williams & Wick, 2005). A l'inverse, des études d'expression de marqueurs phénotypiques montrent que les CMLs en présence de cellules endothéliales ont tendance à surexprimer le PDGF (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003), les cytokines inflammatoire, l'interleukine-8 (IL-8) alors que d'autres protéines associées au phénotype synthétique sont diminuées, telles que le collagène (Williams & Wick, 2005) et le bFGF (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003). En outre, les interactions cellules endothéliales-CML peuvent dépendre du phénotype initial des CML.

Même s'il est évident que les CE ont la capacité de moduler le phénotype des CML *in vivo*, les processus mis en jeu sont complexes et les conditions nécessaires pour mettre en lumière les mécanismes sont difficiles à reproduire *in vitro*. Ni la simple présence ou absence des CE se traduit par une réponse appropriée des CML, mais c'est l'environnement qui entoure les deux types cellulaires qui va définir le contrôle phénotypique des CML.

#### **I.D. Couplage excitation-contraction du ML vasculaire**

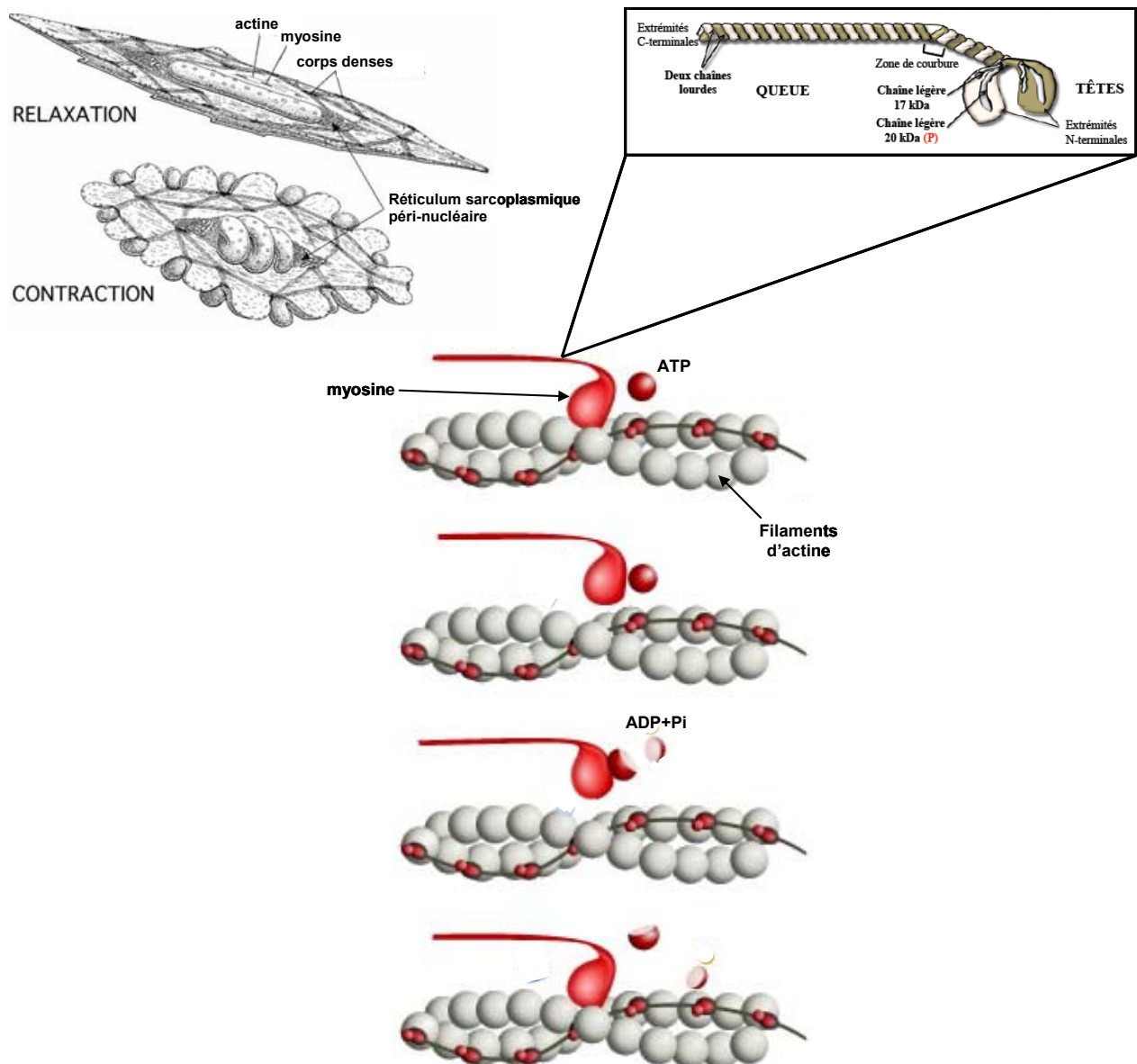
Le processus de contraction des CMLs est principalement régulé par des stimulations mécaniques (étirement), chimiques et hormonales qui vont activer les protéines contractiles (actine et myosine) (Figure 6). Une modification du potentiel de membrane, provoquée par des potentiels d'action ou par l'activation de canaux ioniques sensibles à l'étirement dans la membrane plasmique, peut aussi déclencher des contractions. Afin que la contraction se produise, la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) doit phosphoryler la chaîne légère régulatrice de la myosine de 20 kDa (MLC<sub>20</sub>) sur la Sérine 19 provoquant un changement de conformation de la myosine qui adopte une forme plus allongée ce qui permet l'interaction moléculaire avec l'actine. Un filament épais de myosine peut être en contact avec six filaments fins d'actine. Ainsi, pendant toute la durée de la contraction, les filaments d'actine restent en contact avec le filament de myosine ce qui empêche tout glissement en arrière. La succession d'interactions actine-myosine entraîne un glissement des filaments d'actine par rapport à la myosine, ce qui génère une force aux extrémités de la cellule



musculaire. L'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP par l'activité ATPasique intrinsèque de la myosine alimente le cycle des ponts d'union entre la myosine et l'actine nécessaire à la contraction. Ainsi, l'activité contractile du ML est déterminée principalement par l'état de phosphorylation de la MLC qui est un processus hautement régulé. La MLC<sub>20</sub> est déphosphorylée par l'action de la phosphatase MLC<sub>20</sub> (MLCP). Dans certaines CMLs, la phosphorylation de la MLC<sub>20</sub> est maintenue à un niveau bas en l'absence de stimuli. Le phénomène qui en résulte est connu sous le nom de tonus myogénique dont l'intensité peut être variable.

Le mécanisme de contraction du ML décrit ci-dessus est, en ce qui concerne les partenaires mis en jeu et les différentes étapes, semblable à celui du muscle squelettique. Cependant, la contraction tonique du ML est dotée de propriétés uniques par sa durée et son intensité. Cette contraction peut être maintenue pendant des heures voire même des jours, et à titre de comparaison, est 30 fois plus longue que dans le muscle squelettique. Ces différences sont dues à la faible consommation énergétique de la contraction du ML (moins de 1 % de l'énergie dépensée par le muscle squelettique) provenant de la faible vitesse d'hydrolyse de l'ATP. La durée de contraction est prolongée alors que la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'état de phosphorylation de la MLC diminuent pour atteindre des niveaux de base. Ce phénomène peut s'expliquer par l'état dit "verrouillé" (latch-state) et la formation de ponts "actine-myosine" alors que la myosine n'est plus phosphorylée. En effet, il semble que la déphosphorylation de la MLC soit associée à une formation plus lente des ponts entre l'actine et la myosine, une diminution des niveaux d'activité ATPase et un maintien de la force (Hai & Murphy, 1988; Hai & Murphy, 1989). Une seconde hypothèse est que la modulation conformationnelle des filaments du cytosquelette qui intervient lors de la contraction pourrait modifier les interactions protéine-protéine et notamment celle entre l'actine et la myosine (Woodrum & Brophy, 2001).

La phosphorylation réversible de MLC<sub>20</sub> joue donc un rôle essentiel dans la régulation de la contraction du ML vasculaire.



**Figure 6 :** Représentation du mécanisme de contraction des CMLs.

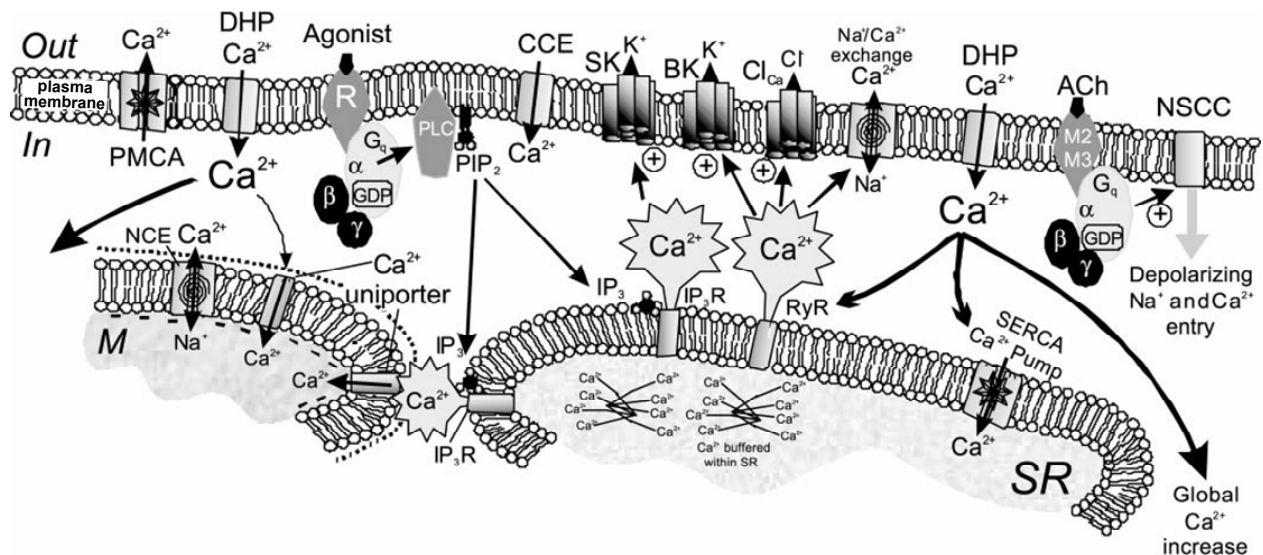
La contraction du ML vasculaire est régie par les signaux calciques intracellulaires. Les stimulations contractiles déclenchent une élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique par libération à partir des sites de stockage intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  ou par influx de  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu extracellulaire. L'élévation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire augmente sa liaison à la calmoduline, et ce complexe va alors activer la MLCK. Le ML tire son nom du fait qu'il ne présente pas de motif en bandes striées qui est caractéristique des muscles cardiaque et squelettique. De plus, le réticulum sarcoplasmique (RS) des CMLV est beaucoup moins développé que celui des cellules musculaires squelettiques ou cardiaques et du fait de l'absence de tubules transverses

le RS n'est pas aussi intimement associé au sarcolemme des CMLV ne permettant donc pas le couplage du potentiel d'action à la libération du calcium des stocks du RS. Néanmoins, la membrane des CML possède des structures spécialisées appelées cavéoles qui permettent des interactions entre le milieu extracellulaire et les voies de signalisation intracellulaire impliquées notamment dans la contraction. Il a été montré que les cavéoles peuvent être impliquées dans le contrôle local des dynamiques calciques tel que la génération d'étincelles calciques (sparks) par leur étroite localisation avec le RS sous-jacent (Lohn *et al.*, 2000; Shmygol & Wray, 2004).

En plus de l'activation de la MLCK dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , il existe un second mécanisme de contraction, appelé sensibilisation de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$ , qui permet de maintenir la MLC dans un état phosphorylé en l'absence d'augmentation de la concentration cytosolique de  $\text{Ca}^{2+}$  et ainsi de promouvoir la contraction.

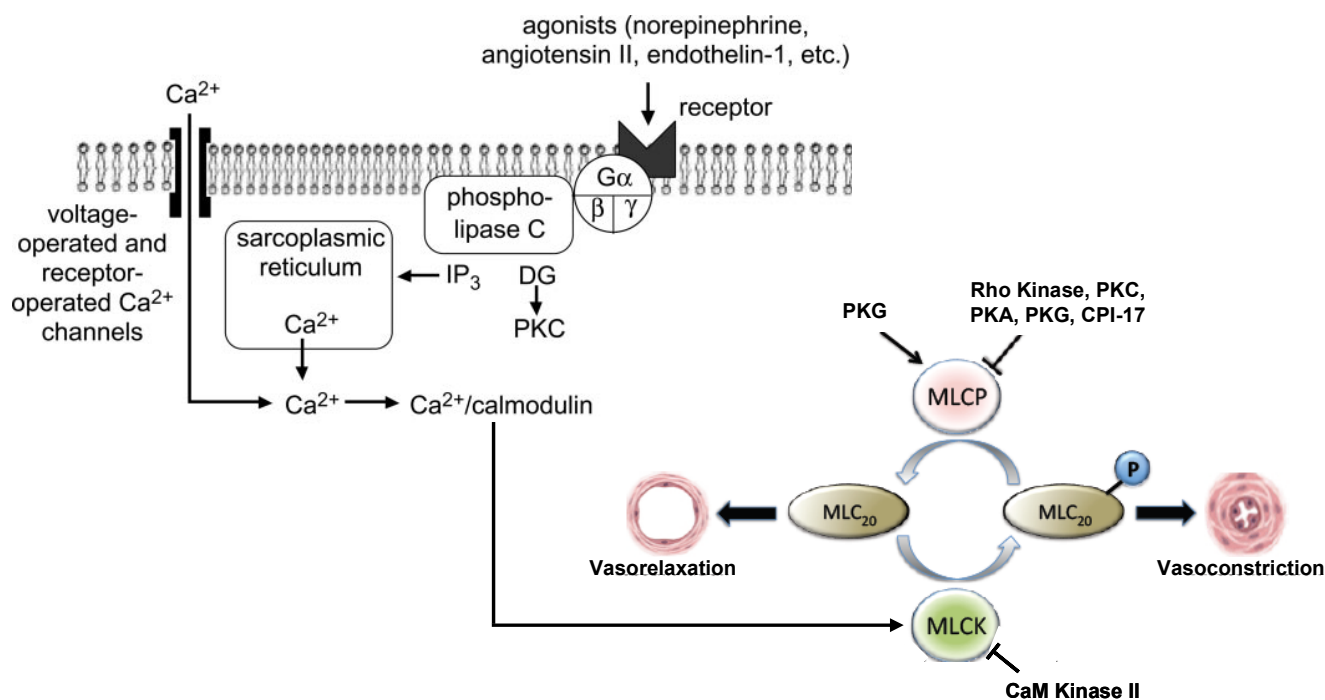
#### **I.D.1. Contraction de la CML par augmentation de la concentration intracellulaire de $\text{Ca}^{2+}$**

Dans les CMLs, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est environ de 0,1  $\mu\text{M}$  à l'état de repos, alors que dans le milieu extracellulaire cette concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre est de 1 à 2 mM (Bolton, 1979). Les transporteurs tels que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique (PMCA) et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  présents à la membrane, permettent le retour à un niveau de base du  $\text{Ca}^{2+}$  après stimulation ainsi que son maintien à de faibles concentrations dans le cytosol en conditions de repos. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule peut intervenir suite à la dépolarisation de la membrane qui va alors activer les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage (couplage électro-mécanique) et provoquer un flux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  suivant leur gradient de concentration, du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Un second mécanisme fait intervenir des récepteurs membranaires qui, activés par des agonistes sélectifs, vont induire une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks intracellulaires (couplage pharmaco-mécanique) (**Figure 7**). En effet, dans les CMLs, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS est très élevée, de 10 à 15 mM (van Breemen & Saida, 1989), et joue donc un rôle important dans l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique lors de stimulations menant à la contraction (Burdyga *et al.*, 1995) (**Figure 8**).



**Figure 7** : Mécanismes de contrôle des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les CMLs. (D'après (Sanders, 2001))

Une dépolarisation active les canaux calciques voltage-dépendant sensibles aux dihydropyridines (DHP). Les canaux cationiques non sélectifs (NSCC) et les entrées capacitatives de  $\text{Ca}^{2+}$  (CCE) constituent les autres mécanismes d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Une partie du calcium entrant peut être "tamponné" par les réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ , telles que le réticulum sarcoplasmique (SR) et la mitochondrie (M). La pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase du RS (SERCA) et l'unipporteur calcique de la mitochondrie fournissent le mécanisme d'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces deux structures intracellulaires. L'homéostasie calcique dans les mitochondries est régulée par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCE). De nombreux agonistes excitateurs se lient aux récepteurs couplés aux protéines G (Gq) et activent la phospholipase C (PLC) pour générer l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). L' $\text{IP}_3$  se lie aux récepteurs de la membrane du RS et provoque la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Les augmentations localisées de  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent aussi provenir de récepteurs à la ryanodine (RyR). Ces fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la région subsarcolemmal peuvent stimuler les canaux potassiques activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  de faible (SK) et de large conductance (BK), ainsi que les canaux chlores activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ ). L'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est maintenue par deux transporteurs qui expulsent le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire: la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  présents à la membrane.



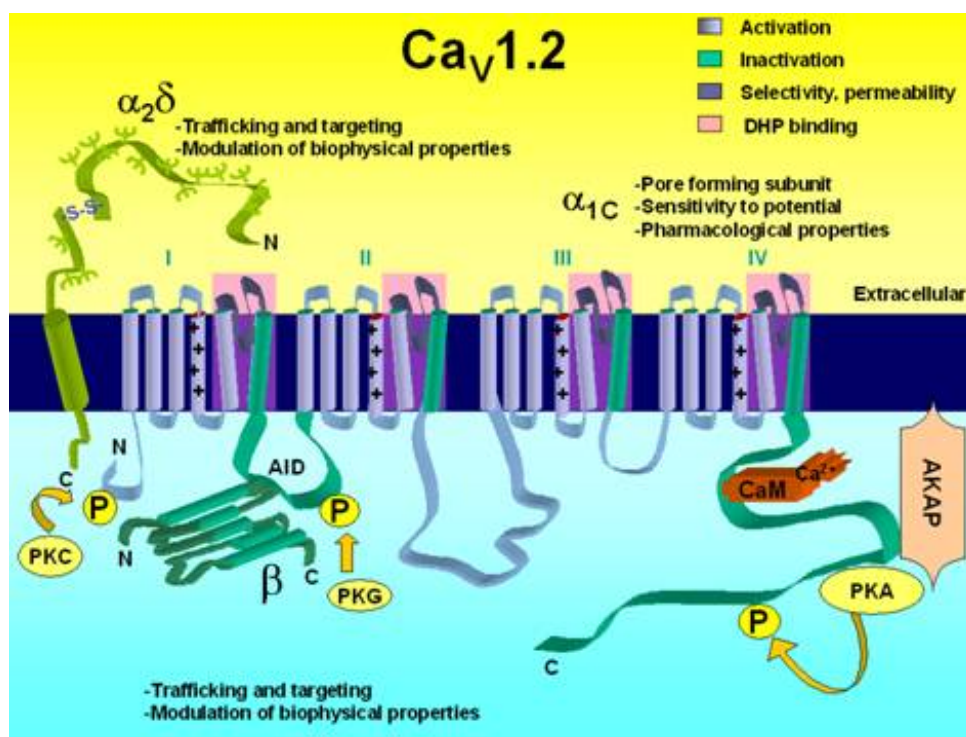
**Figure 8 : Régulation de la concentration en calcium intracellulaire et de la contraction des CMLs.**

**DG** : Diacylglycerol, **PKA** : Protéine kinase AMPc-dépendante, **PKC** : Protéine kinase C, **PKG** : Protéine kinase GMPc-dépendante, **IP<sub>3</sub>** : Inositol 1,4,5 tri-phosphate, **MLC<sub>20</sub>** : Chaîne légère régulatrice de la myosine de 20 kDa, **MLCK** : Kinase des chaînes légères de myosine, **MLCP** : Phosphatase MLC<sub>20</sub>.

### I.D.1.1. Couplage électro-mécanique

L'entrée du Ca<sup>2+</sup> dans les CMLs est contrôlée par le potentiel de membrane qui détermine l'ouverture des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants (Shmigol *et al.*, 1998). Le potentiel de membrane des CML, de -60 à -40 mV au repos, est régi par différents types de canaux ioniques, comme les canaux potassiques de forte conductance (BK<sub>Ca</sub>) et les canaux chlore (Cl<sub>Ca</sub>) qui sont tout deux activés par le Ca<sup>2+</sup>. Les canaux calciques de type L (Ca<sub>v</sub>1, "long lasting") sensibles aux dihydropyridines sont généralement le seul type de canal Ca<sup>2+</sup> exprimé dans de nombreux MLs (Thorneloe & Nelson, 2005) (**Figure 9**). Purifiés à partir de tubules transverses de muscle squelettique, ces canaux présentent une structure composée de 5 sous unités : α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, β, γ et δ (Curtis & Catterall, 1984; FLOCKERZI *et al.*, 1986). L'importante sous-unité α<sub>1</sub> (190-240 kDa) confère les propriétés fonctionnelles au canal Ca<sub>v</sub>1, comprenant la sensibilité au voltage et la perméabilité au Ca<sup>2+</sup>, ainsi que des propriétés régulatrices par la

présence de sites de phosphorylation, l'inactivation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante et l'inhibition par les bloqueurs de canaux calciques (Catterall, 2000). Ces canaux  $\text{Ca}_v1$ , s'activent à partir de potentiels de membrane dépolarisants d'environ -30 mV pour atteindre leur conductance maximale à 0 mV. Ils s'inactivent lentement lors d'une dépolarisation prolongée, de telle sorte que la tension dépendante de l'influx de  $\text{Ca}_v1$ , provoqué par une petite fraction de ces canaux est suffisante pour contrôler le tonus contractile des petites artères et ainsi contribuer à leur autorégulation dynamique (Nelson *et al.*, 1990; Inscho *et al.*, 1998). Par conséquent, l'influx continu de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers ces canaux permet de maintenir un tonus vasculaire et fournit une excitation sur laquelle des substances vaso-actives endogènes peuvent agir pour moduler le diamètre artériel.



**Figure 9** : Représentation schématique du canal calcique de type L.(D'après (Brette *et al.*, 2006))

Ces canaux  $\text{Ca}_v1$  sont considérés comme la principale source extracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire à la contraction du ML et au prolongement du tonus vasculaire. Une activité accrue de ces canaux a été mise en évidence dans l'HTA et dans des maladies cérébrovasculaires (Pesic *et al.*, 2004). Plus récemment, des études ont mis en évidence l'expression de canaux calciques de type T ( $\text{Ca}_v3$ , "transient") dans différents types de MLs comme celui du canal

défèrent (Park *et al.*, 2004), de l'urètre (Bradley *et al.*, 2004), de la vessie (Sui *et al.*, 2003) et du tissu vasculaire (Rodman *et al.*, 2005). Le rôle fonctionnel de ces canaux de type T dans le ML est encore à déterminer, compte tenu du fait que leur activation requiert un potentiel de membrane hyperpolarisé (-40 mV) qui est proche du potentiel de repos des CML.

La régulation de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les canaux voltage-dépendants est intimement liée à la communication entre le RS et la membrane plasmique dans les CMLs. Des libérations spontanées de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS, appelées étincelles calciques ou "sparks", délivre des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ordre du micromolaire de façon très localisée aux canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$  sans altérer la concentration  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. L'activation de ces canaux potassiques ou chlores par les "sparks" calciques va conduire à des changements du potentiel de membrane cellulaire modifiant ainsi l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  généré par les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants. L'activation du canal chlore va provoquer un efflux d'ions  $\text{Cl}^-$ , et donc une dépolarisation de la membrane plasmique, une augmentation de l'influx de calcium à travers les canaux calciques voltage dépendant et la contraction. Au contraire, le groupe de Nelson a montré que l'augmentation de calcium généré par les sparks dans des microdomaines membranaires est associée à une hyperpolarisation membranaire, et conclue que ces signaux locaux de calcium n'engendrent pas de contraction mais une relaxation (Nelson *et al.*, 1995; Brenner *et al.*, 2000; Amberg *et al.*, 2003). Ils ont démontré que c'est l'activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  des canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  qui provoque une sortie de  $\text{K}^+$  et donc une hyperpolarisation qui est fondamentale d'un point de vue fonctionnel. Des études *in vitro* sur des préparations de vaisseaux sanguins ont montré une augmentation du tonus lorsque ces canaux sont bloqués, que des vasoconstricteurs activant la voie PKC inhibent les sparks (Bonev *et al.*, 1997) et que la vasorelaxation induite par l'AMPC augment la fréquences des sparks calciques et conduit à une vasodilatation (Porter *et al.*, 1998).

Dans le muscle lisse, il existe aussi des canaux ioniques sensible à des stimuli mécaniques tel que l'étirement (Stretch-Activated Channels) (Davis *et al.*, 1992; Wu & Davis, 2001). Dans des CMLV isolées, l'étirement active un courant cationique entrant non sélectif avec une perméabilité relative aux  $\text{K}^+ \geq \text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+}$  (Davis *et al.*, 1992). Etant donné que l'influx de calcium est relativement faible, il est admis que l'activation des ces canaux par l'étirement contribue principalement à la dépolarisation de la membrane plasmique et à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant. Des travaux ont montré que l'étirement appliqué à des CML isolées d'artères coronaires peut aussi activer un courant potassique sortant à travers les

canaux  $BK_{Ca}$ . Le fait qu'un inhibiteur sélectif de ces canaux, l'ibérotisine, augmente la dépolarisation induite par l'étirement suggère que ce courant potassique atténue les changements de potentiel membranaire et ainsi la constriction causés par la contrainte mécanique (Wu & Davis, 2001).

### I.D.1.2. Couplage pharmaco-mécanique

Il est bien établi que la fonction contractile des CMLV est finement contrôlée par des hormones et des neurotransmetteurs qui exercent leurs effets par l'activation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG). Les agonistes vasoconstricteurs peuvent provenir du système nerveux sympathique (NA, adrénaline), des cellules endothéliales (endothéline-1) et des tissus environnants (angiotensine II), ou être véhiculés par la circulation sanguine. Les voies de signalisation mises en jeu sont directement couplées à l'activation de protéines hétérotrimériques  $G_{q/11}$  qui vont permettre la transduction du signal au niveau intracellulaire pour aboutir à l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  cytosolique. En effet, les protéines  $G_{q/11}$  vont stimuler l'activité enzymatique de la phospholipase C (PLC). Cette enzyme est spécifique du phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) de la membrane lipidique dont l'hydrolyse se traduit par la formation de deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5 tri-phosphate ( $IP_3$ ) et le diacylglycérol (DAG). La liaison de l' $IP_3$  sur son récepteur spécifique ( $IP_3R$ ) à la membrane du RS produit une libération de  $Ca^{2+}$  des stocks du RS vers le cytosol (Hirose *et al.*, 1999). Le  $Ca^{2+}$  libre peut également se lier à des récepteurs à la ryanodine (RyR) à la membrane du RS. Ce mécanisme appelé "  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release" (CICR) provoque une libération massive de  $Ca^{2+}$  du RS. Il existe entre ces deux mécanismes de libération de  $Ca^{2+}$  des stocks du RS une étroite interaction. Il a été suggéré que les  $IP_3R$  peuvent être co-localisés avec un groupe de RyR et ainsi permettre d'activer le phénomène de CICR (Janiak *et al.*, 2001). Le  $Ca^{2+}$  intracellulaire affecte également la probabilité d'ouverture des  $IP_3R$ , et cette régulation est complexe de telle sorte que de faibles concentrations de  $Ca^{2+}$  facilitent l'ouverture des canaux, alors qu'une concentration élevée devient inhibitrice (Bezprozvanny *et al.*, 1991; Mak *et al.*, 1998). Il existe donc un rétrocontrôle naturel de la libération du  $Ca^{2+}$  par les  $IP_3R$ .

Bien que ce mécanisme d'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire soit indépendant de la dépolarisation membranaire, il peut être modulé par l'influx de  $Ca^{2+}$  à travers les canaux



voltage-dépendant qui peut stimuler le CICR et inversement, la dépolarisation peut être secondaire à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks du RS.

### **I.D.2. Sensibilisation-désensibilisation de l'appareil contractile**

La contractilité du ML vasculaire n'est pas seulement régie par la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, mais aussi par des mécanismes indépendants du  $\text{Ca}^{2+}$ . De nombreuses études ont apporté la preuve qu'en plus de l'activation de la MLCK par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline menant à la formation des ponts actine/myosine, il existe d'autres mécanismes de régulation qui participent au contrôle de la contraction du ML. Ces mécanismes comprennent la régulation des filaments fins et la sensibilisation au  $\text{Ca}^{2+}$  (Somlyo & Somlyo, 1994; Horowitz *et al.*, 1996). Ce dernier se réfère généralement à un processus par lequel la contraction dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  se produit, mais pour une concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  inférieure à celle nécessaire pour activer directement la MLCK. L'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  ont permis de montrer que différents agonistes induisent des réponses contractiles d'intensités variables avec une élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire similaires (Himpens *et al.*, 1990). A titre d'exemple, une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en réponse à une dépolarisation causée par une concentration en  $\text{K}^+$  externe élevée provoque une contraction moins importante qu'un changement en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique équivalent produit par une stimulation muscarinique. Ce phénomène de sensibilisation peut être amplifié par des agonistes stimulant la contraction ou diminué par des agonistes inhibiteurs qui annihilent l'efficacité des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  provoquant ainsi la relaxation du ML.

Deux mécanismes sont impliqués dans la sensibilisation de l'appareil contractile. Le premier concerne la phosphorylation de protéines régulatrices associées aux filaments fins d'actine et l'autre concerne modulation de l'activité de la MLCP. Cette MLCP est composée de trois sous-unités : une sous-unité catalytique de 38 kDa apparentée à la famille des protéines phosphatases de type 1 (PP1c), une sous-unité non-catalytique variable de 20 kDa et une sous-unité de liaison à la myosine de 110 kDa. Cette dernière représente la sous-unité régulatrice de la MLCP appelée MYPT et MYPT1 est l'isoforme majoritairement exprimée dans le ML (Hartshorne *et al.*, 2004). La conformation hétérotrimérique de la MLCP et l'interaction entre MYPT1 et la myosine contribuent à l'augmentation de l'activité de la

MLCP envers la  $MLC_{20}$ . La moindre perturbation de cette structure peut engendrer des modifications de l'activité de la MLCP. Il a notamment été montré que la contraction induite par la phényléphrine (agoniste  $\alpha_1$ -adrénergique) conduit à la dissociation du complexe entre MYPT1 et PP1c (Hirano *et al.*, 2004). La phosphorylation de MYPT1 diminue la capacité de la MLCP à déphosphoryler la  $MLC_{20}$  ce qui augmente la sensibilité de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$  (Hirano, 2007). MYPT1 peut être phosphorylé sur plusieurs sites comme la thréonine 696 et 853 menant à l'inhibition de l'activité phosphatase de la MLCP. La petite protéine G RhoA et sa voie de signalisation associée à la kinase Rho (ROCK) jouent un rôle très important dans la régulation de l'activité de la MLCP. ROCK a été la première kinase identifiée dans la catalyse de la phosphorylation de MYPT1. Elle phosphoryle MYPT1, inhibant son activité et entraînant par conséquent une augmentation de l'état de phosphorylation de la  $MLC_{20}$ .

Les agents vasoconstricteurs peuvent aussi, par l'intermédiaire du DAG ou de l'acide arachidonique, activer la PKC qui exerce son effet indépendamment de la phosphorylation de MYPT1. La sensibilisation au  $Ca^{2+}$  contrôlée par la PKC fait intervenir la protéine CPI-17 (Woodsome *et al.*, 2001; Eto *et al.*, 2001). Ce peptide de 17 kDa est un substrat de la PKC spécifique du ML qui, dans un état phosphorylé, est un puissant inhibiteur de la MLCP par blocage direct de la sous-unité catalytique de la MLCP (Kitazawa *et al.*, 2003). D'autres protéines kinases peuvent aussi phosphoryler la protéine inhibitrice CPI-17 telles que la kinase associée aux intégrines (ILK) (Deng *et al.*, 2002), la protéine kinase interagissant avec les motifs de type fermeture éclair (zipper) (ZIPK) (MacDonald *et al.*, 2001) et de manière intéressante ROCK (Koyama *et al.*, 2000). Les niveaux d'expression de ROCK, MYPT1 et CPI-17 sont des facteurs importants dans la détermination de l'importance de ces voies de signalisation dans la régulation de la sensibilité au  $Ca^{2+}$  et donc du tonus d'un type donné de ML.

Parallèlement à la sensibilisation de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$ , il existe un processus opposé de désensibilisation, qui provoque la relaxation du ML. Ce mécanisme est en partie contrôlé par des seconds messagers intracellulaires, l'AMPc et le GMPc, qui vont activer les protéines kinases A (PKA) et G (PKG). Il est cependant intéressant de noter que la désensibilisation au  $Ca^{2+}$  par l'AMPc est inhibée par un bloqueur sélectif de PKG suggérant que les effets de ces deux seconds messagers sur la sensibilité au  $Ca^{2+}$  sont contrôlés par la PKG plutôt que par la PKA (Kawada *et al.*, 1997).

Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer l'effet des nucléotides cycliques sur la relaxation induite par la désensibilisation de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$ , mais leur importance ainsi que la régulation spatiale et temporelle est mal comprise. L'inhibition de RhoA par phosphorylation par la PKG est le processus le plus important et le mieux décrit (Sauzeau *et al.*, 2000). Il a également été montré que la PKA et la PKG activent la MLCP suite à une interaction entre les motifs leucine zipper de PKG1 $\alpha$  et MYPT1 (Surks *et al.*, 1999) et/ou suite à la phosphorylation de la protéine télodine, chaperon de la myosine et de ses filaments, spécifique du ML (Wu *et al.*, 1998a). Enfin, la PKA et la PKG peuvent réduire la phosphorylation inhibitrice de MYPT1 sur les thréonines 696 et 853, par un mécanisme d'exclusion de phosphorylation (Wooldridge *et al.*, 2004; Lubomirov *et al.*, 2006). De plus, indépendamment de la voie PKA et PKG, une étude a mis en évidence qu'une augmentation de l'AMPc peut provoquer une vasorelaxation par l'activation du facteur d'échange du GTP pour Rap1, Epac. Cette protéine Epac agirait en tant que bloqueur de la voie RhoA et lèverait ainsi l'inhibition de l'activité de la MLCP vasculaire (Zieba *et al.*, 2011).

La protéine kinase II dépendante du complexe  $Ca^{2+}$ /Calmoduline (CaMKII) joue également un rôle dans la sensibilité au calcium. Il a été décrit qu'elle peut diminuer l'activité de la MLCK par phosphorylation, et qu'un inhibiteur spécifique de l'activité de la CaMKII, le KN-93, permet le maintien de la force de contraction du ML artériel (Rokolya & Singer, 2000). Ainsi, la CaMKII pourrait agir en tant que rétro-contrôle négatif dans le cas de forte hausse de  $Ca^{2+}$  pour inhiber l'activité de la MLCK (Pfitzer, 2001).

### **I.E. Contrôle du tonus vasculaire**

De nombreux signaux extracellulaires régulent le tonus du ML vasculaire. Des stimuli nerveux, hormonaux, ioniques ou encore mécaniques conditionnent l'équilibre entre la contraction et la relaxation du ML vasculaire ce qui détermine le diamètre dynamique des vaisseaux sanguins. Les mécanismes régulant le tonus artériel varient suivant la région considérée: différents mécanismes régulent les artères de résistance périphériques, les artères du système nerveux central et les artères coronaires, tandis que le tonus des artères pulmonaires est encore régi par d'autres mécanismes (Duncker & Bache, 2008; Wolin *et al.*, 2010). Par exemple, le débit sanguin cérébral est principalement régi par le processus "d'auto-régulation": il reste relativement constant pour une large gamme de pressions de

perfusion cérébrale. En revanche, dans les artères périphériques, le SNA joue un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire, alors qu'un changement de l'activité sympathique a des effets infimes sur le débit sanguin cérébral malgré l'importante innervation sympathique de la circulation cérébrale (Ogoh & Ainslie, 2009). Bien que le SNA soit un régulateur important du tonus artériel périphérique, les facteurs humoraux et les mécanismes dépendant de l'endothélium contribuent également à cette régulation (Luksha *et al.*, 2009; Burnstock, 2009).

### **I.E.1. Régulation neuro-hormonale du tonus vasculaire**

Les modes d'actions des systèmes nerveux et hormonal sont différents, de part la structure du vaisseau et de la localisation des CML au niveau de la média. Alors que les afférences nerveuses peuvent établir un contact avec les CMLV, les hormones sont transportées par le sang et ne sont donc pas en contact direct avec les CMLV. En effet, la couche de cellules endothéliales limite l'accès des hormones aux CML. Les hormones agissent donc soit par diffusion, soit par effet indirect via les cellules endothéliales. Cependant, les médiateurs libérés par les terminaisons nerveuses peuvent également diffuser vers les cellules endothéliales et dans ce cas, ces neurotransmetteurs vont agir comme des médiateurs paracrines. Ainsi, la limite entre hormones et neurotransmetteurs devient plus floue.

Le système nerveux périphérique est divisé en trois parties, sympathique, parasympathique et sensoriel.

#### **I.E.1.1. Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux sympathique**

A pression artérielle normale, les vaisseaux sont sous l'influence du "tonus sympathique". Les fibres nerveuses sympathiques régulent le tonus vasculaire par la libération de NA, mais également d'ATP et de neuropeptide Y (NPY) et (Todorov *et al.*, 1999).

La NA agit en se fixant sur les récepteurs  $\alpha$ - ou  $\beta$ -adrénergiques. La stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques des CMLV provoque une vasoconstriction alors que la fixation de la NA sur les récepteurs de type  $\beta$ -adrénergique provoque au contraire une vasodilatation.

C'est donc l'expression de l'un ou de l'autre type de récepteurs qui détermine la réponse de la CML à l'activation du système sympathique. Mais puisque dans la plupart des vaisseaux, la densité de récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques est dominante comparée à celle des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, et que la NA a une affinité supérieure pour les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, l'innervation sympathique a donc une influence vasoconstrictrice. Au contraire, une diminution de l'activité des fibres sympathiques induira une vasodilatation.

○ *Récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques*

Il existe deux types de récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, les récepteurs  $\alpha_1$  et les récepteurs  $\alpha_2$ . En 1974, Langer (Langer, 1974) a suggéré que lors de la stimulation  $\alpha$ -adrénergique, les réponses des organes effecteurs étaient contrôlées par les récepteurs  $\alpha_1$  et que la diminution de la sécrétion de NA par rétrocontrôle négatif résultait de l'activation des récepteurs  $\alpha_2$  pré-synaptiques. Les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques ont été ultérieurement identifiés au niveau post-synaptique également.

Les récepteurs  $\alpha_1$  sont couplés à une production d'IP3 via l'activation d'une PLC par une protéine  $G_{q/11}$ , ce qui explique leur effet contractant sur la CML (Guimaraes & Moura, 2001). Les récepteurs  $\alpha_2$  se retrouvent quant à eux essentiellement au niveau du ML des veines où leur activation provoque également une faible vasoconstriction qui favorise le retour veineux. Ils exercent leur action par stimulation d'une protéine  $G_i$ , qui inhibe l'activité des adénylyl cyclase (AC) (Cotecchia *et al.*, 1990; Wise *et al.*, 1997), mais aussi par inhibition de l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant (Cotecchia *et al.*, 1990) et par l'activation de canaux potassiques (Surprenant *et al.*, 1992; Guimaraes & Moura, 2001).

○ *Récepteurs  $\beta$ -adrénergiques*

Trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont connus, les récepteurs  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -AR (Lands *et al.*, 1967a; Bylund *et al.*, 1994). Ces 3 sous-types sont exprimés dans les artères et participent à l'effet vasodilatateur  $\beta$ -adrénergique. Mais le degré de participation de chaque sous-type dépend du lit vasculaire et de l'espèce concernés (O'Donnell & Wanstall, 1984a; O'Donnell & Wanstall, 1984b; Guimaraes *et al.*, 1993; Begonha *et al.*, 1995). L'implication de ces récepteurs dans l'effet vasorelaxant  $\beta$ -adrénergique, ainsi que les voies de signalisation associées (et notamment la contribution de l'endothélium) seront détaillées dans le paragraphe II.A.1 (page 60).

Au niveau vasculaire, l'ATP, libéré par les terminaisons nerveuses, se fixe principalement les récepteurs ionotropiques P2X1 post-synaptiques et provoque un influx de cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) dans la cellule, créant ainsi un potentiel de jonction excitateur d'amplitude suffisante pour activer les canaux calciques voltage-dépendant et provoquer la contraction (Zang *et al.*, 2006).

Dans les synapses neuro-effectrices du système nerveux sympathique vasculaire, le NPY peut se fixer sur deux sous-types de récepteurs, Y1 et Y2. Les récepteurs NPY1 sont préférentiellement post-synaptiques et leur activation entraîne une vasoconstriction directe soit par la potentialisation de l'activité électrique transmembranaire ou par facilitation des effets vasoconstricteurs de l'ATP et de la NA (Donoso *et al.*, 2006; Hodges *et al.*, 2009). Au contraire, la stimulation des récepteurs NPY2 pré-synaptiques réduit la libération des neurotransmetteurs des nerfs sympathiques vasculaires.

#### **I.E.1.2. Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux parasympathique**

L'innervation parasympathique vasculaire est limitée à certains territoires, tels que les artères cérébrales et les artères des tissus érectiles. Les neurotransmetteurs libérés par les neurofibres parasympathiques sont l'acétylcholine (ACh), le NO et le peptide vasoactif intestinal (vasoactive intestinal peptide, VIP). L'ACh libérée par les fibres cholinergiques exerce deux effets opposés au niveau vasculaire. Sa libération active des récepteurs muscariniques de type M3 (Goyal, 1989) présents sur les CMLV, provoquant une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par son couplage à la PLC et une vasoconstriction. Cependant, l'effet principal de l'ACh est médié par les cellules endothéliales qui présentent également des récepteurs muscariniques de type M1 qui vont, par des signaux dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, stimuler l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS) et par conséquent la production de NO qui va diffuser vers les CMLV et provoquer une vasorelaxation. C'est donc la présence des cellules endothéliales qui est responsable de l'effet vasodilatateur de l'ACh.

L'exposition *ex vivo* d'artères à l'ACh dans des cuves à organes isolés est utilisé en tant que mesure de la fonction endothéliale.

### I.E.1.3. Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux sensoriel

Les nerfs moteurs sensoriels peuvent non seulement envoyer des signaux afférents au système nerveux central lors de l'activation des terminaisons périphériques, mais aussi provoquer une vasodilatation périphérique antidromique par la libération de neurotransmetteurs, ce qui constitue un mécanisme réflexe local. Les neurones moteurs sensoriels sont activés par une variété de stimuli physiques et chimiques et utilisent la substance P (SP) et le CGRP (peptide lié au gène de la calcitonine) comme neurotransmetteur (Maggi & Meli, 1988; Kawasaki *et al.*, 1988). Ces neuropeptides se fixent sur des récepteurs où ils vont déclencher ou amplifier de nombreuses réactions inflammatoires par des mécanismes directs ou indirects. Le récepteur au CGRP est composé d'une protéine à sept domaines transmembranaires, la protéine CRLR (calcitonin receptor-like receptor), et d'une protéine chaperon appelée RAMP (receptor activity-modifying protein). La protéine CRLR n'est pas fonctionnelle seule et elle doit être co-exprimée avec RAMP1 pour que soit créé un récepteur actif du CGRP. En présence de la RAMP2, la protéine CRLR produit un récepteur de l'adrénomédulline, autre membre de la famille des peptides CGRP (McLatchie *et al.*, 1998). Le CGRP induit une vasodilatation par différents mécanismes : la diminution de la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire, la réduction de la sensibilité de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$ , la production d'AMPc, l'activation de canaux potassiques et la libération de NO. Ces mécanismes par lesquels le CGRP dilate les vaisseaux sanguins varient dans les différents lits vasculaires (Bell & McDermott, 1996). La substance P libérée par les terminaisons se fixe sur des récepteurs à neurokinines de type 1 (NK1) des mastocytes, provoquant leur dégranulation et la libération de nombreuses substances bio-actives dont l'histamine responsable de la vasodilatation locale. La substance P provoque également la libération de sérotonine (5HT) à partir des plaquettes sanguines.

Ces neuropeptides libérés par les nerfs moteurs sensoriels jouent ainsi des rôles déterminants dans les processus complexes de la réponse inflammatoire en stimulant la vasodilatation mais également l'hypersensibilité de la zone lésée afin de la préserver d'une autre atteinte.

## I.E.2. Influence de l'endothélium sur le tonus vasculaire

De par sa localisation à l'interface entre le sang et la paroi musculaire lisse des vaisseaux sanguins, l'endothélium vasculaire joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire. Il ne se limite pas à une simple barrière physico-chimique entre le milieu circulant et la paroi vasculaire mais en réponse à divers stimuli, il libère de nombreux facteurs vasoactifs et ainsi participe à la régulation de fonctions essentielles telles que la vasomotricité et la croissance musculaire lisse mais aussi l'angiogenèse, l'agrégation plaquettaire, la coagulation et des réponses inflammatoires. Ces multiples propriétés font de l'endothélium vasculaire un organe à part entière et ce chapitre se limite à la description de ses effets sur le tonus.

Les travaux fondateurs de Robert Furchgott ont démontré que la destruction de la couche endothéliale des artères isolées supprime la réponse relaxante à l'Ach *in vitro* (Furchgott & Zawadzki, 1980). Cette simple expérience a profondément modifié la perception du contrôle local du tonus vasculaire et a mis en lumière que les cellules endothéliales peuvent induire une relaxation artérielle grâce à la libération d'un facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF). Par la suite, l'EDRF a été identifié comme étant le NO qui a servi de fondement à l'attribution du Prix Nobel de médecine et de physiologie en 1998 à Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferid Murad. Toutefois, la libération de NO ne représente pas le seul processus permettant de provoquer des changements vasomoteurs dépendant de l'endothélium. Ainsi, d'autres dérivés de l'endothélium (facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium, EDHFs) et l'ouverture de jonctions gap peuvent engendrer une hyperpolarisation du ML vasculaire sous-jacent et cela indépendamment du NO (Busse *et al.*, 2002; Feletou & Vanhoutte, 2007). En outre, les cellules endothéliales peuvent produire et libérer des substances vasoconstrictrices (facteurs contractants dérivés de l'endothélium, EDCFs) (Vanhoutte *et al.*, 2005; Vanhoutte & Tang, 2008). Lorsque la capacité des cellules endothéliales à libérer le NO et à induire une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium est réduite, et si la propension à produire des EDCFs est accrue, une dysfonction endothéliale apparaît et semble être la première étape dans la succession des événements menant à des pathologies cardiovasculaires telle que l'athérosclérose (Vanhoutte & Shimokawa, 1989; Vanhoutte, 1997; Feletou & Vanhoutte, 2006).



### I.E.2.1. Les substances relaxantes dépendantes de l'endothélium (EDRF)

La vasorelaxation dépendante de l'endothélium en réponse à des médiateurs neuro-hormonaux et des forces physiques, telles que la contrainte de cisaillement exercée par le flux sanguin, est généralement attribuée à la libération de NO et/ou de prostacycline (PGI<sub>2</sub>) (Moncada & Vane, 1979; Furchgott & Vanhoutte, 1989). Cependant, dans de nombreux vaisseaux sanguins provenant d'espèces différentes, ces réponses ne peuvent pas être totalement expliquées par la libération de ces deux médiateurs. Les relaxations observées en présence d'inhibiteurs de cyclooxygénase (COX) et de NOS, sont souvent associées à une hyperpolarisation des CMLV et donc attribuées à un facteur endothélial non-caractérisé appelé EDHF. L'acronyme "EDHF" s'avère être source de confusion car il implique qu'une substance diffusible unique contrôle ce type de relaxation dépendante de endothélium. Toutefois, la participation de ces trois mécanismes dans le processus de relaxation dépendante de l'endothélium dépend du lit vasculaire et de l'espèce étudiés. Dans l'aorte de rat, la voie du NO est de loin la plus importante et la contribution de la prostacycline et des EDHF est minoritaire (Xu *et al.*, 2007b).

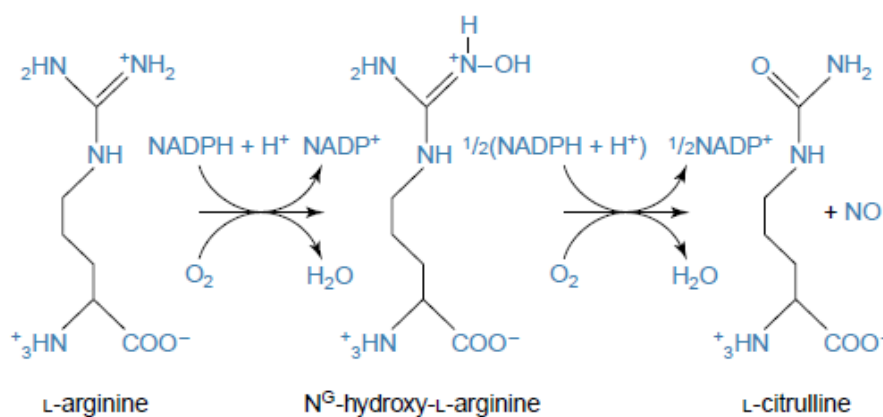
#### I.E.2.1.1. Le NO et la voie GMPc/PKG

Dans son article fondateur, Robert Furchgott a démontré (en utilisant des artères en cascade, l'une avec et les autres sans endothélium, où les réponses contractiles sont mesurées seulement dans les artères sans endothélium) que la suppression de la couche endothéliale d'artères isolées prévient la réponse relaxante à l'Ach observée *in vitro* (Furchgott & Zawadzki, 1980). Des tests d'activité biologique ont démontré que cet effet relaxant dépendant de l'endothélium est attribuable à la diffusion d'une substance vasodilatatrice puissante à partir des cellules endothéliales vers les CMLV. Face à la nature inconnue du médiateur, il a inventé ce terme d'EDRF. Il est rapidement apparu de façon convaincante que l'EDRF, quel qu'il soit, avait le pouvoir de stimuler la guanylate cyclase soluble (GCs) dans les CMLV (Ignarro *et al.*, 1986; Ignarro *et al.*, 1986) qui catalyse la formation de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui initie la relaxation du ML vasculaire. De plus, cette substance est rapidement dégradée par l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Gryglewski *et al.*, 1986). Ces séries d'observations ont été fondamentales dans le processus de réflexion qui a conduit à la conclusion que l'EDRF identifié par Furchgott est le NO (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*,

1988). Ce radical libre gazeux joue le rôle de médiateur-relai pour de nombreuses substances vasorelaxantes comme la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'Ach ou l'ATP.

#### I.E.2.1.1.1. Le NO

Il est décrit comme un gaz instable, capable de diffuser rapidement et librement à travers la membrane cellulaire ; une caractéristique qui contrebalance sa très faible demi-vie (quelques millisecondes) et améliore ainsi son activité biologique élevée due à la présence d'un électron non apparié ou célibataire sur sa couche externe (Hanafy *et al.*, 2001). Il est issu de la transformation de la L-arginine en L-citrulline grâce à l'intervention de la NOS (**Figure 10**).



**Figure 10** : Biosynthèse du NO. (d'après (Wendehenne *et al.*, 2001))

Le NO peut réagir extrêmement rapidement avec des radicaux libres ce qui conduit à une inactivation irréversible de sa fonction de messager entraînant donc une vasoconstriction. Ce phénomène intervient dans différentes pathologies vasculaires comme l'HTA, l'athérosclérose ou encore la tolérance aux dérivés nitrés. L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> provenant de l'endothélium, du ML ou du sang circulant constitue le radical libre principal impliqué dans l'abolition de la capacité vasodilatatrice du NO (Zafari *et al.*, 1999). En condition normale, l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est transformé en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la superoxyde dismutase (SOD), mais sa vitesse de réaction avec le NO pour former l'ion peroxynitrique ONOO<sup>-</sup> entraînant son inactivation est plus rapide. La biodisponibilité du NO afin d'induire une vasorelaxation est donc conditionnée par les concentrations relatives de NO et de SOD.

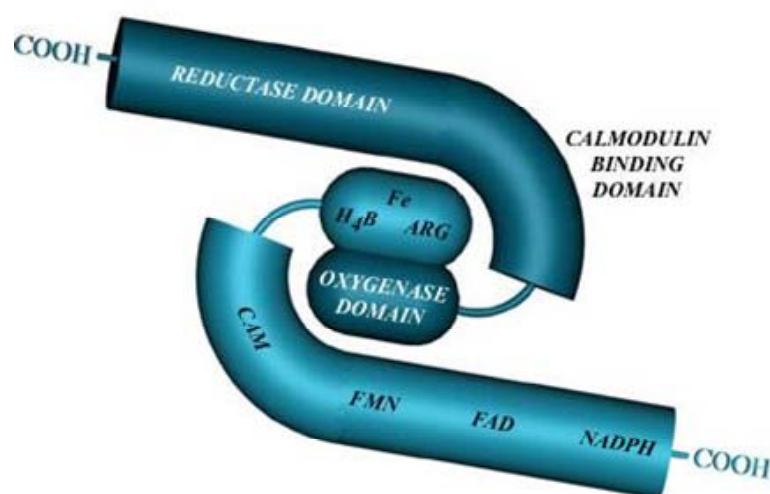
### I.E.2.1.1.2. Les NOS

Les trois isoformes de NOS identifiées sont issues de gènes différents et présentent une homologie de séquence de 50 à 60%. Deux formes constitutives et dépendantes de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sont distinguées, au niveau neuronal (nNOS ou NOS 1) et endothélial (eNOS ou NOS 3). Leur activation est sous la dépendance de plusieurs mécanismes passant le plus souvent par une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Presta *et al.*, 1997). La troisième forme (iNOS ou NOS 2) est essentiellement inductible dans des conditions de stress pathologique. L'activité des NOS constitutives s'exprime en dehors de toute stimulation ce qui engendre la production, pendant un temps très court mais de façon permanente, de picomoles de NO (Lamas *et al.*, 1992). À cette libération s'ajoutent des sécrétions accrues de NO sous l'action d'un certain nombre d'agonistes. La régulation transcriptionnelle de la eNOS est en partie distincte de l'autre isoforme exprimée de façon constitutive, nNOS, par le fait qu'elle peut être induite par les contraintes de cisaillement (shear stress).

La eNOS est une protéine de 135 kDa constituée d'une partie C-terminale avec un domaine oxygénase et une partie N-terminale avec un domaine réductase (**Figure 11**). Bien que le facteur clé déclenchant l'activité de la eNOS soit la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline sur son domaine réductase, le mode de régulation de cette enzyme fait également intervenir de multiples cofacteurs. En effet, lorsque la eNOS est sous sa forme inactive, elle se trouve dissociée de ses cofacteurs (NADPH,  $\text{BH}_4$ , FAD et FMN). Mais en présence d'une concentration suffisante d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (200 à 500 nmol/L) dans la cellule endothéliale provoquée par des agonistes vasorelaxants, elle peut activer l'oxygène et métaboliser la L-arginine.

Les domaines N- et C-terminaux sont reliés par une courte séquence sur laquelle se lie la calmoduline, qui est essentielle à l'activation complète de la eNOS. Cette interaction va faciliter le transfert d'électrons à partir du cofacteur  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) localisé au niveau du domaine réductase C-terminal vers la L-arginine grâce à l'intervention de flavines adénine dinucléotide (FAD) et mononucléotide (FMN). Les électrons vont alors interagir avec un hème au niveau de la partie oxydase N-terminal en présence de tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ) et d'oxygène pour synthétiser le NO et la L-citulline à partir de la L-arginine en deux étapes, où le  $\text{N}\omega$ -hydroxy L-arginine est formé comme

intermédiaire (Alderton *et al.*, 2001). Parce que les électrons transitent du domaine réductase d'un monomère de NOS vers le domaine oxygénase d'un autre monomère de NOS, la dimérisation de cette enzyme est nécessaire à son activité enzymatique et par conséquent à la production de NO. L'hème est un cofacteur essentiel pour la dimérisation de la eNOS, tandis que le BH<sub>4</sub> n'est pas nécessaire mais participe à la stabilisation du dimère tout comme la présence de zinc (Andrew & Mayer, 1999).



**Figure 11 : Représentation schématique de la structure des NOS.**  
(<http://www.rcdrg.sgul.ac.uk/research/nitric-oxide-1/synthesis>)

### *I.E.2.1.1.3. Régulation de l'activité de la eNOS*

L'activité de la eNOS est classiquement décrite comme dépendante de la concentration cytosolique en calcium dans la cellule endothéliale, via la liaison du complexe calcium-calmoduline, ainsi que par son état de phosphorylation/déphosphorylation (Fleming & Busse, 1999). A l'état de repos, la eNOS est localisée dans des microdomaines membranaires impliqués dans la transduction des signaux, les caveolae, par son interaction avec la cavéoline-1 qui inhibe son activité. Cette association réversible est levée par la fixation du complexe Ca<sup>2+</sup>-calmoduline à la eNOS dont l'affinité pour ce dernier est augmentée par sa liaison à la protéine Hsp90 (Heat Shock Protein-90) (Takahashi & Mendelsohn, 2003). L'association avec Hsp90 permet ensuite la phosphorylation de la eNOS par différentes

protéines kinases qui varient en fonction de la nature du stimulus (Shaul, 2002; Fleming & Busse, 2003).

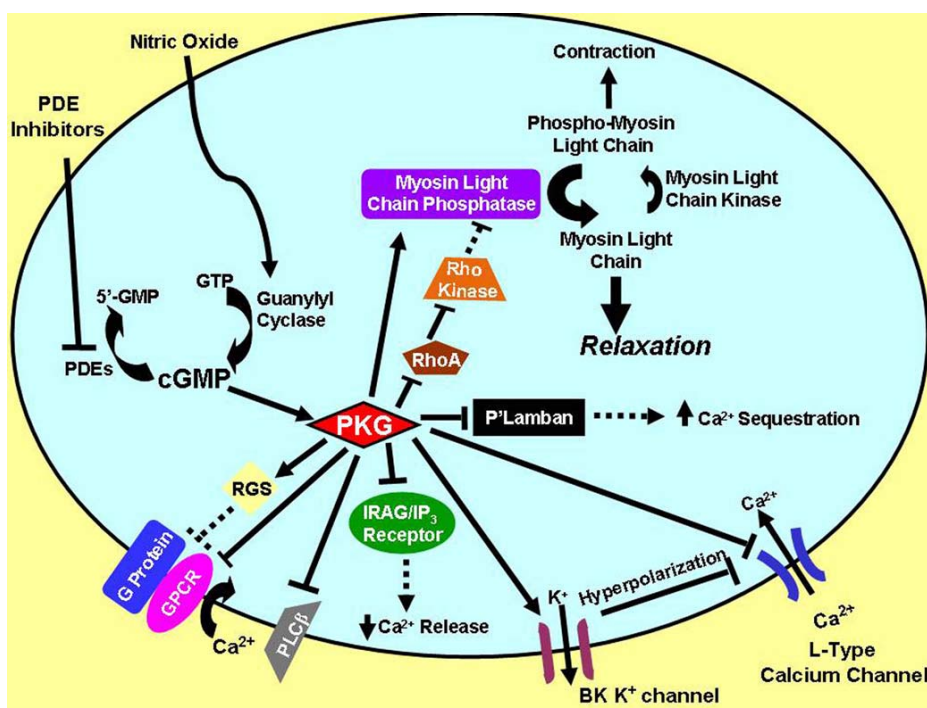
Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés sur la protéine eNOS. Deux acides aminés semblent particulièrement impliqués dans la régulation indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'activité de la eNOS murine et humaine, un résidu sérine ( $\text{Ser}^{1177}$ ) et un résidu thréonine ( $\text{Thr}^{495}$ ) (Jin *et al.*, 2003; Fleming & Busse, 2003; Schulz *et al.*, 2005). La phosphorylation de la eNOS sur le résidu  $\text{Ser}^{1177}$  augmente de 2 à 3 fois la production de NO par rapport au niveau basal. Il a notamment été montré que l'activation de la eNOS par les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin est médiée par sa phosphorylation via la voie PI3-kinase/Akt (Fulton *et al.*, 1999; Gallis *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999). Plusieurs autres kinases, comme la PKA, et certaines kinases appartenant à la famille des mitogen-activated protein kinases (MAPK) peuvent phosphoryler ce résidu  $\text{Ser}^{1177}$  et provoquer l'activation de la eNOS. D'autre part, la phosphorylation du résidu  $\text{Thr}^{495}$  par la PKC ou l'AMPK (AMP-activated protein kinase) réduit l'activité de la eNOS (Chen *et al.*, 1999; Michell *et al.*, 2001). La régulation de la phosphorylation de la eNOS implique aussi l'activité de protéines phosphatases 2A (PP2A; (Greif *et al.*, 2002; Church & Fulton, 2006)), PP1 (Schmitt *et al.*, 2009), et la calcineurine (PP2B; (Kou *et al.*, 2002)), mais leur contribution à la déphosphorylation de sites spécifiques de la eNOS demeure largement inexploré.

#### *I.E.2.1.1.4. Les cibles du NO*

Le NO formé par la eNOS diffuse de l'endothélium jusqu'aux CMLV où la sGC représente sa principale cible (Arnold *et al.*, 1977). La fixation du NO sur le groupement prosthétique (hème ferreux) de cette enzyme va induire la production de GMPc à partir de GTP (Poulos, 2006). L'augmentation de la concentration en GMPc, qui représente le second messenger principal de la voie du NO, active à son tour plusieurs cibles qui vont médier ses effets : la PKG ainsi que les phosphodiésterases (PDEs).

La PKG qui représente le principal médiateur intracellulaire du signal GMPc s'avère être le carrefour d'une cascade de multiples phosphorylations de cibles intracellulaires conduisant à la relaxation du ML (**Figure 12**). La PKG agit en diminuant la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  libre par plusieurs mécanismes : l'activation des SERCAs suite à la phosphorylation du phospholamban, l'inhibition des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants, l'activation des canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  et par la phosphorylation d'une protéine associée aux récepteurs

à l'IP<sub>3</sub>, l'IRAG (IP<sub>3</sub> Receptor-Associated-PKG substrat) permettant de limiter la libération de Ca<sup>2+</sup> du RS (Lincoln *et al.*, 2001). La PKG peut également agir sur l'appareil contractile du myocyte, en réduisant sa sensibilité au Ca<sup>2+</sup> par phosphorylation activatrice de la MLCP et en modulant les protéines associées aux filaments fins d'actine (voir paragraphe I.D.2). En plus de ces mécanismes dépendants du GMPc, des travaux ont mis en évidence que le NO pouvait dans certains territoires vasculaires induire une relaxation par l'activation directe de canaux potassiques du ML (Bolotina *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'activité de certaines PDEs (qui peuvent elle-mêmes dégrader le GMPc) peut être stimulée (PDE2) ou bloquée (PDE3) par le GMPc (voir paragraphe II.C).



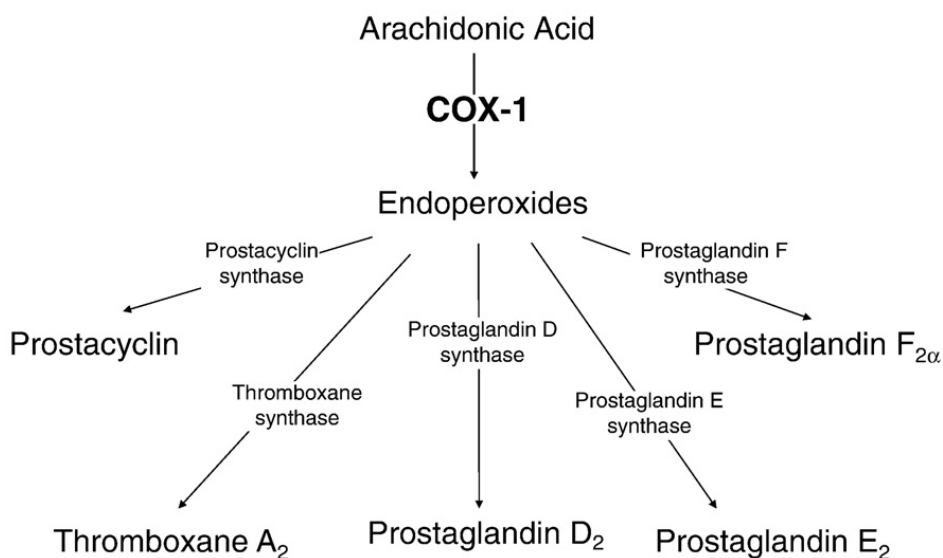
**Figure 12** : Cibles intracellulaires de la voie NO/GMPc favorisant la relaxation de la CML. (D'après (Francis *et al.*, 2010))

Il existe peu d'informations au niveau vasculaire sur les autres effecteurs du GMPc tels que les canaux sensibles aux nucléotides cycliques (CNG). Les cellules endothéliales peuvent exprimer les CNG (Zhang *et al.*, 2002), mais leur implication fonctionnelle n'est pas claire, car aucun phénotype cardiovasculaire n'a été rapporté chez les souris KO (Knock-out) CNG (invalidées pour le gène codant le CNG) (Biel *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 1999). Par ailleurs, il

a également été proposé que le signal GMPc puisse être contrôlé par la PKA. Etant donné que les domaines de liaison des nucléotides cycliques de la PKA et de la PKG sont similaires et qu'il existe une convergence biochimique et fonctionnelle entre les mécanismes qui sous-tendent la relaxation vasculaire induite par le GMPc et l'AMPc, il a été proposé une activation direct de la PKA par le GMPc dans certaines circonstances. Malgré le fait que le GMPc peut activer la PKA, il le fait avec une affinité 50 fois plus faible que l'AMPc (Pfeifer *et al.*, 1999). Ainsi cette hypothétique interaction de signalisation des nucléotides cyclique ne semble pas se produire dans le système cardio-vasculaire, *in vivo*, dans lequel le GMPc agit par des voies indépendantes de l'AMPc. Cependant, le GMPc peut inhiber la PDE3 à des concentrations similaires à celles qui activent la PKG et donc augmenter la concentration en AMPc en limitant sa dégradation ce qui peut aboutir à l'activation de la PKA.

#### I.E.2.1.2. La prostacycline

Historiquement, le premier EDRF a avoir été identifié est la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) (Moncada *et al.*, 1976). La PGI<sub>2</sub>, le principal métabolite de l'acide arachidonique, est produite avec d'autres prostaglandines (E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> et F<sub>2α</sub>) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) par les COX (**Figure 13**). Après sa synthèse, la PGI<sub>2</sub> diffuse vers le ML, où elle stimule essentiellement les récepteurs de type IP couplés à une protéine G<sub>as</sub> qui va activer l'AC et activer la voie AMPc/PKA (Bogatcheva *et al.*, 2005). Bien que la diminution de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et la réduction de la sensibilité de l'appareil contractile au Ca<sup>2+</sup> soient les principaux mécanismes conduisant à la relaxation du muscle lisse par ce système, la PGI<sub>2</sub> peut aussi provoquer une hyperpolarisation des myocytes vasculaires par l'ouverture de canaux potassiques, en particulier les canaux K<sub>ATP</sub> (Parkington *et al.*, 2004). Cette relaxation est toutefois finement équilibrée par les différents métabolites de l'acide arachidonique puisque d'autres prostaglandines et le TXA<sub>2</sub> sont responsables d'une vasoconstriction via l'activation des récepteurs TP. De plus, il a été démontré que lors de la contraction endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine observée dans les aortes de rats spontanément hypertendus (SHR) et Wistar-Kyoto âgés (WKY), la production de PGI<sub>2</sub> est nettement plus importante que celle des autres prostaglandines est serait ainsi l'EDCF principal (Numaguchi *et al.*, 1999; Gluais *et al.*, 2005b; Tang & Vanhoutte, 2008). Cela a été confirmé par les résultats qui montrent que le muscle lisse vasculaire des rats SHR perd la capacité de répondre à la relaxation à la PGI<sub>2</sub> qui devient alors un EDCF en activant les récepteurs TP (Gluais *et al.*, 2005b; Feletou *et al.*, 2009; Tang & Vanhoutte, 2009).



**Figure 13 : Métabolisme de l'acide arachidonique en prostanoides.**  
(D'après (Tang & Vanhoutte, 2009))

#### I.E.2.1.3. Les substances hyperpolarisantes dépendantes de l'endothélium (EDHF)

Bien que la PGI<sub>2</sub> et le NO aient été identifiés comme les deux principaux dérivés impliqués dans le phénomène de vasorelaxation dépendante de l'endothélium, le fait que cette dernière persiste dans certaines situations après l'inhibition de ces deux voies a suggéré l'existence d'un mécanisme supplémentaire défini comme dépendant de l'endothélium, mais indépendant du NO et de la PGI<sub>2</sub> (Komori *et al.*, 1988). Puisque cette relaxation résiduelle dépendante de l'endothélium se caractérise par une hyperpolarisation des CMLV, et s'avère être abrogée par l'application d'inhibiteurs de canaux potassiques ou par une solution hyperpotassique dépolarisante, le médiateur chargé de cet événement a été nommé EDHF (Taylor & Weston, 1988).

Il existe une variabilité concernant l'implication de cet EDHF dans la relaxation dépendante de l'endothélium entre les espèces et les lits vasculaires. Toutefois, il est prédominant dans les petites artères de résistances comme les artères mésentériques et en règle générale sa contribution augmente lorsque le diamètre des vaisseaux diminue (Tomioka *et al.*, 1999).

Le mécanisme de base de la réponse médiée par les EDHF peut être divisé en deux parties en fonction de la localisation des événements. La première étape qui a lieu au niveau



de l'endothélium consiste en une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , l'activation de canaux  $\text{K}^+$  dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) et l'efflux d'ions  $\text{K}^+$  ce qui conduit à l'hyperpolarisation rapide des cellules endothéliales. La seconde étape reflète le mécanisme par lequel une hyperpolarisation endothéliale est transférée aux CMLV. Ainsi, la sécrétion de facteurs paracrines et/ou la génération de signaux susceptibles de diffuser à travers les membranes et par les jonctions gap myoendothéliales vont parvenir jusqu'aux CMLV et produire leurs effets. Au niveau des CMLV, les EDHF activent des canaux  $\text{K}^+$  et entraînent une hyperpolarisation dépendante de l'endothélium qui s'accompagne de la fermeture des canaux calciques voltage-dépendant pour aboutir à la relaxation (Busse *et al.*, 2002).

La réponse induite par les EDHF fait intervenir plusieurs canaux  $\text{K}^+$  localisés dans les cellules endothéliales et les CMLs. Les trois sous types de canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de large ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ), intermédiaire ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) et faible ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) conductances ainsi que les canaux  $\text{Kir}$  sont présents dans la paroi vasculaire mais avec une localisation cellulaire et subcellulaire très spécifique. Les canaux  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  endothéliaux sont les éléments clés de l'initiation de ce phénomène d'EDHF qui va ensuite se propager aux CML et faire intervenir les canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{Kir}$  (Marrelli *et al.*, 2003; Gluais *et al.*, 2005a). Plusieurs voies de transmission de l'hyperpolarisation vers les myocytes vasculaires par le mécanisme d'EDHF ont été décrites. De manière générale, deux mécanismes principaux permettent d'expliquer la transmission de l'hyperpolarisation à la CML, la production de facteurs endothéliaux diffusibles et le contact intercellulaire direct.

Les facteurs diffusibles dérivés de l'endothélium sont des substances qui sont capables de passer à travers la lame élastique interne et atteindre les CMLV sous-jacentes à une concentration suffisante pour activer des canaux  $\text{K}^+$ , et initier l'hyperpolarisation du ML. Ces facteurs divers et variés incluent notamment le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) mais également le  $\text{K}^+$  lui-même. L'activation des canaux  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  des cellules endothéliales provoquerait un efflux d'ions  $\text{K}^+$  dans l'espace extracellulaire qui pourrait alors stimuler les canaux  $\text{Kir}$  et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase des CMLV. L'ion  $\text{K}^+$  pourrait donc agir lui-même comme un EDHF (McNeish *et al.*, 2005). Les EETs, produits du métabolisme de l'acide arachidonique par le cytochrome P-450 monooxygénase au sein de la cellule endothéliale, ont la capacité d'induire une vasorelaxation soit par l'activation des canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  par l'intermédiaire d'une protéine  $\text{G}_{\text{as}}$  soit par l'activation indirecte des canaux  $\text{Kir}$  et de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase des CMLV (Campbell &

Falck, 2007). Des travaux suggèrent que le couplage des EETs aux protéines  $G_{\alpha s}$  se fait par un récepteur membranaire (Li & Campbell, 1997) (Node *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2002) ou par un site de liaison (Wong *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000). Cependant, ces partenaires restent à être caractérisés dans les CMLV et des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier les mécanismes d'action des EETs.

La transmission de l'hyperpolarisation et du signal vasorelaxant de la cellule endothéliale aux CMLV est aussi permise par la présence de jonctions gap myoendothéliales. Ces contacts s'établissent de manière discontinue au travers de la lame élastique interne et sont d'autant plus exprimés que le diamètre des vaisseaux diminue (Hill *et al.*, 2002). Les variations du potentiel de membrane des cellules endothéliales sont transmises aux myocytes par couplage électrique direct à travers les jonctions myoendothéliales, induisant une coordination des réponses entre les cellules endothéliales et les CMLV menant à la modulation globale du tonus vasculaire (Sokoya *et al.*, 2006). Plusieurs études ont montré une association étroite entre les canaux  $IK_{Ca}$  et  $SK_{Ca}$  endothéliaux, la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase des CMLV et les connexines, protéines constitutives des jonctions gap (Sandow *et al.*, 2006; Isakson *et al.*, 2007). Leur regroupement dans des microdomaines localisés au niveau des projections des cellules endothéliales, à proximité des jonctions gap myoendothéliales, procure un environnement optimal pour l'efflux d'ions  $K^+$  dans le but d'amplifier ou d'initier les réponses EDHF dans les CMLV (Dora *et al.*, 2008). Outre la transmission de l'hyperpolarisation par couplage électrique direct, il peut y avoir un transfert de charges et de petites molécules de signalisation ( $AMPc$ ,  $IP_3$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ) entre les cellules endothéliales et les CMLV à travers les jonctions gap. L' $AMPc$  est capable d'activer les canaux  $BK_{Ca}$  musculaires par phosphorylation via la PKA (Griffith & Taylor, 1999).

Le terme d'EDHF représente un mécanisme plutôt qu'un facteur spécifique dont la contribution varie en fonction du lit vasculaire et du diamètre des vaisseaux. Bien que sa nature reste controversée, il est un vasodilatateur majeur dans les artères de résistances où il joue un rôle physiologique crucial alors que sa participation dans les artères de conductance est faible.

### **I.E.2.2. Les substances contractantes dépendantes de l'endothélium (EDCF)**

En plus de leur rôle essentiel dans les réponses vasodilatatrices en libérant des facteurs relaxants, les cellules endothéliales de certaines artères et des veines peuvent aussi initier la contraction du ML vasculaire qui les entoure (Vanhoutte & De Mey, 1983). Intuitivement, les contractions dépendantes de l'endothélium pouvaient s'expliquer soit par la diminution des signaux relaxants endothéliaux ( $\text{PGI}_2$ , NO, EDHF), soit par la production de substances vasoconstrictrices. Au fil du temps, il est devenu évident que les prostanoïdes, dérivés de la COX endothéliale, sont responsables de la plupart des contractions médiées par l'endothélium (Vanhoutte *et al.*, 2005). En effet, très rapidement, des études ont démontré que des inhibiteurs non-sélectifs des COX prévenaient les contractions dépendantes de l'endothélium (Miller & Vanhoutte, 1985).

L'événement déclenchant la production et la libération des EDCFs est une augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules endothéliales. Une mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à une stimulation des récepteurs muscariniques par l'Ach, ou purinergiques par l'ATP, va initier la production d'EDCF, tout comme l'application du ionophore calcique A23187 (Katusic *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 2007). Le  $\text{Ca}^{2+}$  va ensuite activer la phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) et plus particulièrement la  $\text{cPLA}_2$  (dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ ) qui présente une sélectivité importante envers les phospholipides contenant de l'acide arachidonique (Burke & Dennis, 2009). L'acide arachidonique qui constitue le précurseur des prostaglandines le plus abondant est converti en endoperoxide par l'activité d'enzymes spécifiques, les COX. Les endoperoxides sont convertis en  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{TXA}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  et/ou  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par leurs synthases respectives (Bos *et al.*, 2004). Les deux isoformes de COX, COX-1 et COX-2, ont la même capacité à catalyser la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines (Garavito & DeWitt, 1999). L'inhibition sélective de COX-1 qui est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus abroge les contractions dépendantes de l'endothélium dans l'aorte de rat, alors que l'inhibition de l'isoforme inductible COX-2 n'a pas d'effet (Yang *et al.*, 2003; Ospina *et al.*, 2004). La COX-1 est aussi bien exprimée dans les cellules endothéliales que dans les CMLVs, mais la surexpression de cette isoforme observée dans l'aorte de rats SHR est quant à elle limitée aux cellules endothéliales (Tang & Vanhoutte, 2008). De même, des expériences démontrent que seule l'activation de la COX endothéliale contribue à la génération de l'EDCF diffusible dans l'aorte de rat SHR (Yang *et al.*, 2003) et lors du vieillissement (Heymes *et al.*,

2000). L'ensemble de ces travaux indique que la COX-1 est l'isoforme constitutive préférentielle qui intervient lors des contractions dépendantes de l'endothélium dans les grandes artères des rongeurs. Cependant, avec le vieillissement ou la maladie, la COX-2 peut être induite et contribuer à la réponse de l'EDCF (Camacho *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2008).

L'endothélium produit d'autres substances pouvant provoquer une vasoconstriction :

- Les **espèces réactives de l'oxygène** (ERO) sont générées durant le cycle d'activité normale du métabolisme, mais leur surproduction entraîne un stress oxydatif qui est couramment observée dans l'HTA, le diabète et l'athérosclérose. Lors de la génération de prostanoïdes par les COX, les ERO sont formées comme produits dérivés. Les ERO impliquées dans les réponses dépendantes de l'endothélium comprennent l' $O_2^{\cdot-}$ , le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et l' $H_2O_2$ . Ces ERO peuvent agir soit directement comme EDCF soit indirectement en réduisant la biodisponibilité du NO et en activant les COX dans les CMLVs (Tang & Vanhoutte, 2009). Des études ont notamment montré, dans l'aorte de rat SHR, que la contraction dépendante de l'endothélium provoquée par l'Ach ou le ionophore calcique A23187 est accompagnée d'une augmentation de la production d'ERO (Tang *et al.*, 2007) qui peut entraîner une sensibilisation de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$  des CML via l'activation de la voie de signalisation Rho/Rho kinase (Jin *et al.*, 2004).

- L'**endothéline**, un peptide de 21 acides aminés, agit sur les CMLs via deux récepteurs appartenant à la superfamille des RCPG:  $ET_A$  et  $ET_B$  (Sakurai *et al.*, 1990; Arai *et al.*, 1990). Il existe 3 isopeptides d'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3), mais seule l'ET-1 est produite en condition normale. Les rôles spécifiques des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  ne sont pas encore complètement élucidés mais il est traditionnellement admis que le récepteur  $ET_A$  intervient dans la réponse vasoconstrictrice et proliférative des CMLs, associée à l'HTA, au diabète et d'autres maladies cardio-vasculaires et par conséquent est considéré comme le «mauvais» récepteur à l'endothéline. La liaison de l'ET-1 aux récepteurs  $ET_A$  des CMLs stimule la formation d' $IP_3$  et de DAG par l'intermédiaire de la PLC. L'augmentation de la force contractile est la conséquence d'une libération de  $Ca^{2+}$  du RS mais également de l'inhibition de la MLCP via l'activation de la voie Rho/Rho kinase. Les cellules endothéliales vasculaires expriment aussi des récepteurs à l'endothéline, exclusivement de type  $ET_B$ , qui provoquent la libération de substances vasodilatatrices telles que le NO et la  $PGI_2$  (Miyachi & Masaki, 1999). Ce mécanisme de vasodilatation disparaît dans des situations pathologiques

reflétant un changement de profil d'expression de ces récepteurs dans ces conditions (Verhaar *et al.*, 1998; Bohm *et al.*, 2002). En effet, l'action de l'ET-1 sur les récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux semble prévenir l'apparition d'une dysfonction endothéliale, comme il a récemment été montré dans un modèle murin KO pour le récepteur ET<sub>B</sub> endothélial (Bagnall *et al.*, 2006).

## **II. Voie de l'AMPc dans le système vasculaire**

L'AMPc (tout comme le GMPc) régule une grande variété de processus dans la plupart des cellules, y compris celles du système cardiovasculaire. Ainsi, au niveau vasculaire, les agents provoquant une élévation de l'AMPc ont des effets à court terme, tels que la relaxation du ML, et à long terme tels que la modulation de l'expression de gènes et l'inhibition de la prolifération et de la migration des CMLV. De plus, l'AMPc régule dynamiquement la perméabilité vasculaire assurée par l'endothélium, ainsi que la capacité des cellules endothéliales à libérer des facteurs vasoactifs ou chimiotactiques.

Les niveaux d'AMPc intracellulaires sont finement contrôlés par leur synthèse grâce à l'AC mais également par leur dégradation par des enzymes spécifiques (PDE) capables d'hydrolyser l'AMPc en 5'AMP qui devient alors inactif, ou par son extrusion de la cellule via les protéines d'efflux multidrug-resistance protein (MRP).

La diversité des fonctions de l'AMPc est susceptible d'être associée à différentes organisations spatio-temporelles des réponses associées. Cette régulation dépend de l'organisation de plusieurs complexes macromoléculaires composés de nombreux partenaires impliqués dans la voie de signalisation de l'AMPc tels que les RCPG couplés à  $G_s$  (tels que les récepteurs  $\beta$ -AR, les récepteurs IP...), les AC, les PDE, les PKA et les protéines d'ancrage. Parmi ces partenaires, les récepteurs  $\beta$ -AR constituent un élément clé physiologique d'activation de cette voie, alors que les PDEs jouent un rôle crucial dans la régulation de l'intensité, la durée et la compartimentation du signal AMPc intracellulaire.

### **II.A. Voie de synthèse de l'AMPc**

L'AMPc a été le premier second messenger identifié (Rall & Sutherland, 1958). Durant ces 50 dernières années, de nombreuses études ont permis d'élucider le rôle crucial de l'AMPc dans la réponse cellulaire à plusieurs hormones et neurotransmetteurs. La voie de l'AMPc présente un haut niveau de complexité du fait de ses interactions croisées avec de nombreuses autres cascades de signalisation (Fimia & Sassone-Corsi, 2001).

## II.A.1. Les récepteurs $\beta$ -AR vasculaires

### II.A.1.1. Structure et couplage des récepteurs $\beta$ -AR

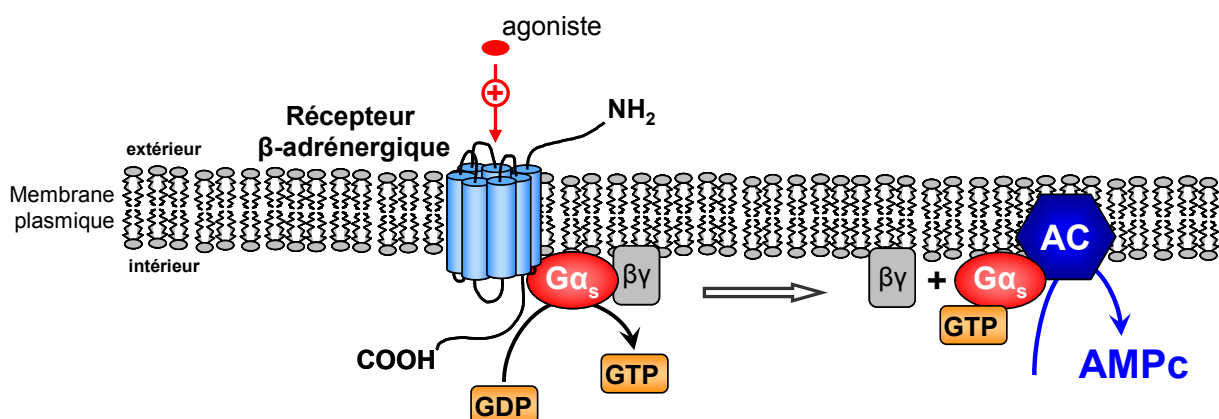
En 1948, Ahlquist a observé deux aptitudes dans la capacité relative de plusieurs agonistes sympathomimétiques à provoquer des réponses pharmacologiques à une série d'organes et a proposé la division des récepteurs adrénérgiques en deux types,  $\alpha$  et  $\beta$  (AHLQUIST, 1948). Cela a été par la suite confirmé par l'identification d'antagonistes sélectifs pour ces deux classes: la phentolamine et l'ergotamine pour les récepteurs  $\alpha$ -AR; la dichloro-isoprénaline (POWELL & SLATER, 1958) et le propranolol (BLACK *et al.*, 1964) pour les récepteurs  $\beta$ -AR. Par la suite, il a été démontré que les réponses aux stimulations  $\beta$ -AR peuvent être modulées de manière différente par certains agonistes et antagonistes suivant les tissus concernés tels que le muscle cardiaque et le muscle lisse bronchique, ce qui implique l'existence de sous-types de récepteurs  $\beta$ -AR ( $\beta_1$  dans le muscle cardiaque et  $\beta_2$  dans les bronches) (Furchgott, 1967; Lands *et al.*, 1967a; Lands *et al.*, 1967b). Ces deux récepteurs ont été clonés en 1987 et 1986, respectivement (Dixon *et al.*, 1986) (Frielle *et al.*, 1987). Durant les années 80, l'existence d'un récepteur  $\beta$ -AR atypique a été proposée sur des bases pharmacologiques. En 1989, un troisième sous-type de récepteur a été cloné (Emorine *et al.*, 1989). Ce sous-type  $\beta_3$  explique seulement en partie les effets des agonistes  $\beta$ -ARs qualifiés comme atypiques. Aussi, dans un premier temps plusieurs études ont suggéré l'existence d'un quatrième sous-type de  $\beta$ -AR appelé  $\beta_4$ -AR putatif (Oriowo, 1994) qui pouvait notamment expliquer la composante résistante au propranolol (antagoniste  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR) et à l'antagoniste sélectif  $\beta_3$ -AR (SR-59230) de la réponse relaxante à l'isoprénaline dans l'aorte de rat (Brawley *et al.*, 2000a). Il s'est finalement avéré que cette réponse était due à un état de faible activation du récepteur  $\beta_1$ -AR (Konkar *et al.*, 2000).

Les trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -AR sont codés par trois gènes différents localisés sur les chromosomes humains 10 ( $\beta_1$ ), 5 ( $\beta_2$ ) et 8 ( $\beta_3$ ) (Bylund *et al.*, 1994). Les catécholamines ont des propriétés agonistes sur les 3 sous-types de récepteurs, mais avec des affinités différentes : isoprénaline > NA  $\geq$  adrénaline pour les  $\beta_1$ -ARs; isoprénaline > adrénaline > NA pour les  $\beta_2$ -ARs et isoprénaline  $\geq$  NA > adrénaline pour les  $\beta_3$ -ARs avec une affinité plus faible que celle des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs (Lafontan, 1994).

Les récepteurs  $\beta$ -AR font partie des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, constitués de 22 à 28 acides aminés organisés en hélice  $\alpha$  et connectés entre eux par 3 boucles

intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. Leur domaine N-terminal est extracellulaire tandis que le domaine C-terminal est cytoplasmique. Le pont disulfure entre la cystéine 110 de la seconde et la cystéine 189 de la troisième boucle extracellulaire est essentiel à la fixation du ligand et à l'activité du récepteur de type  $\beta_2$ -AR (Moffett *et al.*, 1993). Les 7 segments transmembranaires forment une poche hydrophobe au sein du récepteur. La fixation du ligand adrénergique au niveau du récepteur induit un changement conformationnel des segments transmembranaires 3 à 6 qui permet le couplage entre le récepteur et la protéine G hétérotrimérique, alors activée.

A l'état inactif, les 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  constituant la protéine G hétérotrimérique sont associées et une molécule de guanosine diphosphate (GDP) est liée à la sous-unité  $\alpha$ . Après activation du récepteur  $\beta$ -AR, la sous-unité  $\alpha$  échange son GDP contre une guanosine triphosphate (GTP) et se dissocie des 2 autres sous-unités (**Figure 14**). La sous-unité  $\alpha$  et le complexe  $\beta$ - $\gamma$  seront responsables de la modulation d'effecteurs. L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$  permet l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui provoque l'association de la sous-unité  $\alpha$  au dimère  $\beta$  $\gamma$ . Ce processus d'inactivation de la protéine G est lui-même régulé par les protéines RGS (*regulator of G protein signaling*) qui accélèrent la capacité d'hydrolyse du GTP en GDP, et donc le retour rapide de la protéine G à l'état inactif (Pierce *et al.*, 2002; Cabrera-Vera *et al.*, 2003).



**Figure 14** : Couplage des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques aux protéines G hétérotrimériques.



Les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont respectivement codées par 16, 5 et 12 gènes différents, permettant de multiples combinaisons et assurant ainsi la spécificité des réponses cellulaires. Les sous-unités  $\alpha$  sont regroupées en quatre familles selon leur séquence primaire et leur fonction, dont les familles  $\alpha_s$  stimulatrices et  $\alpha_i$  inhibitrices vis-à-vis de l'AC. Les récepteurs  $\beta$ -AR sont classiquement décrits comme étant couplés à une protéine  $G_s$ , soit à l'activation de l'AC et la production et l'accumulation du second messager intracellulaire, l'AMPc qui sera responsable de l'effet vasorelaxant. Cependant, les récepteurs  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -AR ont également été décrits comme couplés à une protéine  $G_i$  dans différents types cellulaires, tels que les cardiomyocytes (ASANO *et al.*, 1984; Xiao *et al.*, 1995) (Gauthier *et al.*, 1996). Au niveau vasculaire, ce couplage à la protéine  $G_i$  a été décrit pour le récepteur  $\beta_2$ -AR endothélial dans les cellules HUVEC (Queen *et al.*, 2006), l'artère carotide de rat (Cicarelli *et al.*, 2007) et l'artère pulmonaire de rat (Banquet *et al.*, 2011). Le couplage du récepteur  $\beta_3$ -AR vasculaire à la protéine  $G_i$  a été peu évalué, si ce n'est dans l'aorte de rat, où il a été montré que la toxine pertussique (inhibant cette famille de protéines) n'altère pas la relaxation  $\beta_3$ -adrénergique, ce qui suggère que la protéine  $G_i$  n'est pas impliquée dans cette réponse (Rautureau *et al.*, 2002). Enfin, le couplage des récepteurs  $\beta$ -AR aux protéines  $G_s$  et  $G_i$  varierait en fonction de l'âge. Il a été montré que la stimulation  $\beta$ -AR active principalement la protéine  $G_s$  dans l'aorte de rats jeunes (1 mois), alors que dans l'aorte de rats adultes (3 à 6 mois), l'activation de cette protéine  $G_s$  est diminuée au profit de l'activation de la protéine  $G_i$ , ce qui contribuerait à une diminution de la relaxation  $\beta$ -adrénergique avec l'âge (Baloglu *et al.*, 2007).

### II.A.1.2. Effets vasorelaxants $\beta$ -adrénergiques

Les travaux de l'équipe de Lands (Lands *et al.*, 1967a; Lands *et al.*, 1967b) suggéraient que les récepteurs  $\beta$ -AR du système vasculaire périphérique étaient exclusivement de type  $\beta_2$ . Par la suite, grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes plus sélectifs, d'autres études ont montré que la relaxation du ML vasculaire est le résultat de l'activation des récepteur adrénergiques de type  $\beta_2$  mais aussi  $\beta_1$ . Ultérieurement, de nombreux travaux ont également suggéré l'implication d'un troisième sous-type de récepteur  $\beta$ -AR dans la réponse relaxante induite par une stimulation  $\beta$ -adrénergique. Ainsi, l'effet d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique non sélectif a été attribué non seulement à l'activation des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR, mais aussi à celle d'un récepteur supplémentaire. Cette composante de la relaxation induite par l'isoprénaline résistante au propranolol, un antagoniste  $\beta$ -AR, a notamment été observée dans l'aorte (Gray & Marshall, 1992; Oriowo, 1995) et l'artère mésentérique (Sooch & Marshall,

1997) de rat, et attribuée à une stimulation de récepteurs dits atypiques. L'implication du récepteur  $\beta_3$ -AR dans ces effets a été ensuite confirmée par l'utilisation d'agonistes  $\beta_3$ -AR sélectifs (Trochu *et al.*, 1999; Rozec *et al.*, 2005; Dessy *et al.*, 2005). Ainsi, les trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -AR participent à l'effet vasorelaxant  $\beta$ -adrénergique. Cependant, la contribution respective de ces 3 sous-types et les voies de signalisation impliquées (et notamment la localisation endothéliale de ces récepteurs) varient en fonction du lit vasculaire, du diamètre des artères et de l'espèce considérés. De plus, la relaxation produite par une stimulation  $\beta$ -AR est dépendante de l'agent précontractant et du degré de précontraction (Guimaraes, 1975; Begonha *et al.*, 1995).

○ Artère de conductance

Dans les artères de conductance telles que l'aorte, les 3 sous-types de récepteurs  $\beta$ -ARs sont présents, mais le sous-type  $\beta_2$  est prédominant (Oriowo, 1995; Brawley *et al.*, 2000a). Diverses études ont montré que la relaxation induite par l'isoprénaline persiste en présence d'antagonistes  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR (Gray & Marshall, 1992; Oriowo, 1995; Souch & Marshall, 1997) et que des agonistes sélectifs  $\beta_3$ -ARs (BRL 37344, SR 58611A) provoquent une vasorelaxation insensible au blocage des sous-types  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR mais inhibée par un antagoniste  $\beta_3$ -AR (Trochu *et al.*, 1999), ce qui conforte le rôle fonctionnel du sous-type  $\beta_3$  dans l'aorte de rat précontractée à la NA. Cependant, ces travaux ont été contestés, notamment par Brahmadevara *et al.*, qui n'ont pas montré d'inhibition de la relaxation induite par ces deux agonistes sélectifs  $\beta_3$ -AR en présence de cet antagoniste  $\beta_3$ -AR, dans l'aorte de rat précontractée à la phényléphrine (Brahmadevara *et al.*, 2003). Il est à noter, que dans cette étude, la relaxation à l'isoprénaline comporte une composante insensible au propranolol après précontraction à la phényléphrine, composante qui est absente après précontraction à la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Brahmadevara *et al.*, 2003). Ceci soulève l'importance de l'agent précontractant dans la nature de la relaxation  $\beta$ -adrénergique.

Une question qui reste encore controversée et discutable est la participation des récepteurs  $\beta$ -ARs endothéliaux dans cette relaxation  $\beta$ -adrénergique. Ainsi, certaines études ont montré que la suppression de l'endothélium ou les inhibiteurs de la NOS n'avaient aucune influence sur la relaxation à l'isoprénaline dans l'aorte thoracique de rat (Konishi & Su, 1983; Moncada *et al.*, 1991; Eckly *et al.*, 1994; Satake *et al.*, 1996), alors que d'autres menées sur la même préparation tissulaire ont démontré que la suppression de l'endothélium réduisait, soit

totalemment, soit partiellemment, la relaxation induite par l'isoprénaline (Grace *et al.*, 1988; Kamata *et al.*, 1989; Gray & Marshall, 1992; Delpy *et al.*, 1996; Trochu *et al.*, 1999; Ferro *et al.*, 1999; Brawley *et al.*, 2000a; Brawley *et al.*, 2000b). L'ensemblé de ces études suggèrent que l'efféet relaxant de l'isoprénaline implique une composante dépendante et une autre indépendante de l'endothélium (Brawley *et al.*, 2000b). De multiples facteurs expérimentaux peuvent expliquer les contradictions observées dans ces différentes études, tels que la nature de l'agent pharmacologique utilisé afin de pré-contracter les vaisseaux (la phényléphrine, agoniste sélectif des récepteurs  $\alpha$ -AR, ou la NA qui active également les récepteurs  $\beta$ -AR) ou le degré de pré-contraction. Il est en effet connu que l'ampleur de l'efféet vasorelaxant est fortement tributaire du niveau du tonus pré-existant (Guimaraes, 1975). Or, le fait d'inhiber la production de NO endothélial provoque une diminution de l'efféet inhibiteur du NO basal sur le tonus musculaire, ce qui engendre une augmentation du tonus contractile induit par l'agent précontractant. Ainsi, dans ces conditions de désendothélialisation, il est important de tenir compte du niveau de précontraction sur lequel est réalisé la relaxation  $\beta$ -adrénergique. Eckly *et al.* ont ainsi observé que la relaxation à l'isoprénaline est identique sur des artères présentant ou non un endothélium fonctionnel, contractées à un même tonus en ajustant la concentration de NA (Eckly *et al.*, 1994), suggérant que l'endothélium n'est pas obligatoire dans la relaxation  $\beta$ -adrénergique. De plus, la voie du NO endothélial semble moduler par elle-même les réponses médiées par les sous-types  $\beta_1$  et  $\beta_2$  dans l'aorte de rat comme l'ont montré les travaux de Brawley *et al.* où l'application de NO exogène (nitroprussiate de sodium) restore l'efféet relaxant de l'isoprénaline, bloqué préalablement par le L-NAME, via une interaction avec la voie de signalisation des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR plutôt qu'avec celle des récepteurs  $\beta$ -AR atypiques (Brawley *et al.*, 2000a; Brawley *et al.*, 2000b). Or, une étude de Rascado et Bendhack suggère que la NA est capable d'activer la NOS endothéliale suite à la stimulation des récepteurs  $\alpha_2$ -ARs endothéliaux de l'aorte de rat. Le GMPc ainsi produit potentialiserait la réponse relaxante à l'isoprénaline (Rascado & Bendhack, 2005). Cette étude renforce l'idée que la nature de l'agent précontractant influence la nature de la relaxation  $\beta$ -adrénergique. Par ailleurs, l'âge est également un facteur modulateur de la relaxation  $\beta$ -adrénergique, tant sur la plan qualitatif que quantitatif (van der Zyppe *et al.*, 2000).

Pourtant, l'existence de récepteurs  $\beta$ -AR endothéliaux dans l'aorte a été confirmée par des études de liaison à l'aide de radioligands notamment dans des cellules endothéliales d'aortes bovines (Steinberg *et al.*, 1984), ou *in situ* par marquage immunohistochimique pour

le sous-type  $\beta_3$  dans l'aorte thoracique de rat (Rautureau *et al.*, 2002). De plus, la réponse relaxante à l'isoprénaline observée dans l'aorte de rat est inhibée par le bleu de méthylène, un inhibiteur de la GCs, indiquant que la voie du NO/GMPc endothéliale peut être activée par la stimulation  $\beta$ -ARs (Grace *et al.*, 1988; Gray & Marshall, 1992; Iranami *et al.*, 1996). Les effets relaxants d'un agoniste  $\beta_2$ -AR, l'albutérol, partiellement inhibés par un inhibiteur de NOS, et associés à une augmentation de la phosphorylation activatrice de la eNOS dans l'aorte de rat, suggèrent que ces récepteurs sont fonctionnels à la fois sur la CML et la cellule endothéliale (Ferro *et al.*, 2004). En ce qui concerne le récepteur  $\beta_3$ -AR, celui-ci serait majoritairement endothélial (Trochu *et al.*, 1999; Dessy *et al.*, 2004; Dessy *et al.*, 2005).

- Artères de résistance

Dans les artères de résistance telles que les artères mésentériques, l'activation des récepteurs  $\beta$ -AR provoque une vasorelaxation qui semble être principalement due au sous-type  $\beta_1$  (White *et al.*, 2001; Briones *et al.*, 2005). L'utilisation de souris  $\beta_1$ -KO et  $\beta_2$ -KO soutient cette théorie, car l'isoprénaline induit une relaxation des artères mésentériques des souris sauvages et  $\beta_2$ -KO qui est complètement abolie chez les souris  $\beta_1$ -KO (Chruscinski *et al.*, 2001). Toutefois, d'autres études rapportent que la relaxation adrénérgique observée dans ces artères de résistances implique la participation des récepteurs  $\beta_2$ -AR et de récepteurs  $\beta$ -AR atypiques (Chan *et al.*, 2002; Kozłowska *et al.*, 2003). Ces divergences concernant la contribution fonctionnelle des différents sous-types de récepteurs pourrait s'expliquer par les conditions expérimentales (agonistes  $\beta$ -AR utilisés, choix et préparation des vaisseaux...). En outre, la localisation cellulaire de ces récepteurs reste un sujet de débat puisque certaines études supportent l'idée que les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR provoquent la relaxation via la libération de NO par un mécanisme dépendant de l'AMPC dans l'endothélium (Graves & Poston, 1993; Chan *et al.*, 2002), alors que d'autres suggèrent que les récepteurs  $\beta_1$ -AR vasodilatateurs sont avant tout localisés dans les CML (Briones *et al.*, 2005) et exercent leurs effets de manières dépendante et indépendante de la PKA.

En conclusion, la stimulation  $\beta$ -adrénérgique induit une vasorelaxation dans les artères de conductance et de résistance. Cependant, la nature des récepteurs impliqués et la contribution exacte de l'endothélium dans cette réponse restent sujettes à discussion.

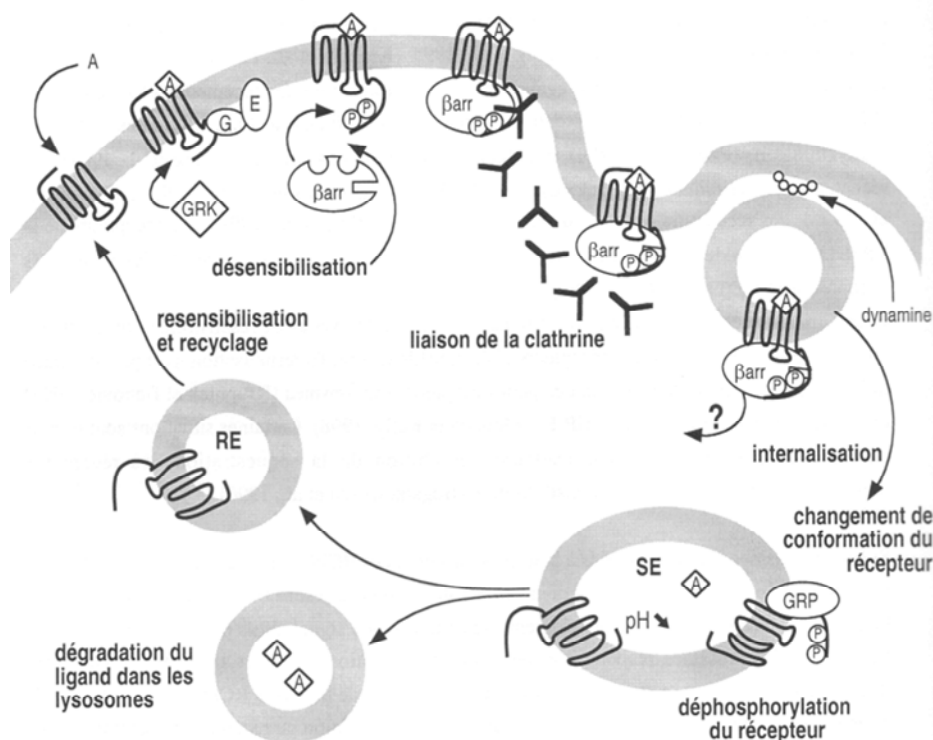
### II.A.1.3. Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les mécanismes de rétrocontrôle négatif des signaux RCPG existent à tous les niveaux, à partir des récepteurs et des protéines G jusqu'aux effecteurs. Dans certains cas, les enzymes de dégradation des seconds messagers sont recrutés à proximité des effecteurs activés en se liant à des protéines régulatrices des RCPG. Par exemple, certaines isoformes de PDE se lient directement aux  $\beta$ -arrestines, protéines impliquées dans le découplage physique des RCPG (Perry *et al.*, 2002; Baillie *et al.*, 2003). La stimulation des  $\beta_2$ -ARs provoque le recrutement  $\beta$ -arrestine-dépendant des isoformes PDE4D3 et PDE4D5 au récepteur, favorisant la dégradation de l'AMPc et l'accélération de la terminaison de l'activité PKA associée à la membrane. Le RCPG lui-même est la cible de régulation négative importante. Le processus principal qui régit la réactivité de la signalisation des RCPG au niveau du récepteur est la désensibilisation de ce dernier qui se manifeste par une diminution progressive de la réponse à l'agoniste. Cela mène à un découplage rapide du récepteur et de la protéine G qui résulte de leur phosphorylation par deux types de kinases, la PKA et les GRK (kinase des récepteurs couplés aux protéines G). Sept gènes codant pour des GRK (1 à 7) (Stoffel *et al.*, 1997) ont été clonés chez l'homme ; sur la base d'une homologie de leur séquence primaire, la famille des GRK a été subdivisée en trois sous-groupes : celui de la rhodopsine kinase (GRK1 et 7), celui des kinases spécifiques des  $\beta$ -ARs (GRK2 et 3) et celui de la GRK4 (GRK4, 5 et 6). La PKA phosphoryle les résidus sérine et thréonine des boucles cytoplasmiques et du domaine C-terminal des  $\beta$ -ARs ce qui entraîne un découplage rapide de la protéine  $G\alpha_s$  et qui peut même dans certains cas altérer la sélectivité du couplage à la protéine  $G\alpha_s$  en favorisant le couplage à la protéine  $G_i$  inhibitrice de l'AC (Daaka *et al.*, 1997; Zamah *et al.*, 2002). Comme cette phosphorylation ne requiert pas la fixation de l'agoniste sur le RCPG et qu'elle permet aussi la désensibilisation de récepteurs pour d'autres ligands, ce mécanisme a été qualifié de désensibilisation hétérologue (Freedman & Lefkowitz, 1996).

Comme la désensibilisation hétérologue, la désensibilisation homologue implique la phosphorylation du récepteur, dans ce cas par des GRK spécialisées, mais ce processus s'effectue en deux étapes où la phosphorylation sélective du récepteur lié à l'agoniste est suivie par la liaison d'une protéine arrestine, dont le rôle principal est de découpler physiquement le récepteur et la protéine G (**Figure 15**). Les GRK phosphorylent les RCPG sur leurs résidus sérine et thréonine dans la boucle 3 et la queue C-terminale. La seule phosphorylation par les GRK a peu d'effet direct sur le couplage récepteur-protéine G car la

fonction principale des GRK dans la désensibilisation des  $\beta$ -ARs est d'augmenter l'affinité du récepteur pour les  $\beta$ -arrestines. In vitro, la phosphorylation du  $\beta_2$ -ARs par GRK2 augmente l'affinité du récepteur pour la  $\beta$ -arrestine par 10 à 30 fois (Lohse *et al.*, 1992). En plus de son rôle dans la désensibilisation, la  $\beta$ -arrestine peut agir comme une protéine adaptatrice grâce à ses motifs de liaison à la clathrine sur sa queue C-terminale (Goodman *et al.*, 1996) qui facilite l'interaction des  $\beta$ -ARs avec les vésicules de clathrine et ainsi l'internalisation des récepteurs conduisant à leur dégradation et à leur recyclage (Kohout & Lefkowitz, 2003).

Contrairement aux récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs, les  $\beta_3$ -ARs ne présentent pas de sites de phosphorylation pour la PKA ou la GRK, et semblent donc réfractaires à la désensibilisation homologue ou hétérologue (Gauthier *et al.*, 2000).



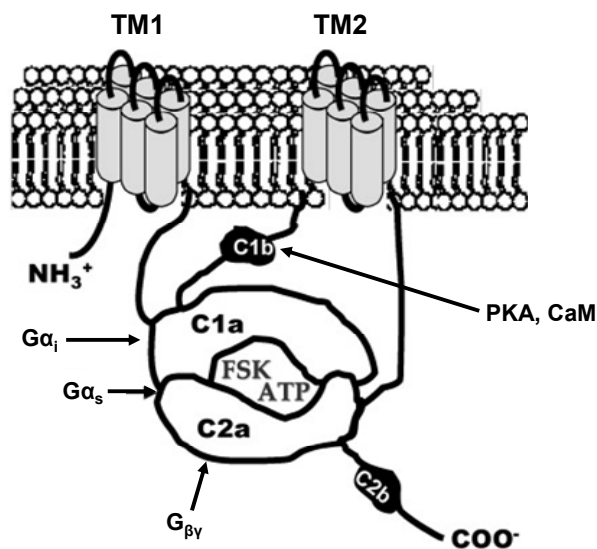
**Figure 15** : Représentation schématique de la désensibilisation et de la resensibilisation d'un RCPG après activation par l'agoniste. (D'après Ferguson et Caron, 1998)

$\beta$ -arr :  $\beta$ -arrestine, G : protéines G, A : agoniste, E : effecteur, SE : endosomes précoces, GRP : G-protein coupled receptor phosphatase.

### II.A.2. Les adénylates cyclases

L'AC constitue la seule source de synthèse du second messager AMPc qui régule de multiples aspects de la fonction vasculaire.

Les ACs sont exprimées dans tous les tissus. Dix AC ont été clonées et caractérisées depuis 1989, dont 9 sont membranaires (AC1-AC9) et l'une soluble (AC10) (Krupinski *et al.*, 1989; Hanoune & Defer, 2001). Les isoformes transmembranaires sont de larges protéines d'environ 120-140 kDa qui partagent une structure secondaire commune comprenant une extrémité N-terminale intracellulaire, deux régions transmembranaires (Tm1 et Tm2: chacune composée de six segments transmembranaires organisés en hélice  $\alpha$ ) séparées par une boucle cytoplasmique C1, et une extrémité C-terminale cytoplasmique appelée domaine C2 (**Figure 16**) (Krupinski *et al.*, 1989). Les domaines de liaison à l'ATP C1a et C2a sont les régions les plus conservées entre les isoformes d'AC et leur interaction forme le noyau catalytique. Les domaines C1a et C2a exprimés *in vitro* peuvent former une enzyme stimulable par la forskoline (FSK) et par une protéine  $G_{\alpha_s}$  (Sunahara *et al.*, 1996). Toutefois, dans la cellule intacte, ces deux domaines cytosoliques ne présentent pas une affinité suffisamment forte pour former un noyau catalytique stable et sont rapidement dégradés en l'absence des régions transmembranaires.



**Figure 16** : Structure schématique des adénylates cyclases.  
(Modifié de (Pavan *et al.*, 2009))

Des études montrent également une localisation spécifique des ACs dans des microdomaines membranaires tels que les rafts lipidiques (Ostrom & Insel, 2004) (Crossthwaite *et al.*, 2005) et des associations à des protéines d'ancrage (Dessauer, 2009), en

particulier les AKAPs (A-kinase anchoring proteins). L'ensemble de ces phénomènes contribuent à la formation de compartiments de l'AMPc (Dessauer, 2009).

Les ACs sont activées par la sous-unité  $\alpha_s$  de la protéine G, sauf l'AC soluble, qui n'est pas régulée par les protéines G (Buck *et al.*, 1999; Kamenetsky *et al.*, 2006). Les ACs membranaires, exceptées l'AC9, sont activées par la forskoline, un diterpène isolé de la racine d'une plante *Coleus forskolii*, qui se lie au site catalytique formé par l'association des domaines C1a et C2a. Elles sont inhibées par les inhibiteurs du site P (Johnson *et al.*, 1989) qui sont des petites molécules analogues de l'adénosine (3'-AMP, 2'-deoxy-3'-AMP). Cependant, les différentes isoformes d'AC présentent une grande diversité concernant leurs mécanismes de régulation. Par conséquent, les membres de la famille peuvent être divisés en groupes selon l'homologie de leur séquence en acides aminés et leurs mécanismes de régulation (Sunahara *et al.*, 1996; Ishikawa & Homcy, 1997; Patel *et al.*, 2001). Le groupe 1 comprend les AC1, AC3 et AC8, qui sont régulées par le  $Ca^{2+}$  et la calmoduline (Bakalyar & Reed, 1990; Tang *et al.*, 1991; Krupinski *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1992; Cali *et al.*, 1996). Toutefois, dans des cellules intactes l'AC3 peut être inhibée par le  $Ca^{2+}$  sous l'effet de la protéine kinase II dépendante de la  $Ca^{2+}$ /Calmoduline (CaMK II) (Wayman *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1998). L'AC1 peut également être inhibée par les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G hétérotrimériques et par la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_i$ . Le deuxième groupe comprend les AC2, AC4 et AC7. Ces isoformes sont stimulés par les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G hétérotrimériques à condition que la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_{\alpha_s}$  soit également présente (Tang & Gilman, 1991; Gao & Gilman, 1991; Feinstein *et al.*, 1991; Yoshimura *et al.*, 1996). Les isoformes 5 et 6 prédominantes dans le cœur forment le troisième groupe. Ces deux enzymes sont inhibées par les protéines  $G_{\alpha_i}$  et contrairement aux autres isoformes inhibées par de fortes concentrations de  $Ca^{2+}$  de l'ordre du millimolaire, elles présentent la particularité d'être inhibées par des concentrations physiologiques de  $Ca^{2+}$  (0,2 à 0,6  $\mu$ M) (Premont *et al.*, 1992; Katsushika *et al.*, 1992; Ishikawa *et al.*, 1992; Cooper, 2003). Le quatrième groupe est composé de l'AC9 qui est régulée par la calcineurine (Paterson *et al.*, 1995). Le dernier groupe comprend l'unique AC soluble décrite à ce jour, initialement détectée dans le testicule puis identifiée dans de nombreux systèmes physiologiques, qui n'est pas stimulée par la forskoline ni par  $G_{\alpha_s}$  mais par le bicarbonate et le  $Ca^{2+}$  (Chen *et al.*, 2000; Tresguerres *et al.*, 2011).

Comme la plupart des autres types cellulaires, les CMLV expriment diverses isoenzymes d'AC, avec une preuve évidente pour les ACs 3, 5, et 6, isoformes sensibles au



$\text{Ca}^{2+}$  (Webb *et al.*, 2001; Ostrom *et al.*, 2002). Les raisons de cette redondance apparente restent floues et peu de choses sont connues au sujet des effets fonctionnels de ces différentes isoenzymes dans le système vasculaire. En effet, la majorité des études a mis l'accent sur l'expression des différents sous-types d'AC plutôt que sur leur fonction (Webb *et al.*, 2001). Cependant, il a été montré que dans les CML d'aorte de rat en culture, la surexpression de l'AC1 et de l'AC3 inhibe la prolifération, alors que la surexpression de l'AC6 amplifie les changements morphologiques induits par une stimulation à l'isoprénaline ainsi que la phosphorylation de protéines induite par la forskoline (Gros *et al.*, 2006). Une autre isoforme, l'AC8, a été identifiée dans des CMLV en migration. L'expression de l'AC8 apparaît étroitement liée aux propriétés développées par les CMLV dans l'athérosclérose et lors de la formation d'une néo-intima au cours de la resténose post-angioplastie (Gueguen *et al.*, 2010). Les auteurs suggèrent que chaque isoforme d'AC constituerait des complexes protéiques de signalisation différents déterminant ainsi à des réponses fonctionnelles différentes. Ces résultats sont compatibles avec un rôle prédominant de l'AC6 dans la voie de signalisation de la PKA, notamment dans la régulation de l'activité des canaux  $\text{K}^+$  qui conduit à une vasodilatation (Nelson *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il a montré, par des approches de western-blot associées à une fractionnement membranaire, que les 3 isoformes d'AC ont une localisation principale, mais non exclusive, dans les fractions cavéolaires des membranes des CML aortiques de rat en culture (Ostrom *et al.*, 2002; Sampson *et al.*, 2004), alors que les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR sont respectivement, majoritairement et uniquement, présents dans les fractions non-cavéolaires (Ostrom *et al.*, 2002). Ceci pose la question du mode de couplage spatiotemporel entre les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et l'effecteur AC. Cependant, il faut noter que ces études ont été réalisées sur des cellules en culture, pouvant subir des modifications phénotypiques. Aussi, peu de données sont à notre disposition concernant le rôle des caveolae dans les réponses  $\beta$ -AR musculaires lisses. Une étude a tenté de répondre à cette question. La délétion de la cavéoline-1 qui entraîne une disparition des invaginations membranaires caractéristiques des caveolae à la membrane des CML provoque, dans l'artère saphène de souris, une abolition de la relaxation  $\beta_1$ -adrénergique, une apparition d'un effet relaxant  $\beta_3$ , sans modification de la relaxation  $\beta_2$  (Neidhold *et al.*, 2007). Cependant, la contribution de l'endothélium dans ces effets relaxants n'a pas été évaluée.

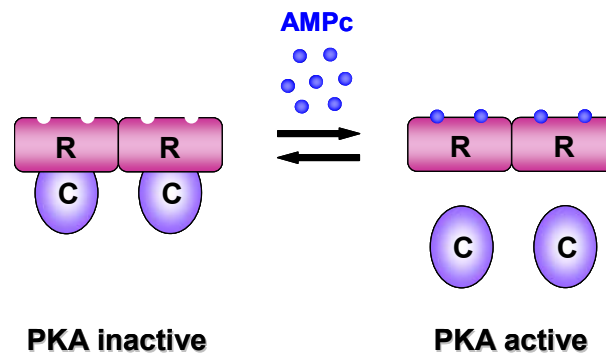
## II.B. Les effecteurs de l'AMPC

Bien l'AMPC soit considéré comme exerçant ses effets essentiellement par l'activation de la PKA, d'autres effecteurs peuvent être impliqués, tels que la PKG et la protéine Epac.

### II.B.1. La protéine kinase A

La cible intracellulaire classique de l'AMPC est la PKA, un hétérotétramère composé de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) (Taylor *et al.*, 1990). Les sous-unités régulatrices présentent chacune 2 sites de fixation (A et B) pour l'AMPC. A l'état inactif, seul le site de liaison B de la PKA est exposé à la fixation d'une molécule d'AMPC qui, lorsqu'elle se produit, entraîne une modification stérique intramoléculaire permettant la fixation d'une molécule d'AMPC sur le site A. La fixation de 4 molécules d'AMPC sur les 2 sous-unités R conduit à un changement conformationnel et à la dissociation des sous-unités R et C (**Figure 17**). Les sous-unités C, libérées de leur inhibition par les sous-unités R, deviennent alors actives et phosphorylent les résidus Sérine et Thréonine des protéines cibles. Lorsque le taux d'AMPC diminue, les sous-unités régulatrices perdent leur ligand et s'associent avec les sous-unités catalytiques, les rendant à nouveau inactives (Tasken & Aandahl, 2004). Deux classes de PKA, désignées par type I et II, sont composées, respectivement, des sous-unités régulatrices RI et RII. De plus, quatre sous-unités R (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) et 4 sous-unités C (C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$  et PRKX ou *human X chromosome-encoded protein kinase X*) ont été identifiées (Skalhegg & Tasken, 2000). Les 2 classes de PKA présentent des affinités différentes pour l'AMPC avec une constante d'activation de 50-100 nM pour les PKA de classe I et 200-400 nM pour les PKA de classe II. Les sous-unités R présentent des profils d'expression cellulaire et tissulaire différents et sont capables de s'homo- ou s'hétéro-dimériser générant ainsi un large panel de combinaisons responsables de la diversité et de la spécificité des réponses dépendantes de l'AMPC. Outre la régulation de la sous-unité catalytique de la PKA par ses sous-unités régulatrices, une famille de peptides nucléaires PKI (*protein kinase inhibitor*) se lie à la sous-unité C et inhibe son activité de façon indépendante de l'AMPC (Kopperud *et al.*, 2003). Le PKI est principalement localisé dans le noyau et agit également en protéine chaperonne assurant l'export de la sous-unité C libre vers le noyau (Fantozzi *et al.*, 1994). Une avancé principale dans ce domaine est le concept de protéines d'échafaudage, les AKAPs, qui ancrent les sous-unités régulatrices de la PKA au

voisinage de ses substrats assurant une spécificité et une régulation spatio-temporelle des réponses cellulaires (Tasken & Aandahl, 2004; Scott & Santana, 2010).



**Figure 17 : Représentation schématique de la PKA et de son activation.**

La PKA est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C).

Dans le muscle lisse, l'activité de la PKA est régulée par les agonistes  $\beta$ -Adrénrgiques en accord avec la vasorelaxation associée. En effet, plusieurs substrats de la PKA impliqués dans la régulation du tonus musculaire lisse ont été identifiés (voir paragraphes I.D et I.E). Cependant, le mécanisme par lequel l'augmentation de l'AMPc induit une vasorelaxation est controversé. Des études soutiennent le dogme du rôle prépondérant de la PKA dans la relaxation induite par une stimulation  $\beta$ -adrénrgique, en constatant que l'inhibition de la PKA (H-89) diminue cette réponse relaxante induite par de faibles concentrations de l'isoprénaline, alors que l'inhibition de la PKG (Rp-8-Br-cyclic GMPS) n'a pas d'effet (Eckly-Michel *et al.*, 1997). En accord avec ces résultats, il a été montré que la relaxation des artères coronaires induite par l'isoprénaline est en corrélation avec l'activation de la PKA (Vegesna & Diamond, 1984). Cependant, d'autres résultats démontrent qu'une relaxation  $\beta_2$ -adrénrgiques dans l'aorte de rat n'est que partiellement inhibée par le H-89. Les auteurs indiquent que cette relaxation fait intervenir des mécanismes médiés par la PKA ainsi que par la voie PI3K/Akt (Ferro *et al.*, 2004). De manière intéressante, il a été proposé que l'accumulation d'AMPc par de faibles concentrations d'isoprénaline active préférentiellement la PKA tandis que des concentrations plus élevées de l'agoniste activent à la fois la PKA et la PKG (Murthy & Makhlof, 1995). Ainsi, l'activation croisée de PKG par l'AMPc permettrait à l'AMPc d'avoir des effets dans les cellules via des systèmes décrits comme cGMP dependent. De plus, des travaux suggèrent que la relaxation induite par l'isoprénaline semble

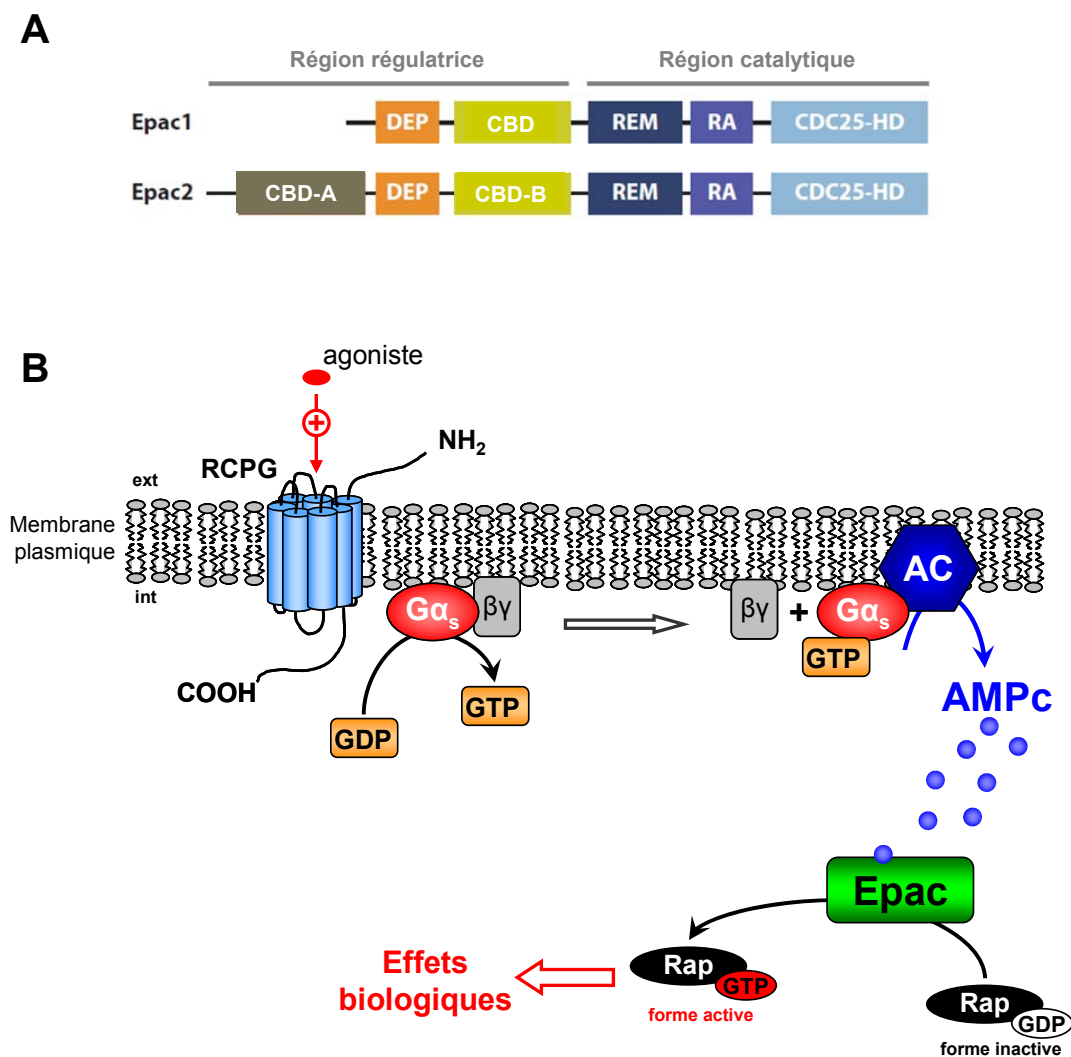
en grande partie impliquer des mécanismes indépendants de la PKA car la réponse  $\beta$ -adrénergiques n'est pas modifiée par des inhibiteurs de PKA (Rp-cAMPS et H-89) (McKinnon *et al.*, 1996; White *et al.*, 2001). Cette vasorelaxation serait alors le résultat de l'activation des canaux BK<sub>Ca</sub>, probablement directement par une protéine Gs (Scornik *et al.*, 1993; Kume *et al.*, 1994; White *et al.*, 2001).

### II.B.2. Le facteur d'échange Epac

En 1998, une nouvelle famille de protéines activées par l'AMPc, nommé Epac (exchange protein directly activated by cAMP) a été découverte (Kawasaki *et al.*, 1998; de Rooij *et al.*, 1998). Ces protéines contiennent un domaine de liaison pour l'AMPc (CBD : cAMP binding domain) qui est homologue à celui des sous-unités régulatrices de la PKA. L'AMPc se lie à la protéine Epac avec une haute affinité et active la famille Ras des petites GTPases, Rap1 et Rap2, ce qui entraîne l'échange du GDP en GTP sur ces petites protéines G, permettant ainsi leur interaction avec les effecteurs spécifiques (**Figure 18**). Rap1 peut être activé en réponse à une série de seconds messagers dont l'AMPc (de Rooij *et al.*, 2000), et peut également être phosphorylé par la PKA sur son extrémité C-terminale, mais cette phosphorylation n'est pas nécessaire pour son activation dépendante de l'AMPc (de Rooij *et al.*, 1998). Il existe deux isoformes d'Epac, Epac1 et Epac2, produits de gènes indépendants chez les mammifères. Alors qu'Epac1 est exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus, Epac2 est plus limité dans sa distribution tissulaire (Kawasaki *et al.*, 1998; de Rooij *et al.*, 1998). Epac-1 a notamment été détectée dans les CML fraîchement dissociées d'aorte et d'artère mésentérique de rat (Purves *et al.*, 2009) et les cellules endothéliales HUVEC (Kooistra *et al.*, 2005). Ces deux isoformes présentent une importante homologie de séquence et contiennent toutes deux une région N-terminale régulatrice comprenant un domaine d'adressage intracellulaire (DEP : Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) et les domaines de liaison pour l'AMPc (CBD), et une région C-terminale catalytique. La région catalytique d'Epac1 se compose d'un motif d'échange RAS (REM), un domaine d'association RAS (RA) et du domaine classique d'homologie CDC25 (CDC25HD) responsable de l'activité d'échange des nucléotides (**Figure 18**).

La découverte de la protéine Epac comme une nouvelle cible intracellulaire de l'AMPc suggère que le mécanisme de signalisation de l'AMPc est beaucoup plus complexe que ce que

l'on croyait auparavant. Ainsi, une grande partie des effets médiés par l'AMPC qui était attribués à la seule action de la PKA peut aussi être transduite par Epac. A ce jour, de vastes études ont démontré que la protéine Epac est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires liées à l'AMPC telles que l'adhésion cellulaire (Rangarajan *et al.*, 2003; Enserink *et al.*, 2004), les jonctions cellule-cellule (Kooistra *et al.*, 2005; Cullere *et al.*, 2005), l'exocytose et la sécrétion (Ozaki *et al.*, 2000), la différenciation cellulaire (Kiermayer *et al.*, 2005) et la prolifération et l'hypertrophie cardiaques (Morel *et al.*, 2005; Métrich *et al.*, 2008).



**Figure 18** : Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines Epac.

**A**: Structure des protéines Epac (Modifié de (Gloerich & Bos, 2010)). **DEP**: Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin, **CBD**: cAMP binding domain, **REM**: RAS exchange motif, **RA**: RAS association domain, **CDC25HD**: CDC25-homology domain. **B**: Mécanisme d'activation de la protéine Epac.

Au niveau vasculaire, le rôle de la protéine Epac a été initialement recherché dans la cellule endothéliale. La signalisation de Rap par Epac1, la principale isoforme d'Epac exprimée dans les cellules endothéliales (Kooistra *et al.*, 2005; Sehrawat *et al.*, 2008), contribue aux effets de l'AMPC sur la fonction endothéliale. Ainsi, la stimulation d'Epac par une approche pharmacologique (analogue de l'AMPC sélectif d'Epac, 007 : 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) diminue la perméabilité des HUVEC en culture d'une manière dépendante d'Epac1 et de Rap (Kooistra *et al.*, 2005). De même, la perméabilité accrue induite par des médiateurs inflammatoires tels que la thrombine est contrecarrée par l'activation d'Epac1 (Cullere *et al.*, 2005). Parallèlement, l'activation d'Epac provoque l'accumulation de protéines jonctionnelles au niveau des contacts cellule-cellule et l'augmentation de l'adhésion cellulaire via les VE-cadhérines (Fukuhara *et al.*, 2005; Kooistra *et al.*, 2005). Le rôle d'Epac1 dans la régulation de la perméabilité vasculaire a été confirmé *in vivo*, dans des vaisseaux sanguins murins : l'administration de 007 inhibe la perméabilité induite par le facteur de croissance endothélial (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) ou par le facteur d'activation plaquettaire (Fukuhara *et al.*, 2005; Adamson *et al.*, 2008). Récemment, l'équipe de Maurice a montré que dans une lignée de cellules endothéliales artérielles humaines, la PDE4D interagit directement avec Epac1 afin de stabiliser le complexe Epac1-VE-cadhérine, ce qui est essentiel à la régulation de la perméabilité vasculaire (Rampersad *et al.*, 2010). Ils ont également mis en évidence, dans les mêmes cellules, l'existence d'un complexe comprenant à la fois PDE3B, Epac1 et la sous-unité régulatrice p84 de la kinase PI3K $\gamma$  (phosphatidyl inositol 3 kinase  $\gamma$ ). Ce signalosome permet l'intégration des signaux régulés par l'AMPC, Epac1 et la PI3K $\gamma$ , contrôlant ainsi plusieurs fonctions importantes des cellules endothéliales comme l'angiogenèse (Wilson *et al.*, 2011).

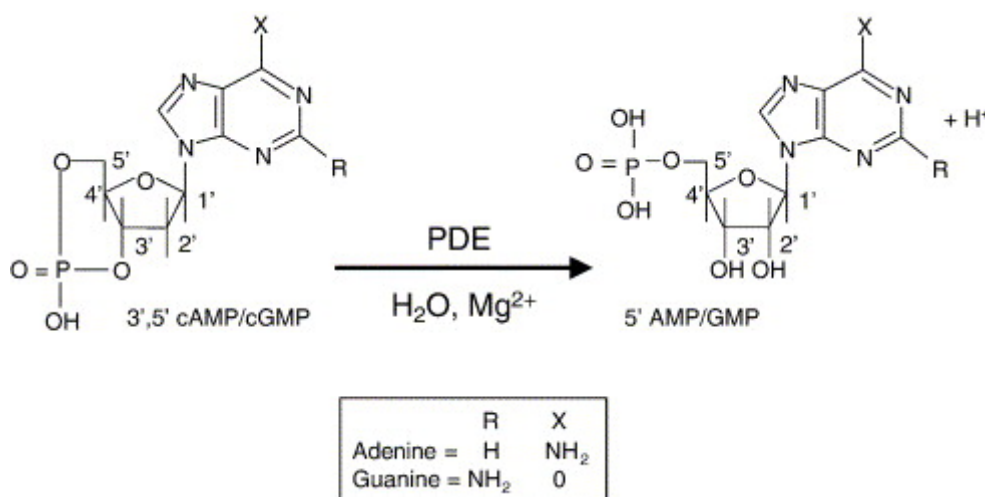
Dans les CMLV en culture, contrairement à la PKA, l'activation d'Epac favorise le processus de migration, et l'expression d'Epac1 est augmentée dans les CMLV de l'artère fémorale de souris suite à une blessure mécanique *in vivo*, tandis que celle de la PKA est diminuée. Ces résultats suggèrent qu'Epac1 peut jouer un rôle important lors du remodelage vasculaire et de la resténose après une lésion vasculaire en contribuant à la formation d'une néo-intima (Yokoyama *et al.*, 2008).

Concernant le rôle d'Epac dans le contrôle du tonus vasculaire, des travaux ont mis en évidence une association d'Epac1 avec la sous-unité régulatrice SUR2B (sulfonylurea receptor 2B) du canal K<sub>ATP</sub>. Dans des CMLV isolées d'aorte de rat, l'activation d'Epac bloque l'activité du canal K<sub>ATP</sub> via un mécanisme dépendant du Ca<sup>2+</sup> impliquant l'activation de

la protéine phosphatase 2B sensible au  $\text{Ca}^{2+}$ , la calcineurine (Purves *et al.*, 2009). Du fait de l'implication de ce canal potassique dans le maintien du potentiel de membrane des CML, son inhibition suite à l'activation d'Epac1 pourrait entraîner une augmentation du tonus vasculaire. Des études fonctionnelles suggèrent, à l'inverse, un effet relaxant de l'analogue de l'AMPC sélectif d'Epac. En effet, deux études ont montré que le 007 induit une relaxation de la veine porte de lapin et de la trachée humaine en modulant la balance d'activation Rho-A/Rac1 en faveur de Rac1, levant ainsi l'inhibition de la MLCP (Roscioni *et al.*, 2011; Zieba *et al.*, 2011). En l'absence d'inhibiteur sélectif de la protéine Epac, il est à l'heure actuelle difficile d'évaluer le rôle fonctionnel de cette protéine dans la réponse relaxante  $\beta$ -adrénergique.

### II.C. La dégradation de l'AMPC par les PDEs

L'amplitude et la durée des réponses médiées par l'AMPC sont déterminées par l'équilibre entre leur taux de synthèse, décrit précédemment, et leur taux de dégradation par une ou plusieurs PDEs. Bien que l'AMPC puisse être transporté hors de la cellule, l'action catalytique des PDEs constitue la seule voie de dégradation pour diminuer rapidement le contenu en AMPC dans la plupart des types cellulaires. L'activité des PDEs a été décrite pour la première fois en 1962 par Butcher & Sutherland (Butcher & Sutherland, 1962). Les PDEs sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse du 3',5'-AMPC en 5'-AMP et/ou du 3',5'-GMPC en 5'-GMP (**Figure 19**) (Beavo *et al.*, 2007).

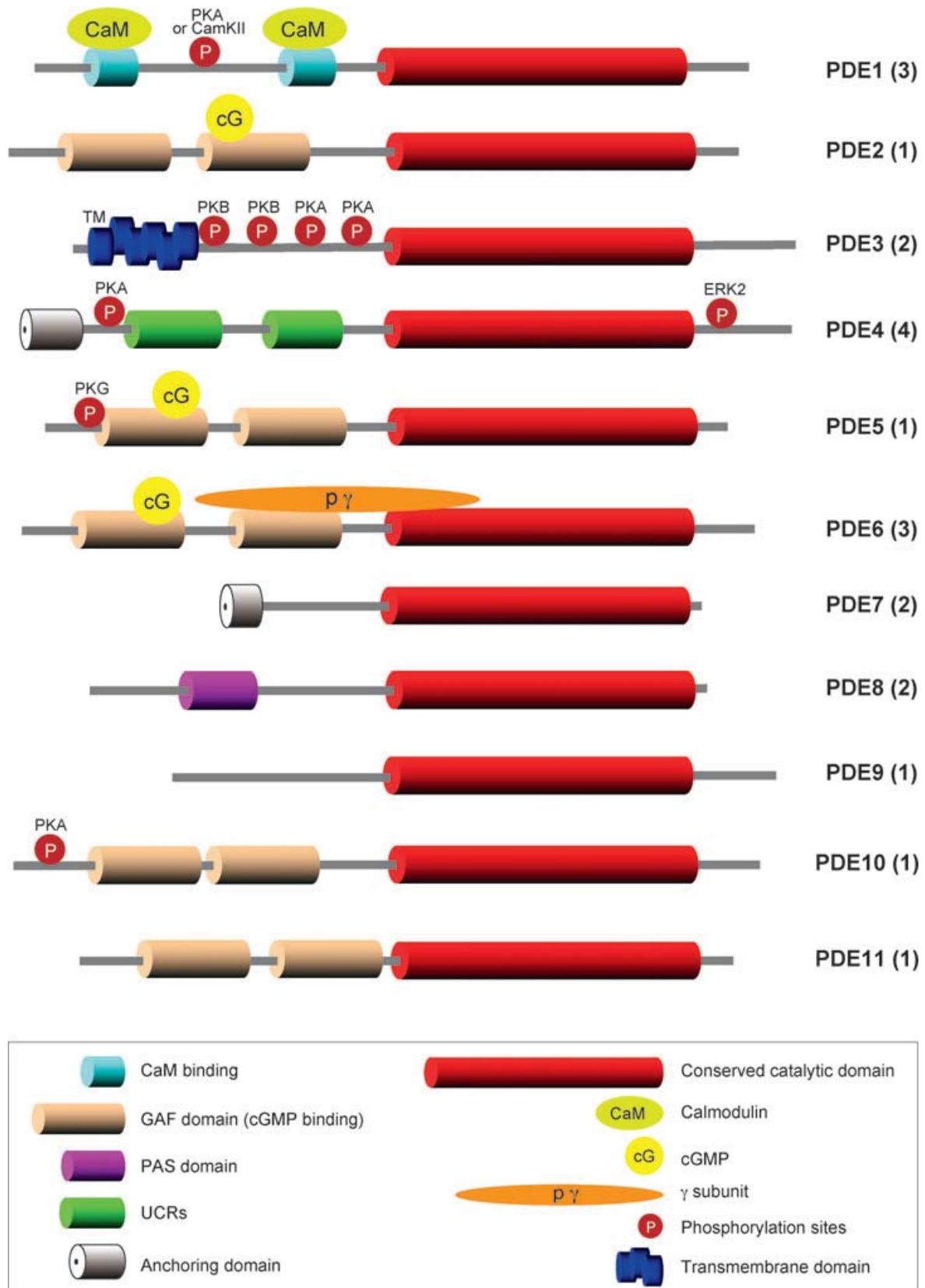


**Figure 19** : Mécanisme d'hydrolyse des nucléotides cycliques par les phosphodiesterases. (D'après (Lugnier, 2006))

Chez les mammifères, elles sont regroupées en onze familles basées sur leur séquence protéique, leurs propriétés enzymatiques, leur mode de régulation, et leurs propriétés pharmacologiques (**Figure 20**). Actuellement, 21 gènes ont été identifiés et codent pour 54 isoformes différentes, produits d'épissage alternatif ou de l'utilisation de multiples sites d'initiation de la transcription. Trois familles hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE4, 7 et 8), trois autres sont spécifiques du GMPc (PDE5, 6 et 9) et les autres hydrolysent les 2 seconds messagers (PDE1, 2, 3, 10, 11) (Lugnier, 2006; Bender & Beavo, 2006). L'existence de multiples isoformes de PDE possédant différentes structures, propriétés catalytiques et localisations subcellulaires garantit l'hétérogénéité de la cinétique et de la répartition spatiale de l'AMPc, et procure à ce second messager une grande diversité d'actions dans des processus cellulaires variés. Il est en effet rapporté que les différentes PDEs peuvent jouer des rôles distincts dans le même type cellulaire et créer ainsi une compartimentation subcellulaire de la voie de l'AMPc avec des pools d'AMPc localisés conduisant à des effets différents (Mika *et al.*, 2012).

Au niveau des CMLV et endothéliales, quatre familles de PDEs hydrolysant l'AMPc (PDEs-AMPc) sont classiquement décrites comme étant actives, les PDE1, 2, 3 et 4. Cependant, l'expression des ARNm codant pour les PDE7, 8 et 9 a été mise en évidence dans différentes artères, dont l'aorte de rat (Phillips *et al.*, 2005). L'étude fonctionnelle de ces isoformes plus récentes a été limitée par le développement d'outils pharmacologiques adaptés. Par ailleurs, il a été rapporté que l'expression et le niveau d'activité de ces PDE-AMPc sont significativement différents entre les CMLV contractiles/quiescentes et synthétiques/prolifératives, la PDE3 représentant la famille majeure dans les cellules contractiles, et la PDE4 la famille majeure dans les cellules synthétiques (Polson & Strada, 1996; Rybalkin & Bornfeldt, 1999; Dunkerley *et al.*, 2002).



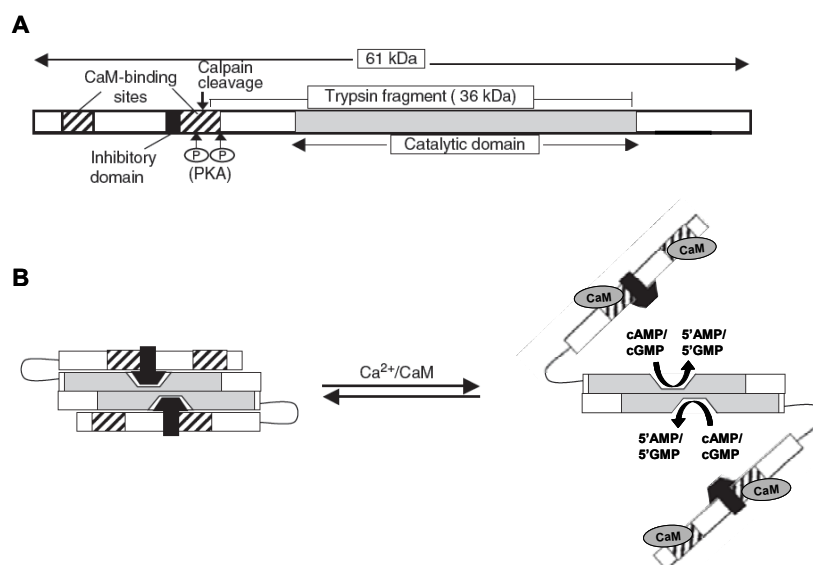


**Figure 20 :** Structure schématique des 11 familles de phosphodiésterases.  
(D'après (Conti & Beavo, 2007))

## II.C.1. Les PDEs de type 1

### II.C.1.1. Structure et régulation

Historiquement nommée PDE calmoduline-stimulée (CaM-PDE), la PDE1 est l'unique famille de PDE qui est régulée de manière dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  par la calmoduline (Stoclet *et al.*, 1988). Ainsi, cette famille représente un lien intéressant entre les nucléotides cycliques et le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. La famille PDE1 est codée par trois gènes: PDE1A, PDE1B et PDE1C. Ils ont des promoteurs alternatifs et peuvent donner lieu à une multitude de protéines par épissage alternatif. Plus de 10 isoformes humaines sont identifiées. Le domaine N-terminal régulateur qui contient deux domaines de liaison au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM et deux sites de phosphorylation diffère d'un variant à l'autre. PDE1A et PDE1B hydrolysent préférentiellement le GMPc, alors que PDE1C hydrolyse l'AMPc et le GMPc avec des valeurs de  $K_m$  (constante de Michaelis) similaires. L'association du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM qui modifie la conformation de PDE1, augmente sa  $V_{\max}$  (vitesse initiale maximale de réaction) pour l'hydrolyse des nucléotides cycliques sans modifier son  $K_m$  (**Figure 21**). L'activité des PDE1 est également régulée par la phosphorylation de l'enzyme par les kinases PKA ou CaMKII, ceci conduisant à une diminution de l'affinité de la PDE pour le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, ce qui constitue un rétrocontrôle négatif de l'activité de la PDE1.



**Figure 21 : Structure de la PDE1 et mécanisme d'activation par  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM.**

**A:** Structure de la PDE1A2. **B:** En absence de calmoduline (CaM), la PDE1 est sous forme de dimère où son activité est inhibée par l'interaction du site inhibiteur avec le domaine catalytique. La fixation de la CaM lève cette inhibition. (D'après (Beavo *et al.*, 2007))

### II.C.1.2. Expression

La PDE1 est principalement présente dans le cerveau, le cœur et les ML. Il existe cependant une distribution spécifique des différents sous-types de PDE1 qui semble contribuer à la régulation de fonctions cellulaires distinctes. Dans le système vasculaire, l'activité de PDE1 a été démontrée par chromatographie dans les extraits solubles d'une grande variété de ML tels que l'aorte de rat (Lugnier *et al.*, 1986), l'artère coronaire de porc (Wells *et al.*, 1975) ou l'artère mésentérique de rat (Komas *et al.*, 1991). L'expression de PDE1 a été rapportée dans les deux phénotypes de CMLV de plusieurs lits vasculaires provenant de différentes espèces. Dans les cellules endothéliales, la présence de PDE1 est controversée, même si son activité a été décrite dans des cellules isolées de l'endothélium aortique bovin et humain (Lugnier & Schini, 1990; Ashikaga *et al.*, 1997).

### II.C.1.3. Implication dans le tissu vasculaire

La PDE1A a été détectée dans les CMLV contractiles et synthétiques (Nagel *et al.*, 2006), mais sa localisation subcellulaire varie en fonction du phénotype cellulaire. Dans les CMLV contractiles, la PDE1A est principalement cytosolique, tandis qu'elle est située dans le noyau dans les CMLV synthétiques (Nagel *et al.*, 2006). La PDE1A cytosolique des CMLV contractiles semble réguler la phosphorylation de la MLC, ce qui suggère un rôle dans la régulation de la contractilité (Nagel *et al.*, 2006). En effet, il a été montré que l'expression et l'activité de PDE1A sont augmentées dans un modèle animal de tolérance au nitrate, dans lequel la vasodilatation dépendante du NO est altérée (Kim *et al.*, 2001). Le rôle de PDE1A dans la réactivité vasculaire est également soutenue par une seconde étude qui montre que la régulation positive de PDE1A est vraisemblablement impliquée dans l'augmentation des réponses contractiles observées dans les artères mésentériques de rats traités à l'angiotensine II (Giachini *et al.*, 2011). Ces effets sont dépendants de la voie NO/GMPc. Bien que la PDE1B ait été également décrite dans les CMLV contractiles de certaines espèces, elle ne représente pas l'isoforme de PDE1 majeure dans le système vasculaire (Rybalkin *et al.*, 1997). L'absence d'expression de PDE1C dans l'ensemble des CMLV présentant un phénotype contractile étudié à ce jour indique que l'hydrolyse stimulée par le  $\text{Ca}^{2+}$  ne régule probablement pas les taux d'AMPC dans ce phénotype. Toutefois, l'expression des variants PDE1A et PDE1B dans ces CMLV, associée à la voie NOS activée par le  $\text{Ca}^{2+}$ , peut définir un système de contrôle coordonné du niveau du GMPc dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Bien que la PDE1C soit significativement induite dans les CMLV en culture de plusieurs artères humaines, aucune induction n'a été observée lorsque des CMLV de rat, singe ou bovin sont cultivées dans les mêmes conditions (Rybalkin *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1997). Ceci suggère que PDE1C est spécifiquement associée au phénotype synthétique des CMLV humaines. Dans des cultures de CML aortiques humaines, l'induction de PDE1C semble nécessaire à la prolifération cellulaire et pourrait représenter un marqueur du changement phénotypique lors de la mise en culture ou lors de processus pathologiques tels que l'athérosclérose et la resténose après angioplastie (Rybalkin *et al.*, 2002). Récemment, une équipe a mis en évidence l'expression de PDE1C dans des CMLV de rongeurs lorsque ces cellules sont préparées et mises en culture dans des conditions appropriées : dans cette étude, les CMLVs d'aorte de rat ont été cultivées sur une matrice bidimensionnelle de monomère de collagène de type I (Cai *et al.*, 2011). Ainsi, l'induction de PDE1C dans les CML synthétiques semble être conservée entre les différentes espèces.

#### **II.C.1.4. Inhibition pharmacologique**

Il n'existe pas actuellement d'inhibiteur vraiment sélectif de la PDE1. Le composé 8-méthoxyméthyl IBMX (MIMX), par modification de l'IBMX à la position C-8 en 8-méthoxyméthyl-IBMX, reste un faible inhibiteur sélectif de la PDE1. Cette modification de l'IBMX permet d'augmenter sa sélectivité pour PDE1 de 30 à 50 fois par rapport aux autres PDE, mais il inhibe également la PDE5 dans la même gamme de concentration ( $IC_{50}$ = 8 et 10  $\mu$ M pour PDE1 et PDE5 respectivement; (Ahn *et al.*, 1997)). En 2005, un nouvel inhibiteur de PDE1, IC224 ( $IC_{50}$ =0,08  $\mu$ M), avec un taux de sélectivité de 127 (ratio de l' $IC_{50}$  pour la seconde PDE la plus sensible et de l' $IC_{50}$  pour PDE1), a été développé par ICOS Corporation (Snyder *et al.*, 2005). Ce composé inhibe aussi bien l'activité PDE1 basale et stimulée par la calmoduline. Plus récemment, le flavonoïde dioclein, qui inhibe l'activité PDE1 avec une valeur de  $K_i$  d'environ 0,6  $\mu$ M, induit la relaxation de la veine saphène humaine à travers un mécanisme PKG-dépendant (Goncalves *et al.*, 2009).

### **II.C.2. Les PDEs de type 2**

#### **II.C.2.1. Structure et régulation**

La PDE2, également connue sous l'appellation de PDE GMPc-stimulée, a été découverte par l'équipe de Beavo en réalisant un dosage d'activité PDE-AMPC en présence de

GMPc dans le foie de rat (Beavo *et al.*, 1971). Un seul gène PDE2A code pour les PDE2 et génère trois variants d'épissage : PDE2A1, PDE2A2 et PDE2A3. Ils partagent la même séquence C-terminale mais se distinguent par leur région N-terminale qui leur confère une localisation subcellulaire différente, cytosolique (PDE2A1) ou particulaire (PDE2A2 et PDE2A3). Ce domaine N-terminal possède deux sites de liaison du GMPc, GAF-A et GAF-B (l'acronyme GAF provient du nom des trois premières protéines découvertes contenant ce domaine : cGMP-binding PDEs, *Anabaena* adenylyl cyclase et *Escherichia coli* FhlA), qui contrôlent la dimérisation de PDE2 et son activité d'hydrolyse (Martinez *et al.*, 2002). La PDE2 hydrolyse à la fois l'AMPc et le GMPc avec des  $V_{\max}$  similaires (Martins *et al.*, 1982). La fixation du GMPc (1 à 5  $\mu$ M) sur le domaine GAF-B stimule jusqu'à 30 fois l'hydrolyse de l'AMPc *in vitro* (Martinez, 2007) et par 6 fois dans des conditions physiologiques (Martins *et al.*, 1982; Pandit *et al.*, 2009). Pour ces raisons, la PDE2 joue un rôle de rétrocontrôle négatif crucial en restaurant le niveau basal de nucléotides cycliques en réponse à une élévation du GMPc notamment lors de la production de NO (Bender & Beavo, 2006). La PDE2 est donc capable d'établir une interaction entre les voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc (Lugnier, 2006).

#### II.C.2.2. Expression et implication dans le tissu vasculaire

Bien que de faibles niveaux d'activité PDE2 aient été détectés dans des vaisseaux dénudés de leur endothélium (Saeki & Saito, 1993) et qu'une étude ait montré que l'inhibition sélective de PDE2 reverse la vasoconstriction pulmonaire dans un modèle de rat hypoxique (Haynes *et al.*, 1996), il est généralement considéré que la PDE2 n'exerce aucun rôle fonctionnel dans les CMLV systémiques. Quant aux cellules endothéliales, elles expriment la PDE2, comme il l'a été montré chez l'Homme, l'espèce bovine et le porc, avec une abondance différente dans les cellules *in situ* ou en culture (Sadhu *et al.*, 1999). La PDE2A est surexprimée lors du changement phénotypique des cellules endothéliales (Keravis *et al.*, 2000) ainsi qu'en réponse à une stimulation par le VEGF (Favot *et al.*, 2004) suggérant une participation potentielle de la PDE2 dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Favot *et al.*, 2003). Cet effet sur la prolifération a été confirmé dans des explants d'aorte de souris et également *in vivo* où l'inhibition de la PDE2 prévient l'angiogenèse chez la souris (Diebold *et al.*, 2009).

### II.C.2.3. Inhibition pharmacologique

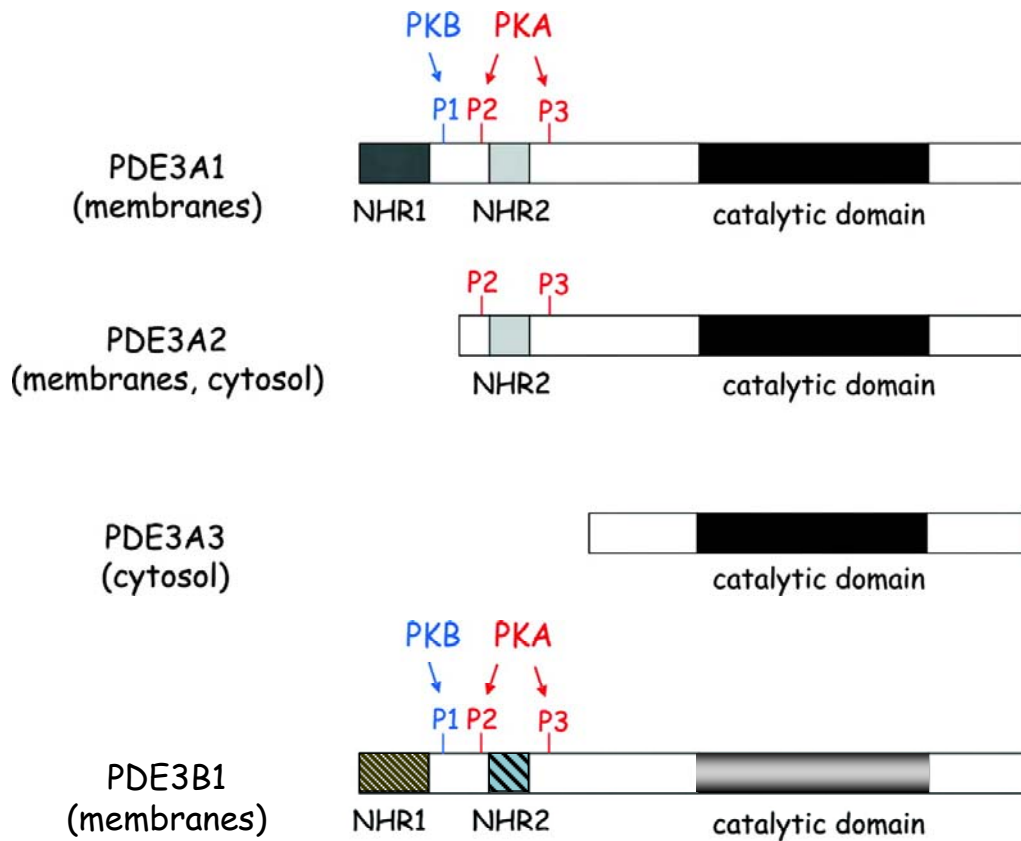
Les inhibiteurs de PDE2 sont exclusivement utilisés en tant qu'outils de recherche et ne font pas encore l'objet d'intérêt clinique. L'un des inhibiteurs sélectifs de PDE2, l'érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adénine (EHNA), possède une  $IC_{50}$  pour PDE2 de l'ordre du nanomolaire et une sélectivité au moins 50 fois plus importante vis-à-vis des autres PDE (Méry *et al.*, 1995; Podzuweit *et al.*, 1995). Deux autres inhibiteurs de PDE2 ont été développés: IC933, avec une valeur  $IC_{50}$  de 0,004  $\mu$ M et un ratio de sélectivité de 235 (Snyder *et al.*, 2005), et le BAY 60-7550 ( $IC_{50}$ =4,7 nM), qui augmente le GMPc neuronal, la plasticité synaptique et les performances de la mémoire (Boess *et al.*, 2004).

## II.C.3. Les PDEs de type 3

### II.C.3.1. Structure et régulation

La famille PDE3 est composée de deux gènes, PDE3A qui code pour 3 isoformes (PDE3A1-3) et PDE3B qui code pour une seule isoforme (Meacci *et al.*, 1992; Wechsler *et al.*, 2002). Les différentes isoformes de PDE3 sont structurellement similaires avec un domaine N-terminal important dans la localisation subcellulaire de l'enzyme, PDE3A1 et 3B étant exclusivement particulaires, PDE3A3 cytosolique et PDE3A2 présente dans les deux fractions (**Figure 22**). Le domaine catalytique dans la région C-terminale contient un insert de 44 acides aminés propre à cette famille de PDE, qui contribue à l'activité catalytique, la sensibilité au GMPc et à l'inhibition sélective de ces enzymes (He *et al.*, 1998; Manganiello & Degerman, 1999). La PDE3 hydrolyse l'AMPc et le GMPc, avec des valeurs de  $K_m$  très faibles ( $K_m$  AMPc = 0,2  $\mu$ M,  $K_m$  GMPc = 0,1  $\mu$ M) et une  $V_{max}$  4 à 10 fois supérieure pour l'AMPc (Beavo, 1995). Compte tenu de ces propriétés enzymatiques, le GMPc se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'AMPc par la PDE3. Cela contribue à l'interaction de la signalisation AMPc/GMPc induite par le NO dans le ML vasculaire (Komas *et al.*, 1991; Komas *et al.*, 1991; Eckly & Lugnier, 1994). Les PDE3A1 et A2 présentent des sites de phosphorylation pour la PKA, alors que seule la PDE3A1 possède un site de phosphorylation pour la protéine kinase B/Akt (PKB). La PDE3A3 ne possède pas de sites de phosphorylation pour ces deux kinases (Wechsler *et al.*, 2002). La PDE3B présente une structure proche de celle de la PDE3A1 avec des sites de phosphorylation pour la PKA et la PKB et une association avec la PI3K (Rondinone *et al.*, 2000; Movsesian, 2002). La phosphorylation par la PKA et la PKB active la PDE3 induisant un rétrocontrôle négatif de la

signalisation de l'AMPc. La PKA entraîne également la liaison de la protéine 14-3-3 à la PDE3B qui va inhiber son inactivation par la phosphatase (Palmer *et al.*, 2007).



**Figure 22 : Structure des isoformes de PDE3.**

**NHR:** N-terminal hydrophobic region, **P1**, **P2** et **P3**: sites de phosphorylation. (D'après (Zaccolo & Movsesian, 2007))

### II.C.3.2. Expression

La PDE3A est principalement présente dans le cœur, les plaquettes, les oocytes et les CML alors que la PDE3B est particulièrement exprimée dans les adipocytes, les hépatocytes, le rein et les spermatozoïdes (Reinhardt *et al.*, 1995). Alors que l'activité PDE3 représente environ 60% de l'activité PDE-AMPc totale dans les CMLV d'aorte de rat possédant un phénotype contractile elle est fortement réduite dans ces mêmes CMLV en culture qui ont acquis un phénotype synthétique (Liu & Maurice, 1998; Dunkerley *et al.*, 2002). Cette différence s'explique par la diminution de l'activité de PDE3A lors de la transition

phénotypique qui n'a aucun impact sur le niveau basal d'activité PDE4 (Liu *et al.*, 2000; Tilley & Maurice, 2002). Dans les CMLV, la localisation majoritairement cytosolique de la PDE3A et exclusivement particulaire de la PDE3B suggère que ces deux isoformes régulent différents « pools » d'AMPc et donc des fonctions cellulaires distinctes. Bien que les CMLV contractiles et synthétiques expriment les deux variants de PDE3, leur expression est différente lors du changement de phénotype ou en réponse à une stimulation prolongée d'agents induisant une élévation de l'AMPc (Tilley & Maurice, 2002; Dunkerley *et al.*, 2002). En effet, durant la modification phénotypique, l'expression et l'activité de PDE3A sont nettement diminuées dans les CMLV synthétiques alors que les niveaux de PDE3B sont inchangés (Dunkerley *et al.*, 2002). Il est généralement admis que les CMLV en culture présentent souvent une réduction significative de leur capacité à utiliser le GMPc pour apporter des changements dans la fonction cellulaire. En accord avec cette théorie, les CMLV en culture expriment des niveaux restreints de plusieurs enzymes régulées par le GMPc (GCs, PKG et PDE1B) par rapport à ces mêmes cellules avant culture (Boerth *et al.*, 1997; Rybalkin & Bornfeldt, 1999; Anderson *et al.*, 2000). De plus, une étude indique que le niveau de PKG est déterminant dans le processus de modification phénotypique des CMLV aortiques (Boerth *et al.*, 1997). Suite à ces observations, il est suggéré que la PDE3A, dont l'activité d'hydrolyse de l'AMPc est inhibée par le GMPc, pourrait faire partie de la liste des enzymes GMPc-dépendante dont l'expression est liée au phénotype (Dunkerley *et al.*, 2002). Quant au niveau de PDE3B, dont l'activité est 10 fois moins sensible à l'inhibition par le GMPc (Degerman *et al.*, 1997), il n'est pas modifié lors du changement phénotypique, confirmant cette hypothèse. Cependant, il reste à déterminer si la diminution de l'activité de la PDE3A est une cause ou bien une conséquence du passage des CMLV d'un phénotype contractile à synthétique. Il a été observé dans des modèles d'angioplastie par ballonnet réalisée chez le rat, que l'activité de la PDE3 est augmentée dans les CML aortiques 24h après la chirurgie (Zhao *et al.*, 2007) mais diminuée 14 jours après, et associée dans ce cas à une diminution de l'expression de PDE3A (Dunkerley *et al.*, 2002).

### **II.C.3.3. Implication dans le tissu vasculaire**

De nombreuses études ont mis en évidence que des inhibiteurs sélectifs de PDE3 inhibent la prolifération des CMLV *in vitro* et limitent l'accumulation néo-intimale des CMLV *in vivo* à la suite d'une atteinte de l'intégrité vasculaire (Souness *et al.*, 1992; Pan *et al.*, 1994; Palmer *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2000; Netherton *et al.*, 2002). Un traitement avec



le cilostazol, inhibiteur sélectif de PDE3, qui augmente la concentration intracellulaire en AMPc, inhibe la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire dans des CML d'aorte de rat en culture (Takahashi *et al.*, 1992). Il est probable que les deux variants de PDE3 soient différemment impliqués dans le contrôle de certains de ces effets, mais l'absence d'agents pharmacologiques capables d'inhiber sélectivement la PDE3A ou la PDE3B ne permet pas de répondre à cette question. Récemment, l'équipe de Manganiello, grâce au développement de souris KO-PDE3A et KO-PDE3B, a mis en évidence que la déficience en PDE3A inhibe clairement la prolifération des CMLV en supprimant l'initiation du cycle cellulaire ( $G_0$ - $G_1$ ) ainsi que sa progression à travers les phases  $G_1$ -S et  $G_2$ -M (Begum *et al.*, 2011). Cette suppression de la réponse mitogène est spécifique à la PDE3A car les CMLV KO-PDE3B ne sont pas affectées et leur transfection avec un si-RNA PDE3A restaure l'inhibition de la synthèse d'ADN observée dans les CMLV KO-PDE3A.

La caractérisation de la PDE3 dans l'aorte (Komas *et al.*, 1991) a amené à se poser des questions sur son rôle dans la réactivité vasculaire. Des études de relaxation sur des aortes pré-contractées, en présence ou non d'un endothélium a permis de démontrer que l'inhibition sélective de PDE3 produit une vasorelaxation indépendante de l'endothélium et potentialise l'effet relaxant d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique ou de l'activation des AC (Tanaka *et al.*, 1988; Maurice & Haslam, 1990; Jang *et al.*, 1993; Eckly & Lugnier, 1994). Bien que le principal mécanisme par lequel les inhibiteurs de PDE3 exercent leur effet relaxant soit attribué à l'atténuation de l'hydrolyse de l'AMPc, l'effet inhibiteur du GMPc sur l'activité PDE3 est un élément important de cette régulation du tonus vasculaire. Ainsi, cet effet du GMPc a lieu lors de l'activation de la GC par des vasodilatateurs tels que le NO et l'ANP, et augmente les niveaux d'AMPc dans les CMLV créant une synergie avec les agents qui stimulent la synthèse d'AMPc, comme la prostaglandine I<sub>2</sub> ou l'isoprénaline. Bien que ce mécanisme soit identique à celui décrit pour les cardiomyocytes, l'absence de PDE2 dans les CMLV, au contraire des cardiomyocytes, sous-entend que l'inhibition compétitive de la PDE3 par le GMPc domine dans ces cellules (par rapport à l'activation de la PDE2 par le GMPc) et que l'effet biphasique attribué à l'activation de la PDE2 par le GMPc n'est pas observé dans les CMLV. Plusieurs rapports démontrent que le GMPc peut réguler des fonctions dans les CMLV à travers l'inhibition de la PDE3 (Maurice & Haslam, 1990; Maurice *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1993; Eckly & Lugnier, 1994; Osinski & Schror, 2000; Osinski *et al.*, 2001).

Peu d'informations sont disponibles concernant l'expression de la PDE3 dans les cellules endothéliales, même si son inhibition réduit la prolifération et l'expression de molécules d'adhésion dans ces cellules (Lugnier & Schini, 1990; Suttorp *et al.*, 1993; Blease *et al.*, 1998). Une étude récente a montré que la PDE3B participe à la formation d'un complexe de signalisation ou signalosome dans les cellules endothéliales humaines, complexe constitué de la PDE3B, Epac1 et des signaux de PI3K, qui pourrait avoir une importance dans la cicatrisation et l'angiogenèse (Wilson *et al.*, 2011).

#### **II.C.3.4. Inhibition pharmacologique**

En 1979, le cilostamide fut le premier inhibiteur sélectif de la PDE3 développé (Hidaka *et al.*, 1979). Les inhibiteurs de PDE3 ont été largement étudiés au cours des années 1980 et 1990. Certains d'entre eux ont été initialement développés en tant que nouvel agent cardiotonique pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (Bristol *et al.*, 1984; Moos *et al.*, 1987). Toutefois, en raison de leurs propriétés arythmogéniques, à long terme, le développement des inhibiteurs de PDE3 dans l'insuffisance cardiaque a été arrêté. Le plus étudiée a été la milrinone (Primacor<sup>®</sup>) qui est encore utilisée dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë (Cruickshank, 1993). Le Cilostazol (Pletal<sup>®</sup>), un double inhibiteur de la PDE3 et de la recapture de l'adénosine, en raison de ses propriétés antiagrégantes plaquettaires et vasodilatatrices, est actuellement sur le marché pharmaceutique pour le traitement de la claudication intermittente athéromateuse (Liu *et al.*, 2001b; Liu *et al.*, 2001a). L'étude de la sélectivité des inhibiteurs de PDE3 envers les deux sous-types (3A et 3B) ont montré que le cilostamide, le cilostazol et l'amrinone inhibent la PDE3A avec une puissance 2 fois plus importante que la PDE3B. Cette observation a conduit à la conception d'un analogue du cilostamide, OPC-33540, qui inhibe préférentiellement la PDE3A (PDE3A  $IC_{50}=0,32$  nM, PDE3B  $IC_{50}=1,5$  nM; (Sudo *et al.*, 2000)). Récemment, le dihydropyridazinone a été conçu par Merck comme le premier inhibiteur actif par voie orale, puissant et sélectif de PDE3B (PDE3B  $IC_{50}=0,19$  nM, PDE3A  $IC_{50}=1,3$  nM; (Edmondson *et al.*, 2003)). Cette relative sélectivité pour les sous-types de PDE3 ouvre la possibilité de concevoir des inhibiteurs de PDE3 plus spécifique et dépourvu d'interactions avec les autres familles.

## II.C.4. Les PDEs de type 4

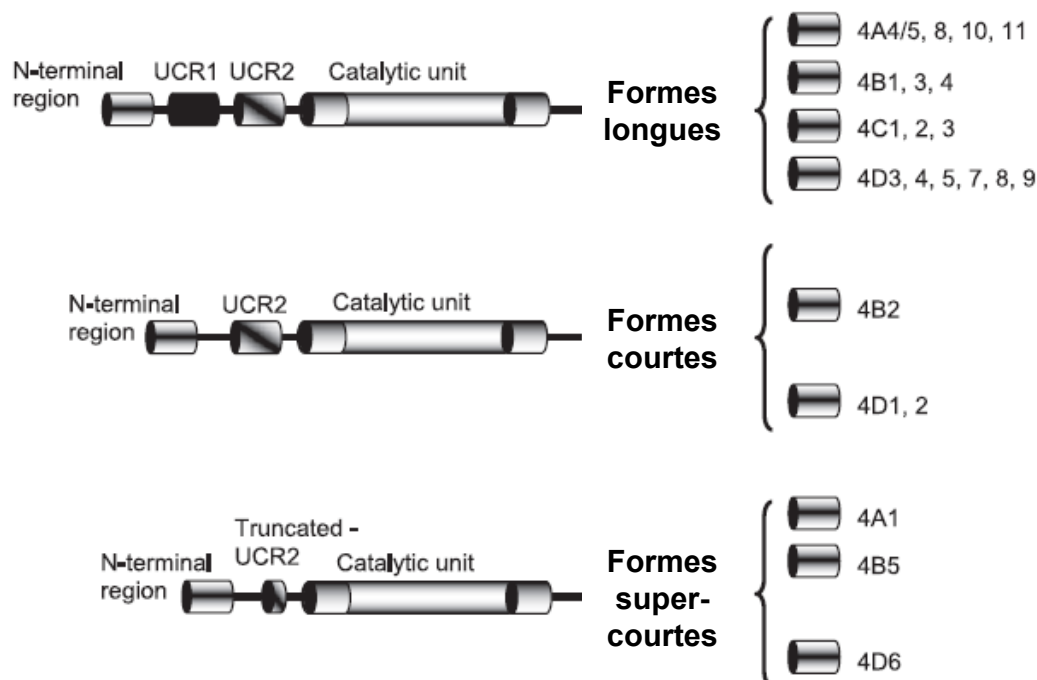
### II.C.4.1. Structure et régulation

La famille PDE4 qui hydrolyse sélectivement l'AMPc est la plus grande famille de PDEs. Elle est codée par quatre gènes (PDE4A, PDE4B, PDE4C et PDE4D) qui génèrent une multitude d'isoformes par épissage alternatif, dont au moins 25 ont été identifiées chez l'Homme. Elles sont réparties en formes courtes ou longues (Houslay & Adams, 2003; Conti *et al.*, 2003). Alors que les formes longues de PDE4 contiennent deux régions N-terminales conservées appelées upstream conserved regions 1 (UCR1) et UCR2, les formes courtes ou super courtes présentent seulement le domaine UCR2 complet ou tronqué respectivement (**Figure 23**). Le domaine catalytique dans la région C-terminale contient un site de phosphorylation pour ERK dont la stimulation active les formes courtes et inhibe les formes longues (Baillie *et al.*, 2000). Les domaines UCR sont aussi le siège d'interaction avec les AKAPs qui permet une localisation spécifique des variants de PDE4 dans des compartiments subcellulaires à proximité des PKA qui régulent leur activité (Dodge *et al.*, 2001; Dodge-Kafka *et al.*, 2005). La phosphorylation par la PKA induit la dimérisation des formes longues de PDE4 qui entraîne leur stabilisation et leur activation (Richter & Conti, 2004).

### II.C.4.2. Expression

L'activité PDE4 représente environ 35% de l'activité PDE-AMPc dans les CMLV d'aorte de rat possédant un phénotype contractile et environ 75% dans ces mêmes CMLV en culture qui ont acquis un phénotype synthétique (Rybalkin *et al.*, 2002; Dunkerley *et al.*, 2002). Cette différence s'explique par la diminution de l'activité de PDE3A lors de la transition phénotypique qui n'a aucun impact sur le niveau basal d'activité PDE4 (Liu *et al.*, 2000; Tilley & Maurice, 2002). Les deux phénotypes de CMLV expriment les isoformes PDE4B (B2) et PDE4D (D3/5/7/8/9). PDE4D3 et D5 sont exprimées dans les CMLV contractiles et synthétiques d'aorte, d'artère mésentérique et fémorale humaines et de rat (Liu & Maurice, 1999; Liu *et al.*, 2000). Une exposition à court terme de CMLV en culture ainsi que d'artères intactes à des agents induisant une augmentation d'AMPc intracellulaire (2-30 min) stimule l'activité des variants PDE4D3 et PDE4D5 via leur phosphorylation par la PKA (Liu & Maurice, 1999; Tilley & Maurice, 2002). Toutefois, un traitement à long terme (1-4 h) avec les mêmes agents induit une forte expression de PDE4D1 et PDE4D2 dans les CMLV en culture et seulement de PDE4D3 dans les artères intactes (Liu *et al.*, 2000). L'activation et l'induction de l'activité de différentes isoformes de PDE4 lors de l'élévation de l'AMPc

atténuent par la suite la réponse à l'AMPc à la fois *in vitro* et *in vivo*, ce qui indique que la PDE4 agit en tant que rétrocontrôle négatif de la signalisation de l'AMPc.



**Figure 23 : Structure des isoformes de PDE4.**  
UCR: upstream conserved region (D'après (Houslay *et al.*, 2007))

#### II.C.4.3. Implication dans le tissu vasculaire

L'augmentation des taux d'AMPc dans les CMLV activées peut profondément inhiber leur prolifération et leur migration ainsi que la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire, phénomènes caractéristiques de l'athérosclérose et pouvant favoriser la resténose post-angioplastie. (Vadiveloo *et al.*, 1997; Kronemann *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2001; Pelletier *et al.*, 2005). Partant de ce principe, Tilley et Maurice ont identifié un mécanisme qui permettrait de protéger les CMLV synthétiques contre d'éventuels effets inhibiteurs de l'AMPc, à savoir l'induction de l'isoforme PDE4D, qui servirait à diminuer la sensibilité des CMLV activées à l'action inhibitrice de l'AMPc (Tilley & Maurice, 2005).

Contrairement aux effets des inhibiteurs de PDE3, l'inhibition de PDE4 n'est généralement pas associée à une vasodilatation et n'inhibe pas la prolifération des CMLV. Cependant, lorsque les inhibiteurs sélectifs de PDE4 sont utilisés en présence d'activateurs de la voie AMPc ou d'inhibiteurs de PDE3, ils acquièrent alors la capacité d'induire une vasorelaxation et d'inhiber la prolifération des CMLV (Maurice *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1993; Eckly & Lugnier, 1994; Polson & Strada, 1996). Un donneur de NO, un endothélium fonctionnel, ou un inhibiteur de PDE3 révèlent l'effet vasorelaxant de l'inhibition de PDE4, indiquant que l'élévation de GMPc, suite à l'activation de la GCs induite par le NO, inhibe la PDE3 et par conséquent augmente le niveau d'AMPc, ce qui permet de dévoiler une régulation par la PDE4 du niveau d'AMPc (Komas *et al.*, 1991){Eckly & Lugnier 1994 #12038}. Ces observations prouvent l'existence d'une interaction entre PDE3 et PDE4 médiée par le GMPc.

Comme pour la PDE3, l'expression des différents variant de PDE4 dans les cellules endothéliales a été peu explorée. Fonctionnellement, certaines études ont montré que les inhibiteurs de PDE4 réduisent leur prolifération, l'expression de molécules d'adhésion ainsi que leur perméabilité (Lugnier & Schini, 1990; Suttorp *et al.*, 1993; Blease *et al.*, 1998). L'association physique entre PDE4D et Epac1 régule à la fois l'activité et la localisation subcellulaire de la protéine Epac1 et contrôle ainsi la perméabilité vasculaire par la voie de l'AMPc (Rampersad *et al.*, 2010). De plus, une relation entre l'activité PDE4, et plus particulièrement l'expression de PDE4A et PDE4B, et la régulation de la concentration en  $Ca^{2+}$  cytosolique a été démontrée dans des cellules endothéliales humaines (Campos-Toimil *et al.*, 2008).

#### II.C.4.4. Inhibition pharmacologique

Le rolipram, décrit comme antidépresseur (Schwabe *et al.*, 1976), s'est révélé être un puissant inhibiteur de l'activité PDE-AMPc dans des homogénats de cerveau. La grande sélectivité du rolipram, ainsi que du Ro-20-1724, pour la PDE4 a également été démontré sur les PDE vasculaires (Lugnier *et al.*, 1983; Lugnier *et al.*, 1986; Komas *et al.*, 1989). Plusieurs inhibiteurs de PDE4 ont été développés, et les recherches en cours s'attachent à évaluer leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques. Cependant le problème majeur avec les inhibiteurs de PDE4 est leur propension à favoriser le vomissement. La plupart de ces effets sont supposés être due, au moins en partie, à des actions sur le système nerveux central. Les inhibiteurs de PDE4 plus récents présentent une diminution des effets secondaires émétiques.

Ceux-ci incluent le roflumilast (Daxas<sup>®</sup>, IC<sub>50</sub>=0,8 nM; (Hatzelmann & Schudt, 2001)) et le cilomilast (Ariflo<sup>®</sup>, IC<sub>50</sub>=95 nM; (Christensen *et al.*, 1998)) qui sont actuellement en essais cliniques de phase III pour le traitement de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (Gross *et al.*, 2010). Récemment, il a été signalé que les effets secondaires des inhibiteurs de la PDE4 émétiques sont attribués à l'inhibition de la PDE4D dans le cerveau (Lipworth, 2005).

## **II.D. L'efflux de l'AMPC par les MRP (Multidrug Resistance-associated Protein)**

Certaines études ont rapporté que l'AMPC et le GMPc peuvent sortir du cytosol vers le milieu extracellulaire dans plusieurs types cellulaires incluant les CMLVs. Les PDE ne représentent donc pas la seule voie de diminution des niveaux intracellulaires de nucléotides cycliques (Hamet *et al.*, 1989). Les MRPs constituent une grande famille de protéines transmembranaires (faisant partie de la famille des transporteurs à ATP-binding cassette) impliquées dans l'efflux de divers substrats hors des cellules. Il a été montré que MRP4 et MRP5 sont responsable de l'efflux actif de l'AMPC (Sampath *et al.*, 2002). L'expression de MRP4 et MRP5 a été identifiée dans plusieurs tissus, y compris le ML (Mitani *et al.*, 2003; Dazert *et al.*, 2003), mais leurs fonctions physiopathologiques ne sont pas clairement définies. MRP4 pourrait constituer une cible potentielle à visée antiproliférative, puisque son expression est augmentée dans les CML artérielles périphériques en prolifération (en culture *in vitro* ou après lésion vasculaire *in vivo*) et que l'inhibition sélective de MRP4 augmente les concentrations intracellulaires d'AMPC et de GMPc et limite le processus prolifératif (Sassi *et al.*, 2008). L'inhibition de MRP4 a également un effet bénéfique sur le processus prolifératif des CML artérielles pulmonaires associé à l'HTA pulmonaire (Hara *et al.*, 2011). Dans cette étude, il a été montré que la délétion de MRP4 ne modifie pas les réponses contractiles à différents agents contractants et la réponse relaxante à un analogue de l'Ach dans les artères pulmonaires isolées de souris (Hara *et al.*, 2011). Cependant, la conséquence de cette délétion sur les réponses relaxantes impliquant directement la voie de l'AMPC n'a pas été évaluée. Le rôle des transporteurs MRP dans la vasorelaxation dépendante de l'AMPC reste donc inconnu. Il a été tout de même proposé que MRP5, en assurant l'efflux du GMPc,

jouerait un rôle important dans la régulation des relaxations dépendantes de la voie du NO dans les artérioles cérébrales (Xu *et al.*, 2004).

### **III. Voie de signalisation de l'AMPc dans l'insuffisance cardiaque**

L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie répandue avec un large impact sur la société et la qualité de vie de chaque patient (Jessup & Brozena, 2003). C'est un syndrome clinique avec des symptômes primaires tels que la dyspnée, la fatigue, l'intolérance à l'effort, et la rétention de liquide dans les poumons et les tissus périphériques. Les causes de l'IC sont multiples, mais l'anomalie commune principale est la diminution de la capacité du cœur à adapter le débit sanguin aux besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes dans des conditions de remplissage ventriculaire normales. L'IC est un fardeau sociétal important, pour la santé mais aussi en terme de coût, à la fois dans les pays développés et dans les pays émergents: 1 à 2 % du budget du système de santé de chaque pays (Malek, 1999; Dunlay *et al.*, 2011) pour un coût annuel de 39,2 milliards de dollars aux Etats-Unis et 1,6 milliards d'euros en France. Le nombre de patients insuffisants cardiaques est en constante augmentation dans les pays industrialisés. Cette augmentation de la prévalence est principalement liée au vieillissement de la population et à l'amélioration de la prise en charge des pathologies telles que la maladie coronarienne et l'HTA. Malgré l'apparition de nouveaux traitements, les taux de morbidité et de mortalité restent encore élevés. Avec un taux de survie à cinq ans des patients insuffisants cardiaques d'environ 50 %, il est évident que de nouvelles stratégies thérapeutiques sont encore nécessaires. La réduction de la perfusion myocardique et donc l'altération de la fonction ventriculaire sont en partie des conséquences de la diminution de la capacité vasodilatatrice dépendante de l'endothélium des artères coronaires. La diminution de la vasodilatation périphérique provoque une RVP supérieure accompagnée d'une rigidité des artères de conductance conduisant à l'augmentation de la post-charge. Ainsi, une élévation de la pré- et post-charge va encore augmenter la charge de travail cardiaque et l'aggravation des symptômes. La sévérité de la dysfonction endothéliale peut même être utilisée comme facteur pronostique de l'évolution à long terme de l'IC. Il a notamment été démontré que la dilatation dépendante du flux sanguin des artères radiale et brachiale est inversement corrélée à la mortalité chez les patients souffrant d'IC (Katz *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2005).



### **III.A. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque**

En général, l'IC se développe lentement. Son étiologie est complexe et repose sur différents mécanismes qui peuvent être classés en une atteinte du muscle cardiaque (altération de la contractilité, de la compliance/relaxation : atteintes myocardiques pures, infarctus du myocarde...), une surcharge volumétrique (insuffisance aortique, par exemple) et/ou une surcharge barométrique (HTA, rétrécissement aortique...). Ces différents mécanismes peuvent être associés. En réponse à ces atteintes, le cœur va s'adapter, et mettre en place des mécanismes de compensation afin de maintenir une perfusion des organes périphériques. Ces processus sont complexes, dynamiques, tributaires du temps et après une période d'adaptation, deviennent délétères et entretiennent finalement l'IC (Feldman *et al.*, 1993). Ils conduisent à des changements morphologiques comprenant une hypertrophie des cardiomyocytes avec augmentation de la synthèse protéique, à un dépôt de matrice extracellulaire menant à la fibrose, et à une augmentation de l'apoptose. Cependant les mécanismes qui entraînent l'hypertrophie et la progression vers l'IC sont encore mal connus. De nombreux facteurs déclenchant le remodelage ont été identifiés (étirement, hormones, peptides vaso-actifs, inflammation, ischémie) mais il est difficile de différencier les réponses adaptatives des réponses délétères. Dans les cardiomyocytes, le remodelage est caractérisé par un prolongement et une altération des transitoires calciques suggérant que le myocyte altéré pourrait être un substrat d'arythmie.

Dans les années 80, l'insuffisance cardiaque, longtemps considérée uniquement comme maladie hémodynamique, est devenue maladie neuro-hormonale (Francis *et al.*, 1984). Ainsi, la diminution du débit cardiaque et donc de la pression de perfusion des organes provoquent l'activation de systèmes neuro-hormonaux compensateurs, dont le SNA sympathique, le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA), le système arginine-vasopressine, et les peptides natriurétiques. Ces systèmes compensateurs permettront dans un premier temps d'augmenter le travail cardiaque, pour restaurer un débit cardiaque suffisant, mais deviendront délétères à long terme, en augmentant notamment les pressions de remplissage, stimulant l'hypertrophie cardiaque et augmentant le risque d'arythmies. L'insuffisance cardiaque est donc une maladie auto-entretenu.

### **III.B. Altérations vasculaires associées à l'IC**

La mise en place des processus compensateurs contribue à déséquilibrer la balance entre les agents vasoconstricteurs/prolifératifs et les agents vasodilatateurs/antiprolifératifs, en faveur d'une vasoconstriction, responsables d'une augmentation des RVP caractéristique de l'IC (Zelis & Flaim, 1982). Dans un premier temps, l'augmentation de la résistance agit en tant que mécanisme compensatoire afin de maintenir la perfusion des organes vitaux, par la restauration de la pression sanguine dans le cœur défaillant. Cependant, à long terme, l'augmentation de la résistance périphérique devient délétère en augmentant la post-charge et le travail cardiaque (Schrier & Abraham, 1999).

L'activation neuroendocrinienne du système RAA participe à la vasoconstriction anormale observée en IC (Jessup & Brozena, 2003). De plus, des études ont démontré que l'angiotensine II module également la fonction de l'endothélium et régule le remodelage vasculaire (Dzau, 2001). En outre, les ERO (les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène) peuvent aussi stimuler l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLV (Li *et al.*, 1997a; Li *et al.*, 1997b; Zafari *et al.*, 1998). La dysfonction endothéliale associée à un stress oxydatif, qui est une caractéristique des maladies cardio-vasculaires, est observée dans des modèles animaux d'IC ainsi que chez l'homme (Katz *et al.*, 1992; Drexler *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 2005; Bauersachs & Widder, 2008). Cette dysfonction peut entraîner une libération réduite des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) tel que le NO ou bien accrue des facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCF) (Fang & Marwick, 2002). La conséquence majeure de la dysfonction endothéliale est une diminution de la biodisponibilité du NO (Cai & Harrison, 2000). Le stimulus physiologique le plus important pour induire l'expression génique de la NOS endothéliale (eNOS) est la contrainte de cisaillement « shear stress » (Harrison *et al.*, 2006). En tenant compte que l'altération de la fonction ventriculaire gauche lors de l'IC provoque une réduction du flux sanguin dans les artères de conductance et périphériques, ainsi moins de «shear stress» exercée sur la surface luminale de l'endothélium entraîne une baisse de production de NO dérivé de l'endothélium et donc la réduction de la dilatation endothélium-dépendante. En effet, dans différents modèles d'IC, l'expression de la eNOS est réduite (Smith *et al.*, 1996; Comini *et al.*, 1996). Cependant, les données sur la production de NO basale dans l'IC sont controversées : certains travaux mettent en évidence une augmentation (Drexler & Lu, 1992; Habib *et al.*, 1994) suggérant une surexpression de la forme inductible de la NOS (iNOS) (Haywood *et al.*, 1996). A l'inverse, d'autres études n'ont

observé aucune modification ou alors une diminution du niveau de NO basal dans l'IC (Kubo *et al.*, 1994; Mohri *et al.*, 1997).

Une autre cause majeure de réduction de la biodisponibilité du NO dans la paroi vasculaire dans l'IC est l'augmentation de la libération des ERO et plus particulièrement des anions  $O_2^-$  (Bauersachs *et al.*, 1999; Arimura *et al.*, 2001; Bauersachs *et al.*, 2002). Le NO et les radicaux superoxydes réagissent ensemble pour former l'anion peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), un oxydant puissant. Le NO qui a subi cette réaction n'est plus en mesure d'induire la vasodilatation, participant ainsi à la dysfonction endothéliale (Harrison, 1997). La NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase semble être la principale source de superoxyde vasculaire chez des animaux IC (Bauersachs *et al.*, 1999). L'angiotensine II et le TNF- $\alpha$ , tous deux connus pour être augmentés chez les patients atteints d'IC, peuvent considérablement stimuler l'activité et l'expression de cette oxydase. D'autre part, une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes comme la SOD et la catalase dans l'IC conduit à l'augmentation des niveaux d' $O_2^-$  (Landmesser *et al.*, 2002), et le transfert de gènes extracellulaire de la SOD améliore la fonction endothéliale chez des rats atteints d'IC (Iida *et al.*, 2005).

Bien que la diminution de la biodisponibilité du NO soit connue pour engendrer une hausse du tonus vasculaire, les modèles animaux et des études humaines ont montré que la vasorelaxation endothélium-indépendante, à l'image de celle dépendante de l'endothélium, est également altérée dans l'IC (Kaiser *et al.*, 1989; Kubo *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1992). Une étude a également mis en évidence que dans un modèle de rat IC, l'altération de la vasodilatation NO-dépendante est présente malgré une production de NO basale intacte. En outre, ils ont démontré que le blocage des récepteurs à l'angiotensine II rétablit la réponse vasodilatatrice rénale à l'acétylcholine (Abassi *et al.*, 1997). En 2003, l'étude de Gschwend *et al.* a montré que les artères d'un modèle de rats IC par ligature de l'artère coronaire étaient plus sensibles à la pression et développaient des constriction myogéniques plus importantes que celles des animaux contrôles. Les artères des rats IC étaient également plus sensibles à la stimulation à l'Ang II exogène, mais la constriction maximale était similaire dans les deux groupes. Ainsi cette étude met en avant une possible activation constitutive des récepteurs  $AT_1$  musculaires lisses dans l'IC entraînant un déplacement de la courbe concentration-réponse indépendamment de l'agoniste due à une synthèse d' $IP_3$  et un niveau d'activité PLC élevés en condition basale sans angiotensine II (Gschwend *et al.*, 2003). Un autre groupe a

montré que chez les rats IC, la diminution de la sensibilité à la vasodilatation NO-dépendante peut être attribuée à la réduction de l'expression de l'isoforme LZ<sup>+</sup> de la sous-unité régulatrice MYPT1 de la MLCP (LZ<sup>+</sup> MYPT1) (Karim *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). En effet, la vasodilatation médiée par l'activation de la MLCP via la PKG requiert la présence de cette isoforme LZ<sup>+</sup> MYPT1 (Huang *et al.*, 2004). Cela suggère donc que l'altération de la vasorelaxation médiée par le NO qui caractérise l'IC réside en partie au niveau du ML et se manifeste par la diminution d'expression de l'isoforme LZ<sup>+</sup> MYPT1.

### **III.C. Altération de la voie AMPc au cours de l'IC**

De nombreuses études ont rapporté une dérégulation de la voie de signalisation  $\beta$ -adrénergique (diminution d'expression et de densité des  $\beta$ -ARs, désensibilisation des  $\beta_1$ -ARs) cardiaque dans l'IC (Bristow *et al.*, 1982; Bristow *et al.*, 1993; Bristow *et al.*, 1994; Maurice *et al.*, 1999; Lohse *et al.*, 2003). Plus récemment, des altérations de l'expression, de la distribution et/ou de l'activité des PDE cardiaques ont également été décrites au stade de l'hypertrophie cardiaque (Yanaka *et al.*, 2003; Abi-Gerges *et al.*, 2009) et dans l'IC (Lehnart *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2005; Pokreisz *et al.*, 2009). Bien que moins d'attention ait été accordée au système vasculaire, la plupart des études ont mis en évidence une diminution de la vasorelaxation  $\beta$ -AR dans les artères systémiques et/ou pulmonaires de différents modèles d'animaux IC (Mathew *et al.*, 1993; Nasa *et al.*, 1996; Toyoshima *et al.*, 1998; McGoldrick *et al.*, 2007), dans certains cas liée à une diminution de la densité des récepteurs  $\beta$ -AR (Kiuchi *et al.*, 1993; Gaballa *et al.*, 2001).

Des résultats indiquent que la relaxation d'aorte de rats IC est diminuée en raison d'une dysfonction de la voie de transduction du signal médiée par l'AMPc. Les auteurs suggèrent que la diminution de la vasorelaxation AMPc-dépendante induite par l'isoprénaline dans l'IC est due à une dysfonction de l'AC dans les CML et à une production réduite de NO par l'endothélium qui semble contribuer à l'effet relaxant de l'AMPc par un mécanisme encore inconnu. En effet, cette réponse relaxante est partiellement restaurée par un traitement à long terme avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, le trandolapril, chez les rats IC. Le mécanisme sous-jacent peut être attribué en partie à la restauration de la fonction endothéliale et donc de la production de NO (Nasa *et al.*, 1996; Toyoshima *et al.*, 1998).

Les modifications de la voie  $\beta$ -adrénergique vasculaire dans l'IC altèrent directement la fonction hémodynamiques (Gaballa *et al.*, 2001) et peuvent être corrélées à celles qui interviennent au niveau cardiaque supportant le concept d'une signalisation neurohormonale systémique commune dans l'IC qui est en partie responsable de la progression de la pathologie. Bien que les  $\beta$ -bloquants améliorent la survie des patients atteints d'IC, les mécanismes responsables de ce bénéfice ne sont pas clairement déterminés et pourrait être attribués à des effets vasculaires. Compte tenu que la vasorelaxation induite par de nombreux agents via une augmentation des nucléotides cycliques est généralement diminuée dans l'IC, les PDE représentent un candidat de choix dans la recherche de nouvelles cibles de la signalisation AMPc pouvant faire l'objet de développement d'agents thérapeutiques spécifiques au niveau du système vasculaire.

Des modifications de l'activité et de l'expression de PDE peuvent conduire à des conséquences pathologiques, qui pourraient être reversées par l'activation ou l'inhibition sélectives de certaines isoformes de PDE. Il a notamment été montré que la PDE1A1 est surexprimée dans le phénomène de tolérance dans le cadre d'un traitement chronique aux dérivés nitrés. L'inhibition de l'activité de PDE1 permet de restaurer partiellement la sensibilité à une nouvelle exposition d'un donneur de NO des aortes de rat tolérantes (Kim *et al.*, 2001). Dans l'athérosclérose, l'expression et l'activité de PDE3 dans l'aorte sont significativement augmentées (Nagaoka *et al.*, 1998). De plus, l'administration orale d'un inhibiteur sélectif de PDE3, la milrinone, réduit le nombre de CML activé et supprime en conséquence l'épaississement de l'intima en prévenant la prolifération des CML depuis la média (Kondo *et al.*, 1999). Une autre étude a montré que l'inhibition de PDE1C dans des CML isolées de lésions athéroscléreuses d'aorte entraîne la suppression de leur prolifération. Comme PDE1C n'est pas présente dans CML quiescentes, les inhibiteurs de PDE1C peuvent cibler les CML qui prolifèrent dans les lésions athéroscléreuses ou lors de la resténose (Rybalkin *et al.*, 2002).

Concernant l'IC, il a été fait état d'une augmentation de l'activité PDE3, sans modification de la PDE4, dans l'aorte de rat Dahl sensible au sel, au stade d'IC. Cette altération n'est pas observée à un stade plus précoce d'HTA et d'hypertrophie cardiaque (Takahashi *et al.*, 2002). Toutefois, l'impact de cette pathologie sur le rôle fonctionnel des PDE vasculaires reste peu connu.

# **OBJECTIFS**

L'objectif général de ma thèse était d'évaluer le rôle des PDE-AMPC dans la régulation de la signalisation dépendante de l'AMPC dans la CMLV, non seulement à l'échelle subcellulaire, mais également dans un modèle intégré d'artère intacte saine et pathologique.

Dans une première partie, nous avons évalué, en temps réel, dans des CML isolées d'aorte de rat en culture, les signaux AMPC dans différents compartiments cellulaires grâce à des sondes fluorescentes basées sur la technique d'imagerie de Transfert d'Energie de Fluorescence par Résonance (FRET). L'objectif initial de cette partie a été l'étude de l'influence des différentes familles de PDEs dans la réponse  $\beta$ -adrénergique et la caractérisation des sous-types ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ ) de récepteurs impliqués dans cette réponse. Les résultats nous ont amenés à évaluer l'influence de la densité des CMLVs en culture sur l'expression des PDEs et leur implication fonctionnelle.

Dans une seconde partie, nous avons évalué le rôle des PDE-AMPC dans la régulation du tonus vasculaire dans deux lits vasculaires différents : des artères de conductance (aorte) et de résistance (artère mésentérique) isolées à partir de rat sain et pathologique (modèle de rat IC par surcharge de pression).

Le rôle fonctionnel des PDEs a été évalué grâce à une approche pharmacologique, à l'aide d'inhibiteurs sélectifs des différentes familles de PDEs. Ces études fonctionnelles ont été complétées par des mesures d'expression d'ARNm et d'activité enzymatique des PDEs dans nos différents modèles cellulaires.

# MATERIEL ET METHODES



## **I. Modèles expérimentaux**

### **I.A. Isolement et culture des CML d'aorte de rat**

#### **I.A.1. Dissociation des CML aortiques**

Les CML sont isolées à partir des aortes thoraciques de trois rats Wistar mâles, âgés de 6 semaines (180-200 g) selon la méthode décrite par Vallot *et al.* (Vallot *et al.*, 2000). Les rats sont anesthésiés avec du Pentobarbital (60 mg/kg) par injection intra-péritonéale puis placés en décubitus dorsal pour effectuer la thoracotomie. Après avoir extrait le cœur, l'aorte thoracique est rapidement prélevée et placée dans un milieu de culture froid sans sérum (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM; GIBCO, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) additionné d'un mélange antibiotique/antimycotique (100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 0,25 µg/ml amphotéricine B; GIBCO) (**Milieu A**) puis transférée dans la même solution à température ambiante. La crosse aortique est éliminée pour ne garder que la partie thoracique de l'aorte afin d'avoir une population de CML la plus homogène possible. Les tissus adipeux et conjonctifs sont soigneusement retirés et l'aorte est ouverte longitudinalement pour supprimer la couche de cellules endothéliales en grattant l'intérieur avec le dos d'une pince. L'élimination de l'adventice est réalisée grâce à un premier traitement enzymatique. Les artères sont ainsi placées dans une boîte de pétri, face externe contre le fond, pendant 45 minutes dans une solution enzymatique contenant le milieu A et la collagénase de type II (150 U/ml; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA), à l'incubateur 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, 37°C. L'adventice est ensuite retirée mécaniquement, puis la média est découpée en petits fragments qui sont, transférés dans un erlenmeyer contenant un second milieu enzymatique : Milieu A + collagénase de type II (60 U/ml) + élastase (0,3 mg/ml; MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA). Ce mélange est alors mis sous agitation dans un bain-marie (180 rpm) à 37°C pendant 30 minutes. En prenant soin de laisser sédimenter les fragments et de ne prélever que le liquide, ce dernier est centrifugé (3 minutes à 1250 rpm) et le culot contenant les cellules endothéliales et les fibroblastes est jeté alors que le surnageant est transféré dans l'erlenmeyer. Cette étape est ensuite répétée quatre fois en remettant en suspension le culot contenant les CML dans le milieu de culture A enrichi en sérum de veau foetal (20% FBS, Fetal Bovine Serum "Gold"; PAA Laboratories, Les Mureaux, France) (**Milieu B**) afin de stopper la digestion enzymatique. A la fin de la dernière incubation, le lysat tissulaire est directement homogénéisé dans l'erlenmeyer et mis en

commun avec les autres CML isolées. Enfin, le tube de CML isolées est centrifugé (3 minutes à 1250 rpm), le culot est remis en suspension dans le milieu B et transféré à l'incubateur dans une flasque de culture (25 cm<sup>2</sup>) préalablement traitée avec 5 µg/cm<sup>2</sup> de collagène de type I afin de permettre l'adhésion des CML.

### **I.A.2. Culture des CML aortiques**

Les cellules sont tout d'abord maintenues dans le milieu B enrichi en sérum (20% FBS) pendant 48 heures afin de favoriser leur adhésion. Après 48 heures, le milieu est remplacé par un milieu de culture classique (**Milieu C** : Milieu A additionné de 10% de FBS) qui est changé tous les deux à trois jours jusqu'à confluence des CML. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont repiquées et réensemencées dans une nouvelle boîte de culture (75 cm<sup>2</sup>). Pour cela, les cellules sont rincées avec du tampon PBS afin d'éliminer le sérum et 2 ml de trypsine-EDTA sont ensuite ajoutés au flacon de culture qui est incubé pendant 3 minutes à 37°C afin de favoriser l'action de l'enzyme et le décollement des cellules. La réaction est arrêtée en ajoutant 6 ml de milieu C, les cellules sont transférées dans un tube, comptées à l'aide d'une cellule de malassez puis réparties dans de nouvelles flasques de culture. Toutes les expériences ont été réalisées avec des CML en culture entre P2 et P6. Dans ce cas, les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture à raison de 3.10<sup>3</sup> ou 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> suivant la densité cellulaire souhaitée et les protocoles expérimentaux réalisés. Les boîtes de 35 mm de diamètre utilisées ont été modifiées au laboratoire afin de réduire leur contenance à 400 µl, en perçant leur fond et en collant une lamelle de verre couvre-objet (surface ≈ 2,5 cm<sup>2</sup>).

### **I.B. Modèle animal d'IC**

Toutes les expériences ont été réalisées conformément au European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, *CE Off J* n° L358, 18 décembre 1986), aux lignes directrices du comité d'éthique local (CREEA Ile-de-France Sud), et conformément au décret français n° 87-848 du 19 octobre 1987 (*Journal Officiel de la République Française*, 20 octobre 1987, pp. 12245-12248). Les autorisations pour effectuer les expériences ont été obtenues auprès du Ministère français de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation (n° 7475, 27 mai, 1997). Tous les animaux ont été nourris *ad libitum* et hébergés dans des pièces dans lesquelles l'alternance jour/nuit de 12h/12h et une température constante de 22°C sont imposées.

### **I.B.1. Procédure chirurgicale**

Ce modèle d'induction de l'insuffisance cardiaque (IC) par surcharge de pression est bien maîtrisé au sein du laboratoire et largement décrit dans la littérature (Feldman *et al.*, 1993; De Sousa *et al.*, 1999; Joubert *et al.*, 2008). La chirurgie a été effectuée sur la plateforme animalerie et exploration fonctionnelle de notre site (IFR 141, Châtenay-Malabry) par Valérie Domergue-Dupont.

L'intervention chirurgicale a été réalisée sur des rats mâles Wistar (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, France) âgés de 3 semaines (poids  $\approx$  60 g), anesthésiés par le pentobarbital sodique (60 mg/kg) et mis sous ventilation (75 respirations/min) grâce à un ventilateur (small animal ventilator, SAR-830/p, ventilator CWe inc Ardmore USA). Une thoracotomie a été réalisée pour procéder à la sténose aortique, afin d'induire une surcharge de pression. Pour cela, un clip en titane (hemoclip plus small reference WK533835, Teleflex Medical) a été placé sur la partie ascendante de l'aorte thoracique, entre le cœur et la crosse aortique. La réussite de l'induction de l'IC dépend fortement du serrage du clip car peu serré, il ne provoque pas d'IC alors qu'au contraire, trop serré, il peut augmenter le taux de mortalité post-opératoire. Ainsi, la fermeture du clip à l'aide d'une pince (Small curved 15 cm appliers for hemoclip plus référence WF533140) calibrée avec une cale à bougie permet de standardiser le diamètre interne du clip qui est pour notre modèle d'étude de 0,6 mm. Ce procédé consiste donc en une sténose progressive de l'aorte où la constriction se met en place au cours du développement de l'animal. Les rats contrôles (SHAM) appariés par l'âge ont subi la même procédure chirurgicale sans mise en place du clip.

### **I.B.2. Evaluation échocardiographique et anatomique de l'IC**

Au cours du développement des rats, nous avons procédé à des analyses échocardiographiques sur 10 rats SHAM et 9 rats sténosés, à cinq temps différents (2, 4, 7, 11 et 22 semaines après la chirurgie), nous permettant ainsi d'évaluer la dysfonction cardiaque et la mise en place de l'IC dans le groupe sténose. L'exploration de la fonction cardiaque par échocardiographie a été effectuée au sein du laboratoire par Philippe Matéo, au moyen d'une sonde spécifiquement dédiée aux petits animaux (Vivid 7, 12MHz, General Electric Healthcare). Chez le rat, ce type de mesure nécessite une anesthésie préalable par inhalation d'un gaz d'isoflurane 2,5% de manière à obtenir une anesthésie très légère pour minimiser les effets, tels que la diminution de la fréquence cardiaque, que pourraient avoir l'anesthésique sur la fonction cardiaque. Le dispositif utilisé a permis d'obtenir des images en deux

dimensions à partir desquelles le diamètre de la cavité du ventricule gauche en diastole (Dtd) et en systole (Dts) a été déterminé afin de calculer la fraction de raccourcissement (FR = [(Dtd-Dts)/Dtd] x 100) qui représente la propriété contractile du cœur (Prunier *et al.*, 2002). La masse ventriculaire gauche a été calculée selon la formule de Penn, adaptée au cœur de rat :

$$\text{Masse ventriculaire gauche} = 1.04 \times [(Dtd+SIV+PP)^3 - (Dtd)^3].$$

Tous les autres rats ont été sacrifiés 22 semaines après la chirurgie pour prélever l'aorte et l'artère mésentérique et réaliser les différentes expériences. Lors de l'étape de dissection, le poids du corps, du cœur, des poumons, des reins, du foie et la longueur du tibia ont été mesurés. Ces paramètres anatomiques ainsi que les symptômes liés à la pathologie tels que l'épanchement pleural et l'ascite observés lors de la dissection ont permis de caractériser et de valider notre modèle de rat IC.

## II. Agents pharmacologiques

Les différents agents pharmacologiques utilisés lors des expériences de FRET, de réactivité vasculaire et de biochimie sont présentés dans la **Table 2** ci-dessous.

Agent pharmacologique	Propriétés pharmacologiques	Concentrations utilisées	Fournisseurs
Acétylcholine (ACh)	Agoniste des récepteurs muscariniques et nicotiniques	0,1 nM à 30 $\mu$ M	Sigma Aldrich
BAY-60-7550	Inhibiteur de PDE2	100 nM	Cayman Chemical
BRL 50481	Inhibiteur de PDE7	50 $\mu$ M	Tocris Bioscience
Carbachol (Cch)	Agoniste des récepteurs muscariniques et nicotiniques	1 nM à 10 $\mu$ M	Sigma Aldrich
CGP-20712A	Antagoniste $\beta_1$ -adrénergique	100 nM	Sigma Aldrich
Cilostamide (Cil)	Inhibiteur de PDE3	1 $\mu$ M	Tocris Bioscience
ICI 118,551	Antagoniste $\beta_2$ -adrénergique	5 nM	Sigma Aldrich
Indométhacine (Indo)	Inhibiteur de COX (Cyclooxygénase)	10 $\mu$ M	Sigma Aldrich
Isoprénaline (Iso)	Agoniste $\beta$ -adrénergique	10 ou 100 nM 0,1 nM à 30 $\mu$ M	Sigma Aldrich
N $\omega$ -nitro-L-arginine-méthyl ester (L-NAME)	Inhibiteur de NOS (NO Synthase)	300 $\mu$ M	Sigma Aldrich
Phentolamine	Antagoniste $\alpha$ -adrénergique	10 $\mu$ M	Sigma Aldrich
Prostaglandine F <sub>2<math>\alpha</math></sub> (PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> )	Agoniste des récepteurs aux prostanoïdes FP	1 nM à 30 $\mu$ M	Pfizer
Ro-20-1724 (Ro)	Inhibiteur de PDE4	10 $\mu$ M	Calbiochem
U46619	Agoniste des récepteurs TP	1 nM à 3 $\mu$ M	Cayman Chemical
3-isobutyl-1-méthylxantine (IBMX)	Inhibiteur non sélectif des PDEs	300 $\mu$ M	Sigma Aldrich
8-méthoxyméthyl-3-isobutyl-1-méthylxanthine (MIMX)	Inhibiteur de PDE1	10 $\mu$ M	Calbiochem

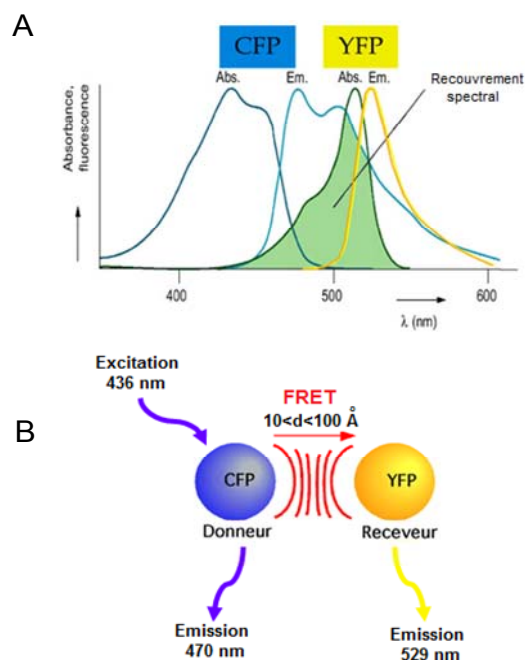
**Table 2** : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés.

## III. Technique d'imagerie par FRET

### III.A. Principe

Le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, *fluorescence resonance energy transfert*) a été décrit par Förster en 1948. Cette technique est de plus en plus utilisée dans le cadre de la recherche biomédicale et dans la découverte de médicaments

grâce à son application au screening à haut débit. Il est encore de nos jours l'un des rares outils disponibles pour mesurer les interactions à l'échelle nanométrique et les changements dans les distances, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Il s'agit d'un processus non radiatif par lequel l'énergie est transférée d'un fluorophore dans un état excité (le donneur) à un second fluorophore (l'accepteur). L'énergie absorbée par le premier fluorophore est dissipée par émission de fluorescence de celui-ci, à moins qu'il ne se trouve à proximité d'un fluorophore accepteur. Dans ce cas de figure, le transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur résultera en une diminution du signal de fluorescence du donneur et en une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Les conditions requises pour observer ce phénomène sont définies par le recouvrement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'excitation de l'accepteur, par la distance entre les fluorophores considérés (<100 Å) et par une orientation appropriée des dipôles de transition électronique (**Figure 24**).



**Figure 24** : Les conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une YFP). Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption du receveur (A) et lorsque ces fluorophores présentent une orientation et une distance (<100 Å) favorables (B). CFP: Cyan Fluorescent Protein, YFP: Yellow Fluorescent Protein.

Les méthodes permettant de mesurer l'efficacité de ce transfert sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude des interactions entre macromolécules. Le FRET peut

être considéré comme une règle spectroscopique permettant non seulement de colocaliser deux macromolécules avec une résolution supérieure à celle obtenue par imagerie de fluorescence, de mesurer la distance entre 2 fluorophores, mais également comme dans le cas de notre étude, de mesurer les signaux de petites molécules ou des activités enzymatiques d'intérêt biologique. Les progrès récents de la technique ont conduit à des améliorations qualitatives et quantitatives, notamment l'augmentation de la résolution spatiale et de la sensibilité des fluorophores ainsi que du système de détection.

### **III.B. Installation de FRET**

Les cellules sont visualisées à l'aide d'un microscope inversé (Nikon) muni d'un objectif à huile de grossissement X40 relié à une caméra CCD (Cooled charge coupled camera, Cool SNAP HQ2) commandée par un logiciel (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La CFP est excitée pendant 300 msec par une lampe Xenon (100 W, Nikon) en utilisant un filtre de 440/20BP (Band Pass) ainsi qu'un miroir dichroïque 455LP (Long Pass). Un séparateur d'images (DualView, Hamamatsu) équipé d'un miroir dichroïque 510LP et de 2 filtres BP 480/30 nm (pour la CFP) et 535/25 nm (pour la YFP) permet de séparer les images CFP et YFP. L'acquisition des images par la caméra a lieu toutes les 5 secondes.

### **III.C. Sondes FRET sensibles à l'AMPc**

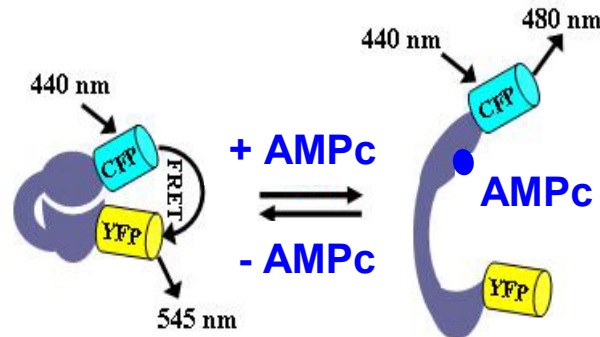
Trois sondes FRET sensibles à l'AMPc ont été utilisées dans cette étude :

- Epac1-camps (Nikolaev *et al.*, 2004), contenant l'unique domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac1 fusionné aux fluorophores CFP et YFP, permet de mesurer les taux d'AMPc intracellulaire.

- Epac2-camps (Nikolaev *et al.*, 2004), codant pour le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac flanqué des fluorophores CFP et YFP, permet de mesurer les taux d'AMPc intracellulaire.

- Lyn-Epac2-camps (Wachten *et al.*, 2010), correspondant à la sonde Epac2-camps modifiée par l'ajout du motif SH4 de la protéine kinase Lyn sur la région N-terminale. Cette construction permet d'adresser la sonde à la membrane et donc de mesurer les taux d'AMPc à la membrane.

Ces trois sondes sont donc basées sur la même construction comprenant le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac (Epac1 ou Epac2) (**Figure 25**).



**Figure 25** : Représentation du phénomène de FRET de la sonde Epac.  
(Adapté de (Nikolaev *et al.*, 2005))

A l'état basal, l'excitation de la CFP à la longueur d'onde de 440 nm conduit à un transfert d'énergie de la CFP vers la YFP qui émet à 535 nm. Lorsque la concentration en AMPc augmente dans la cellule, la fixation du second messager au niveau du domaine de liaison de la sonde Epac-camps induit un changement conformationnel de la protéine et un éloignement des fluorophores. Ceci conduit à l'arrêt du phénomène de FRET. Le rapport « fluorescence émise par CFP/ fluorescence émise par YFP » (CFP/YFP) est donc proportionnel à la concentration d'AMPc.

### **III.D. Expression des sondes FRET AMPc dans les CML**

Deux modes d'expression des sondes FRET ont été utilisés, l'infection adénovirale et la transfection plasmidique. Celles-ci sont effectuées le lendemain de l'ensemencement des CML dans les boîtes de culture, soit 12 heures après. Les cellules sont alors rincées avec le PBS et l'adénovirus ou bien le plasmide sont additionnés au milieu de culture afin d'exprimer la sonde FRET.

#### **III.D.1. Infection adénovirale**

Les adénovirus sont utilisés à différentes concentrations selon la capacité d'infection de chacun. Le nombre de particules virales actives par cellule définit la MOI (multiplicité d'infection). Pour un virus donné, la MOI optimale est la MOI minimale permettant d'obtenir



une expression de la sonde dans pratiquement 100% des cellules tout en ayant un taux de mortalité due à l'infection minimal. Afin de répondre à ces exigences, de limiter la quantité de virus utilisée et d'obtenir des cellules isolées lors des expériences de FRET, les CML sontensemencées à une densité de  $3.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> et infectées aux MOI indiquées pour les virus suivants :

-Adénovirus Epac2-camps : Les CML sont infectées avec une MOI de 500 pour une expression optimale de la sonde après 48 heures qui permet de mesurer un signal FRET correspondant à l'AMPC cytosolique. Pour les besoins d'expériences complémentaires nous avons également infecté des CMLensemencées à une densité plus élevée de  $10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>, avec la même MOI. Cela a nécessité une quantité importante de virus sans pour autant augmenter le taux de mortalité des cellules.

-Adénovirus Lyn-Epac2-camps : Dans le cas de cette sonde, les CML sont infectées avec une MOI de 600 pour une expression strictement membranaire de la sonde après 24 heures qui permet de mesurer un signal FRET correspondant à l'AMPC sous-membranaire.

### **III.D.2. Transfection plasmidique**

Cette technique utilise la propriété de particules lipidiques cationiques, telles que la lipofectamine 2000 (Invitrogen), pour faire pénétrer l'ADN de la sonde Epac1-camps, contenue dans un plasmide pcDNA3, dans les CML.

Dans un premier temps, la solution A (2 µg d'ADN Epac1-camps soit 2 µl/boite) et la solution B (4 µl/boite de lipofectamine 2000, soit le ratio ADN/lipofectamine = ½) sont préparées dans un milieu OPTI-MEM (Invitrogen). Après 5 minutes, les deux solutions sont mélangées et incubées à 37°C pendant 20 minutes. Les particules de lipofectamine entrent alors en contact avec l'ADN et l'incorporent. Le mélange est ensuite mis en contact avec les CML à 80% de confluence (ensemencées à la densité de  $10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>), préalablement rincées avec de l'OPTI-MEM, pour qu'elles fusionnent avec la membrane cellulaire ce qui permet l'entrée de l'ADN dans les cellules-cibles. Le milieu de transfection est aspiré après 6 heures et remplacé par du milieu de culture classique (Milieu C). Les expériences de FRET sont réalisées 42 heures après la transfection.

### **III.E. Protocoles expérimentaux de FRET**

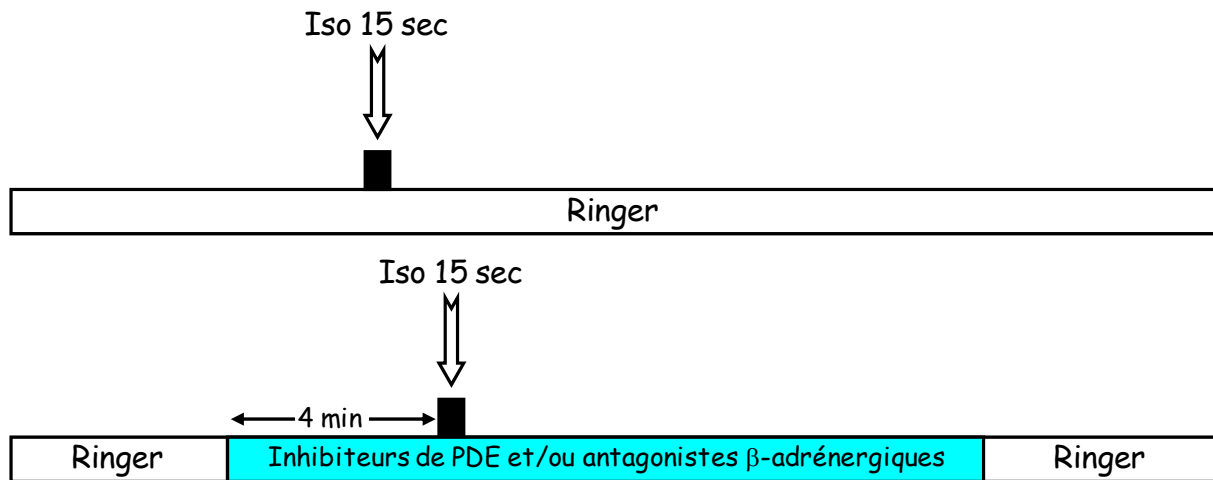
Tout d'abord, le milieu de culture des CML est remplacé par une solution physiologique de Ringer (**Table**) dans laquelle les cellules sont maintenues tout au long de l'expérience de

FRET. Les différents agents pharmacologiques utilisés (**Table 3**) sont préparés dans le Ringer. L'isoprénaline (Iso) est appliquée de façon brève (15 secondes) à la concentration de 10 ou 100 nM grâce à un système de perfusion externe dont l'embout est placé à proximité de la cellule fluorescente sélectionnée et qui contient dans chaque capillaire une solution d'intérêt. Pour le protocole des courbes concentration-réponse obtenues avec la sonde Epac1-camps, l'Iso est appliquée à des concentrations successives et croissantes (0,1 nM à 1  $\mu$ M) de façon maintenue jusqu'à ce qu'un état stable soit atteint.

<b>Composé</b>	<b>Concentration (en mM)</b>
<b>HEPES</b>	10
<b>NaCl</b>	121,6
<b>Glucose</b>	5
<b>Na pyruvate</b>	5
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	4,013
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,8
<b>KCl</b>	5,4
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,8
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,8
<b>pH</b>	7,4

**Table 3 : Composition de la solution de Ringer utilisée lors des expériences de FRET.**

Afin d'évaluer l'implication des sous-types de récepteurs  $\beta$ -AR et des familles de PDEs dans la régulation des signaux AMPc cytoplasmique et membranaire, une stimulation brève à l'Iso (10 ou 100 nM, 15 secondes) en absence ou en présence des inhibiteurs de PDE et/ou des antagonistes des  $\beta_1$ -AR ou  $\beta_2$ -AR, est réalisée. Chaque inhibiteur est appliqué de façon continue avant (pendant 4 minutes) et après le pulse (**Figure 26**).



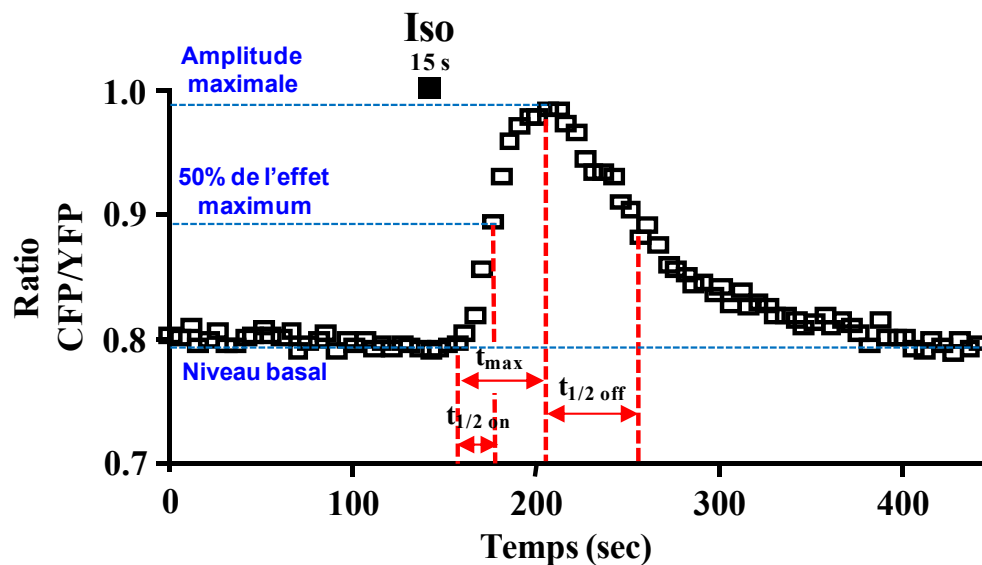
**Figure 26 : Protocoles de stimulation utilisés lors des expériences de FRET.**

### **III.F. Analyses des données de FRET**

Les intensités moyennes de la fluorescence émise par la CFP et la YFP sont mesurées dans une région d'intérêt qui comprend l'ensemble de la cellule sélectionnée. Le bruit de fond, mesuré dans une région de l'image ne comprenant pas de cellule, est soustrait à l'intensité de la CFP et de la YFP. Le chevauchement des spectres d'émission de la CFP et de la YFP, « bleed through », se traduit par le passage d'une partie de l'émission de la CFP à travers le canal de détection de la YFP. La proportion de ce bleed through dépend des filtres d'émission utilisés. Nous avons exprimé la CFP seule dans nos cellules ce qui nous a permis d'estimer que 50% de la fluorescence de la CFP était mesurée dans le canal YFP. Ainsi le niveau d'AMPC détecté correspond au rapport corrigé  $CFP / [YFP - (0,5 * CFP)]$ .

Les résultats sont exprimés en % d'augmentation par rapport au niveau basal. La réalisation de plusieurs expériences du même type permet de calculer des valeurs moyennes du % d'augmentation  $YFP/CFP \pm$  des erreurs standards (ESM). Les paramètres cinétiques des réponses transitoires de l'AMPC sont déterminés par le calcul de l'amplitude maximale du signal, du temps mis pour atteindre l'effet maximum ( $t_{max}$ ), du temps mis pour atteindre la moitié de l'effet maximum ( $t_{1/2on}$ ), du temps à partir du pic de la réponse pour atteindre la moitié de la décroissance du signal ( $t_{1/2off}$ ) en utilisant le logiciel Microsoft Excel (**Figure 27**). La moyenne ( $\pm$  ESM) des paramètres cinétiques est calculée pour chaque condition

expérimentale. Les images ratiométriques sont obtenues en utilisant un plugin dédié développé sur le logiciel ImageJ 1.46e (National Institutes of Health).



**Figure 27** : Paramètres cinétiques des signaux AMPc en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique transitoire (pulse d'isoprénaline de 15 sec).

#### **IV. Réactivité vasculaire**

Les études de réactivité vasculaire sont effectuées sur l'aorte thoracique et de l'artère mésentérique isolées des rats de chaque lot (SHAM et IC), 22 semaines après la chirurgie. Le laboratoire dispose de deux systèmes d'exploration de la force de contraction en isométrie : un système de cuves à organes isolés classiques (**Figure 28**) adapté à l'étude des gros vaisseaux (aorte) et un myographe (Danish MyoTechnology, Aarhus, Denmark, **Figure 29**) destiné aux petits vaisseaux (artères mésentériques). La fonction vasculaire (réponse contractile et fonction endothéliale) a été évaluée dans les deux types d'artères chez les rats SHAM et IC. Pour apporter des éléments de réponses aux questions posées dans les objectifs de l'étude, la relaxation  $\beta$ -adrénergique et l'implication des PDE-AMPC dans la réactivité vasculaire ont été explorées par une approche pharmacologique.

##### **IV.A. Isolement des artères**

L'animal est anesthésié avec du Pentobarbital (60 mg/kg) par injection intra-péritonéale, pesé et placé en décubitus dorsal pour effectuer la thoracotomie. Après avoir extrait le cœur,

l'aorte thoracique est rapidement dégagée puis une ouverture abdominale est réalisée afin de prélever une partie du réseau vasculaire mésentérique. Les tissus sont immédiatement placés dans une solution de Krebs froide (**Table 4**), soigneusement nettoyés de leurs tissus adipeux et conjonctifs et les artères sont coupées en anneaux (2 mm de long pour l'aorte et 1,5 to 2 mm pour les artères mésentériques). Dans certaines expériences, l'endothélium de l'aorte a été enlevé mécaniquement en frottant doucement l'intérieur des anneaux avec une pince fine.

Composants	Concentration (en mM)		
	Krebs	KCl 60 mM	KCl 80 mM
NaCl	119	63,7	43,7
KCl	4,7	60	80
CaCl <sub>2</sub>	2,5	2,5	2,5
MgSO <sub>4</sub>	1,17	1,17	1,17
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,18	1,18	1,18
NaHCO <sub>3</sub>	25	25	25
Glucose	11	11	11

**Table 4** : Composition des solutions utilisées lors des expériences de réactivité vasculaire.

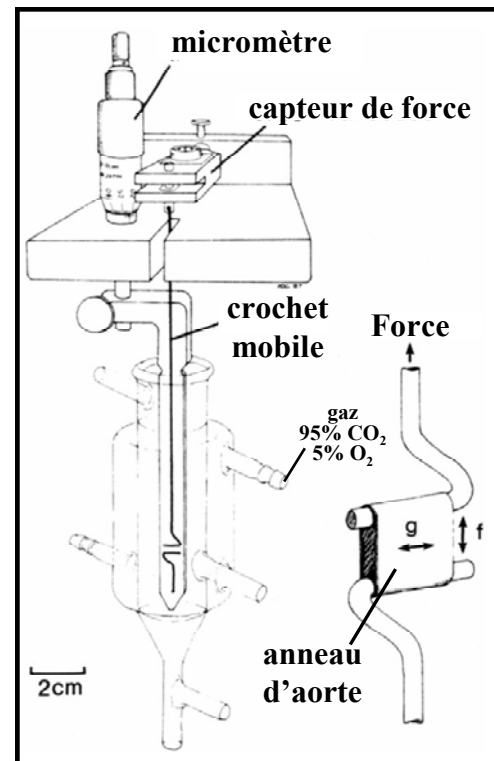
#### **IV.B. Mesures de la réactivité vasculaire**

Les anneaux des deux types d'artères sont ensuite montés dans leurs propres systèmes d'exploration fonctionnelle dont les cuves contiennent la solution physiologique à 37°C oxygénée en continu par un mélange gazeux 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>.

##### **IV.B.1. Exploration fonctionnelle de l'aorte : Le système de cuves à organe isolé**

Les anneaux aortiques ont été montés entre deux crochets dont l'un est relié à un capteur de force lui-même relié à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement des données, permettant de suivre au cours du temps la force (en g) développée par le vaisseau. Les anneaux ont été passivement étirés par paliers de 0,5 g jusqu'à leur force de repos optimale (2 g) et équilibrés pendant 60 minutes. Au début de chaque expérience, l'intégrité des vaisseaux a été évaluée par une réponse contractile à une solution dépolarisante de KCl 60 mM (solution de Krebs contenant 60 mM de KCl par substitution équimolaire du NaCl, **Table 4**). Les anneaux qui développent une contraction inférieure à 1,5 g n'ont pas été conservés pour la suite du protocole expérimental. L'intégrité fonctionnelle de l'endothéliale

a été évaluée par la capacité des anneaux pré-contractés au KCl 60 mM à se relâcher en réponse au carbachol (Cch, 10  $\mu$ M). L'amplitude de la relaxation est considérée acceptable si elle est supérieure à 20% ou 10% dans les artères intactes isolées de rats SHAM et IC, respectivement, mais absente dans les anneaux dénudés de leur endothélium.



**Figure 28** : Représentation du système de cuves à organe isolé

(Adapté de (Angus & Wright, 2000))

Suite à l'évaluation de l'intégrité des tissus, les anneaux ont été équilibrés pendant 60 minutes en changeant la solution de Krebs toutes les 15 minutes, puis deux protocoles différents ont été réalisés. Dans la première série d'expériences, la réponse contractile à des concentrations cumulatives (1 nM à 30  $\mu$ M) de l'agent vasoconstricteur prostaglandine F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> : agoniste sélectif des récepteurs aux prostanoides FP) a été réalisée sur les anneaux d'aortes.

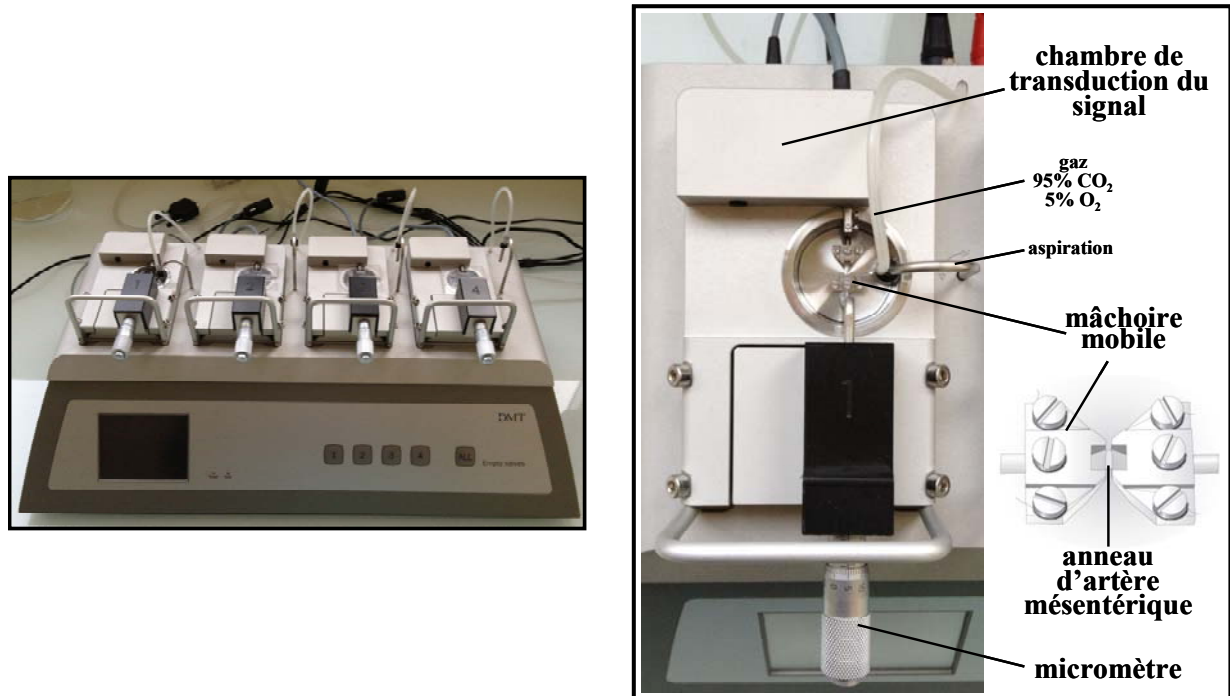
Dans la seconde série d'expériences, les anneaux aortiques ont été pré-contractés avec une concentration unique de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , induisant 80% de la réponse contractile à la solution

dépolarisante de KCl 60 mM. Lorsque la réponse contractile atteint un état d'équilibre (après environ 25 minutes), la réponse relaxante à des concentrations cumulatives d'agents vasorelaxants (carbachol, isoprénaline, inhibiteurs de PDE) est évaluée.

Dans certains cas, ces expériences ont été réalisées dans les artères prétraitées en présence d'agents pharmacologiques suivant les voies de signalisations étudiées.

#### IV.B.2. Exploration fonctionnelle des artères mésentériques : Le myographe de Mulvany

Deux fils de tungstène, de 40  $\mu\text{m}$  de diamètre chacun, sont insérés dans la lumière des anneaux des artères mésentériques. L'un d'eux est fixé à un support (ou mâchoire mobile) dont la position peut être modifiée grâce à une vis micrométrique, ce qui permet d'étirer le vaisseau selon un plan horizontal, alors que l'autre fil est fixé à une mâchoire fixe reliée à un capteur de force qui mesure la force (F) développée par le vaisseau en millinewton (mN). Les données sont transmises à un système d'acquisition et de traitement de données (LabChart 7) qui détermine la tension pariétale (T) du vaisseau en mN/mm selon la formule :  $T = F / 2l$ , avec l, la longueur du vaisseau en mm (**Figure 29**).



**Figure 29** : Représentation du système de myographie.

Chaque anneau est soumis un processus de normalisation, qui permet de déterminer, pour chaque vaisseau, sa circonférence interne (CI) normalisée (CIN) correspondant à 90% de la CI équivalente à une pression transmurale de 100 mmHg (13,3 mN/mm<sup>2</sup>). A cette valeur de CIN nous avons vérifié que la force active développée par le vaisseau est maximale. Le vaisseau est ainsi étiré progressivement, par paliers, jusqu'à atteindre une pression transmurale effective légèrement supérieure à 13,3 mN/mm<sup>2</sup>. La pression effective (PE) correspondant à chaque étirement (Et en  $\mu\text{m}$ ) est calculée, et une courbe d'extension, représentant PE en fonction de CI, est tracée. La valeur de CI est obtenue selon la formule :  $CI = [2Et + (\pi+2)d]$ , avec  $d$  = diamètre du fil de Tungstène (en  $\mu\text{m}$ )

L'intersection de la courbe d'extension avec la droite isobare de Laplace pour 100 mmHg permet de déterminer la valeur de CI du vaisseau équivalente à une pression transmurale de 13,3 mN/mm<sup>2</sup>, valeur à partir de laquelle la valeur de CIN est déduite.

L'étirement correspondant à cette valeur de CIN est appliqué à chaque vaisseau, puis une période de stabilisation de 30 minutes est observée.

Chaque expérience débute, comme pour l'aorte, par un test de la capacité contractile des artères en utilisant une solution riche en potassium (KCl 60 mM). Ensuite, la fonctionnalité de l'endothélium est évaluée par l'application d'une concentration unique d'acétylcholine (Ach, 10  $\mu\text{M}$ ) sur le plateau de contraction au KCl 60 mM. Les anneaux utilisés présentent tous une relaxation à l'Ach supérieure à 80%.

Comme pour les expériences réalisées sur l'aorte, deux protocoles sont effectués suite à la validation de l'intégrité de chaque anneau d'artère mésentérique. Pour les réponses contractiles, l'agent vasoconstricteur utilisé est le U46619 (un analogue du thromboxane A<sub>2</sub>) à des concentrations cumulatives (1 nM à 1  $\mu\text{M}$ ). Concernant la réponse relaxante à des agents vasorelaxants (acétylcholine, isoprénaline, inhibiteurs de PDE), elle est évaluée sur une pré-contraction au U46619 (1  $\mu\text{M}$ ). L'application d'une concentration unique de U46619 pour induire la pré-contraction a été choisi afin d'obtenir un plateau stable pour évaluer les réponses relaxantes aux agents vasorelaxants. Nous avons en effet constaté que l'ajout de concentrations croissantes de U46619 pour ajuster le niveau de pré-contraction en fonction de la capacité contractile de chaque anneau, comme c'est le cas pour l'aorte, ne permettait pas d'obtenir un plateau stable et rendait donc l'exploitation des résultats impossible.



#### **IV.C. Analyse des données de réactivité vasculaire**

Les réponses contractiles, exprimées en grammes ou en mN/mm, correspondent à la différence par rapport au tonus de base. Les réponses vasorelaxantes sont exprimées en pourcentage de la pré-contraction évoquée par la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ou le U46619.

La concentration produisant 50% de la réponse maximale ( $\text{CE}_{50}$ ) a été estimée, le cas échéant, pour chaque courbe concentration-réponse en utilisant l'équation de Boltzman (logiciel Origin 6) et convertie en valeur logarithmique négative ( $\text{pD}_2$ ). Toutes les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM, où «n» représente le nombre de rats.

### **V. Dosage d'activité des PDE-AMPC**

#### **V.A. Principe**

L'activité d'hydrolyse de l'AMPC par les PDE est mesurée par dosage radioenzymatique suivant une adaptation de la méthode décrite par Thompson et Appleman (Thompson & Appleman, 1971). La méthode est basée sur l'hydrolyse du 3',5'AMPC en 5'-AMP par les PDE qui est ensuite transformé en nucléoside par la 5'-nucléotidase contenue dans le venin de serpent. Une chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions permet de séparer ce produit de réaction (récolté dans des fioles) du substrat non hydrolysé (capté par la résine). Ainsi, l'incorporation de l'AMPC tritié dans la réaction permet de quantifier l'activité des PDE-AMPC qui est proportionnelle à la radioactivité mesurée dans les fioles.

#### **V.B. Préparation des extraits protéiques**

Les protéines totales ont été extraites à partir de CML en culture ou d'aortes de rats SHAM et IC. Les extraits protéiques cellulaires et tissulaires sont obtenus avec le même tampon de lyse dont la composition est la suivante (en mM) : NaCl 150, Hepes 20, (pH 7.4), EDTA 2, glycérol 10%, NP-40 (détergent) 0.5%, microcystin-LR 1 $\mu$ M et un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (Roche, Basel, Suisse). Quant au protocole de lyse, il diffère quelque peu :

- Les CML en culture sont lysées dans le tampon de lyse à 4°C. Le lysat cellulaire est récupéré en grattant les boîtes de culture et transféré dans un tube eppendorf sur glace.

- Environ 3 à 4 anneaux d'aorte sont homogénéisés dans un tube contenant des billes en céramique et 200  $\mu$ l de tampon de lyse à 4°C au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France). Le broyat est transféré dans un tube eppendorf sur glace.

A partir de cette étape, le protocole est le même pour les extraits cellulaires et tissulaires. Les tubes contenant les lysats sont centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et 12 000 g. Le surnageant contenant l'ensemble des protéines est récupéré et la concentration en protéine est dosée par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA).

### **V.C. Dosage des protéines**

La concentration protéique des solutions obtenues après l'étape de lyse a été mesurée par une méthode de colorimétrie utilisant la réduction, en milieu alcalin à 60°C, de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  en ion  $\text{Cu}^+$  par les protéines. L'acide bicinchoninique (BCA) a la propriété de se lier aux ions cuivreux  $\text{Cu}^+$  pour former un complexe (BCA-Cu) pourpre, dont la quantité est proportionnelle à la concentration en protéines. Celui-ci sera quantifié par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 562 nm.

Cette mesure d'absorbance a également été effectuée sur une gamme connue de concentrations de BSA (Bovin Serum Albumin) ayant subi les mêmes réactions colorimétriques, afin d'établir une courbe-étalon. L'absorbance mesurée pour chaque échantillon sera ainsi reportée sur cette droite-étalon afin de déterminer leur concentration protéique.

### **V.D. Protocole de dosage d'activité PDE-AMPC**

L'activité PDE-AMPC a été mesurée sur les extraits cellulaires (20-30  $\mu\text{g}$  de protéines) et tissulaires (4  $\mu\text{g}$  et 10  $\mu\text{g}$  de protéines pour les aortes et les artères mésentériques, respectivement) dans des tubes contenant un volume réactionnel de 200  $\mu\text{l}$  comprenant 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol et 1  $\mu\text{M}$  d'AMPC froid et complétées avec  $10^5$  cpm [ $^3\text{H}$ ]-AMPC, pendant 30 min à 33°C. La réaction est arrêtée par la chaleur dans un bain marie bouillant pendant 1 min. Le produit de réaction, le 5'-AMP, est ensuite hydrolysé par l'incubation du mélange réactionnel avec 50  $\mu\text{g}$  de venin de serpent (*Crotalus atrox*) pendant 20 min à 33°C. L'adénosine résultant est séparée par chromatographie d'échange d'anions en utilisant 2 ml de résine AG1-X8 (BioRad, Hercules, CA, USA) et récupérée dans des fioles contenant du liquide de scintillation. La quantification est réalisée grâce à un compteur à scintillation  $\beta$ .

Deux séries de tubes ne contenant pas de protéines sont préparées : une pour calculer la « radioactivité totale » (la radioactivité est mesurée directement sur le produit de réaction sans séparation préalable par chromatographie sur les colonnes de résine échangeuse d'anions) et

une seconde pour déterminer le « blanc » (la radioactivité est mesurée sur l'éluant après séparation sur les colonnes de résine échangeuse d'anions).

La quantité de protéines utilisée dans ce dosage est déterminée par le pourcentage d'hydrolyse de l'AMPc en absence d'inhibiteur qui doit être de 15 % suivant ce calcul :

- % d'hydrolyse =  $[(X - \text{blanc}) / (\text{radioactivité totale} - \text{blanc}) \times 100]$ , où X = radioactivité de l'éluant de l'échantillon contrôle.

Pour évaluer l'activité des différentes isoformes de PDE-AMPc, l'analyse a été effectuée en l'absence ou en présence d'inhibiteurs spécifiques des PDE. L'activité d'hydrolyse résiduelle observée en présence d'inhibiteur de PDE a été exprimée en pourcentage de l'activité PDE-AMPc totale correspondant à l'activité PDE en l'absence d'inhibiteur.

## **VI. Mesure du niveau d'expression génique par RT-PCR quantitative en temps réel**

L'expression de l'ensemble des isoformes de PDE-AMPc a été estimée par la méthode de RT-PCR. La PCR quantitative en temps réel est l'approche la plus courante pour quantifier l'expression d'un gène particulier. La première étape pour réaliser la PCR est l'extraction des ARN totaux. Ensuite la transcription inverse retranscrit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) simple brin. Puis, la dernière étape est la PCR quantitative en temps réel qui permet d'amplifier spécifiquement un ADNc de manière à quantifier le niveau d'expression du gène considéré.

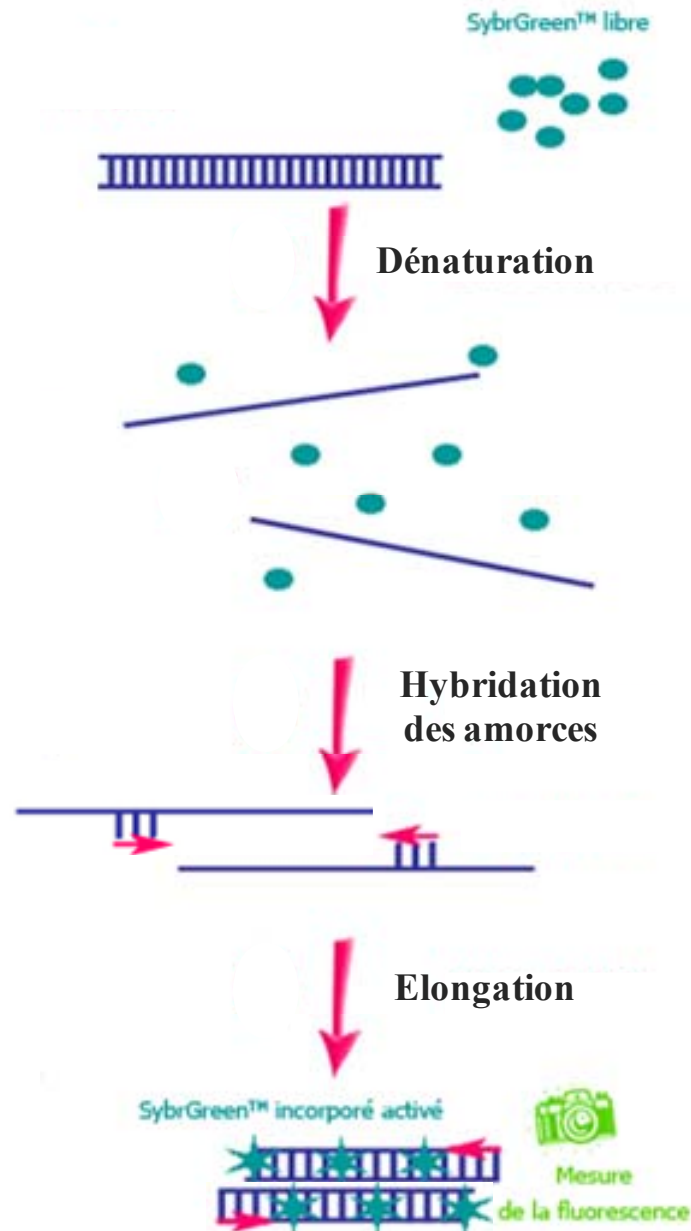
### **VI.A. Extraction et dosage des ARN totaux**

La mesure du niveau d'expression des gènes codant pour les PDE a nécessité l'extraction des ARN totaux contenus dans les CML en culture ou dans les aortes de rats SHAM et IC. Les extraits cellulaires et tissulaires ont été homogénéisés dans 1 ml d'une solution de Trizol à 4°C (Gibco BRL, USA) au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France). Cette solution d'homogénéisation contenant du phénol et de la guanidine isothiocyanate permet une lyse des membranes cellulaires tout en préservant les acides nucléiques intacts. L'homogénat obtenu a été traité avec 200 µl de chloroforme, puis centrifugé à 4°C à 10000 g pendant 15 minutes de manière à séparer les ARN, alors contenus dans une phase aqueuse, des protéines présentes dans une phase organique. La phase aqueuse, qui a été prélevée soigneusement, est traitée avec 0,5 ml d'alcool isopropylique durant une

nuit à -20°C permettant la précipitation des ARN, puis une centrifugation à 4°C à 12 000 g pendant 15 minutes a été effectuée pour obtenir un culot d'ARN. Celui-ci a ensuite été débarrassé de toute trace d'alcool isopropylique par élimination du surnageant et lavage à l'éthanol 75% avant d'être séché et remis en solution dans 15 µl d'eau sans ARNases et ADNases puis conservé à -80°C. La concentration d'ARN totaux des solutions obtenues a été déterminée en mesurant l'absorbance de celles-ci à 260 nm (une unité de DO correspond à une concentration de 40 µg/ml d'ARN). Une mesure additionnelle de l'absorbance de ces solutions à 280 nm a également permis de déterminer la pureté de leur contenu en ARN. Le rapport DO260/DO280 est en effet un bon indicateur de la pureté des échantillons puisque toute valeur inférieure à 1,5 ou supérieure à 2 indique, respectivement, une contamination par les protéines ou par les acides nucléiques d'origine génomique.

### **VI.B. PCR quantitative en temps réel**

La technique de PCR quantitative en temps réel consiste à suivre la réplication d'un ADNc ciblé au cours de l'ensemble des cycles d'amplification de la réaction de PCR. Elle s'appuie sur la démarche d'une PCR classique qui consiste en l'alternance des phases de dénaturation de l'ADN double brin, d'hybridation des amorces d'oligonucléotides de synthèse (construite pour amplifier les ADNc cibles) et d'élongation. La PCR quantitative en temps réel est une méthode fiable et reproductible qui permet de mesurer, à chaque cycle, l'accumulation des produits de PCR grâce à la présence, dans le milieu réactionnel, d'un intercalant, le SYBR Green, qui émet une fluorescence lorsqu'il est incorporé entre les bases de l'ADN double brin au cours de la phase d'élongation (**Figure 30**). La mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle est alors utilisée pour quantifier l'ADNc cible dans l'échantillon et par conséquent déterminer le niveau d'expression du gène dans le modèle considéré.



**Figure 30 : Quantification des produits de PCR par mesure de fluorescence du SYBR Green.**

Le SYBR Green est ajouté dans le milieu réactionnel et s'intercale dans l'ADN double brin produit lors de la phase d'élongation de la réaction de PCR. Le SYBR green intercalé émet alors une fluorescence proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (amplicons) qui peut être mesurée.

### **VI.B.1. Transcription inverse (RT)**

La technique de PCR quantitative nécessite une étape préliminaire de transcription inverse qui consiste en la synthèse d'ADNc simple brin à partir des ARN contenus dans les différents échantillons. Cette étape a été réalisée au moyen du kit iScript™ cDNA synthesis (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Un volume de 4 µl de tampon 5X iScript Reaction Mix a été rajouté à 15 µl d'eau RNase free contenant 1 µg d'ARN. Finalement, 1 µl de «iScript reverse transcriptase» a été déposé dans cet échantillon afin de catalyser la réaction de RT qui s'effectue en trois étapes :

- 5 minutes à 25°C pour permettre aux amorces de s'aligner sur les ARN
- 30 minutes à 42°C : étape de transcription de l'ARN en ADNc
- 5 minutes à 85°C pour permettre à l'enzyme de terminer la transcription

Les ADNc sont ensuite placés dans la glace et conservés à -80°C.

### **VI.B.2. Choix des amorces PCR**

Le succès d'une quantification d'ADNc par la méthode de PCR quantitative réside en grande partie dans la construction d'amorces spécifiques de la séquence à amplifier. Les amorces utilisées au cours de cette étude ont été désignées au moyen du logiciel Primer 3 et leur spécificité a été vérifiée par le logiciel BLAST. Les amorces « sens » et « anti-sens » ont été choisies dans deux exons différents de manière à détecter une contamination par l'ADN génomique. Les séquences des amorces oligonucléotidiques, spécifiques des gènes cibles des isoformes de PDE ainsi que de gènes de références, utilisées dans cette étude sont rapportées dans la **Table 5**.

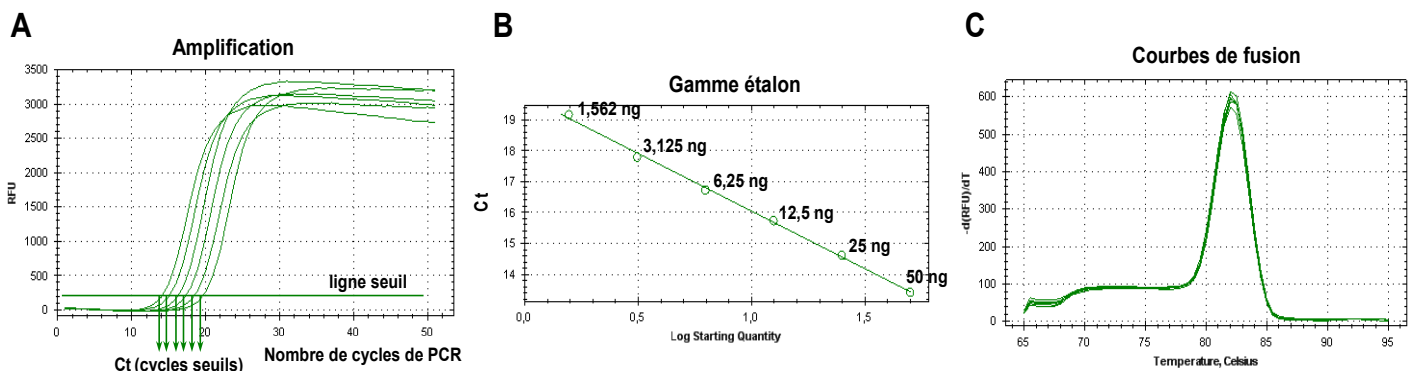
Gènes	N° d'accension GeneBank	Amorces sens 5'→3' antisens 5'→3'	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation (°C)
<b>Isoformes de PDE-AMPc</b>				
PDE1A	NM_030871	GAAGTTTCGCAGCATTGTCC GCAGGATATGTCAAACCAACC	96	60
PDE1B	NM_022710	TGCAGTCCACAACCTGTCTCA CCCGGTTCAAAGAGAAGACA	65	60
PDE1C	NM_031078	GCAGTGCAAGCTGGGATATT TTACAGCCGGTGGATAGCTC	82	60
PDE2A	NM_001143847	CTGTGCTGGCTGCACTCTAC GAGGATAGCAATGGCCTGAG	77	60
PDE3A	NM_017337	ACCTCCCTGCCCTGCATAC CCTCTCTGTGGTCCCATT	65	60
PDE3B	NM_017229	GTGGCTACAAATGCACCTCA CTGGGCGAGAAAGATACAGA	100	60
PDE4A	NM_013101	CGTCAGTGCTGCGACAGTC CCAGCGTACTCCGACACACA	190	60
PDE4B	NM_017031	GATGAGCAGATCAGGGAACC GATGGGATTTCCACATCGTT	81	60
PDE4C	XM_214325	GACCCTGTCCTTCTGTGTA AACCGTCTCAGGATCACACC	99	60
PDE4D	NM_001113328	GCCAGCCTTCGAACTGTAAG ATGGATGGTTGGTTGCACAT	98	60
PDE7A	NM_031080	TTGGAATTTTGATATCTTTCTGTTTG CTCAATCAATCCATGAAGACTAAA	97	60
PDE7B	NM_080894	GGCCATGCACGTGTTACTTGA CCAGAGGTGTGAGGAAGCTC	56	60
PDE8A	NM_198767	CGGAGGTTTTCAGGAAATGA GGCCAACCTGGCTTGAAGAT	69	60
PDE8B	NM_199268	GCCTCATTCTGTCAGACACA GGCGATTCTGTAGGCTTGG	98	60
<b>Gènes de référence</b>				
RPL32	NM_013226	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG	115	60
TBP	NM_001004198	CGGTTTGCTGCAGTCATCAT GTGCACACCATTTCCAGAA	82	60
Ywhaz	NM_013011	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA GAAGCATTGGGGATCAAGAA	127	60

**Table 5** : Caractéristiques des amorces utilisées et conditions de PCR en temps réel.  
PDE : phosphodiéstérases, RPL32 : Ribosomal protein L32, TBP : TATA box Binding protein, YWHAZ : 14-3-3 protein zeta/delta

### VI.B.3. Protocole de PCR

Les réactions de PCR ont été effectuées dans des plaques 96 puits dans un milieu réactionnel d'un volume total de 15  $\mu$ l composé de 12,5 ng d'ADNc, 0,5  $\mu$ M de chacune des amorces et du SYBR-Green master mix (Roche) contenant des dNTP (mélange des quatre désoxyribonucléotides), le SYBR Green et la Taq-polymérase. La plaque 96 puits a alors été insérée dans l'appareil PCR de détection en temps réel CFX-96 (Bio-Rad) pour être soumise à une étape d'activation enzymatique (30 secondes à 95°C) suivit de 50 cycles où chaque cycle comprend une première étape de dénaturation (5 secondes à 95°C) et une seconde d'hybridation-élongation (20 secondes à 60-62°C selon les gènes). A la fin du protocole d'amplification, la courbe de fusion du produit formé a été réalisée de manière à vérifier la spécificité de la réaction de PCR (**Figure 31**).

L'amplification par PCR se compose d'une phase où aucun signal n'est détecté, une phase linéaire et une phase plateau où la PCR atteint un maximum.



**Figure 31** : Quantification du gène de référence RPL32 en utilisant une gamme étalon.

**A**: Courbe d'amplification de la gamme étalon. Chaque courbe correspond à une quantité de matrice ADNc initiale connue (de 50 ng à 1.562 ng) et qui est associée à un Ct. Pour un facteur 2 de dilution, une variation d'un cycle est constatée entre chaque courbe. **B**: Courbe d'étalonnage  $Ct = f(\log \text{ quantité de matrice})$ . **C**: Courbes de fusion; un seul pic de fusion apparaît confirmant ainsi la spécificité de la PCR.

### VI.C. Analyse des résultats

La quantification du niveau d'expression des différents gènes a été réalisée à partir du calcul du « threshold cycle » (Ct ou cycle-seuil) qui correspond au nombre de cycles nécessaire à la détection de la fluorescence du SYBR Green (**Figure30**). Le Ct est



inversement proportionnel au logarithme de la concentration d'ADNc contenue dans l'échantillon. La concentration d'ARNm de chaque échantillon (pour une quantité de matrice de 12,5 ng d'ADNc) a été déterminée en fonction de son Ct et d'une courbe linéaire standard déterminée avec une gamme étalon (6 points de 50 ng à 1,5625 ng d'un échantillon donné pour chacun des gènes). Dans le but de s'affranchir des différences d'efficacité de la RT et des erreurs de manipulation entre les différents échantillons, ces valeurs ont été normalisées à l'expression de plusieurs gènes de référence pour lesquels les conditions expérimentales n'ont pas d'effet sur l'expression. Pour ce faire, il existe un logiciel proposant un algorithme permettant de sélectionner les gènes de référence les plus stables : GeNorm. Cet algorithme est basé sur le calcul de la moyenne géométrique des valeurs des gènes de référence apparaissant comme les plus stables et fournit pour chacun des échantillons un facteur de normalisation.

Une seconde méthode de quantification a été utilisée dans la cadre de l'étude de l'expression des PDE dans les CMLV en culture (Zhai *et al.*, 2012). Cette méthode tient compte de l'expression du gène cible et de celui du gène de référence pour une seule condition expérimentale. Tout d'abord, les Ct sont mesurés pour le gène d'intérêt ainsi que pour les gènes de référence afin de calculer ensuite le delta Ct :  $\Delta Ct = Ct \text{ cible} - Ct \text{ référence}$ . Enfin, le rapport d'expression normalisé est déterminé selon la formule :  $(1+E)^{-\Delta Ct}$ , E correspondant à l'efficacité de la PCR (déterminée par la gamme étalon). Les produits de PCR ont également été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 3% et visualisés avec le GelRed<sup>®</sup> (Biotium, Hayward, USA) sous UV.

# RESULTATS

# **Partie I: Rôle des PDEs dans la compartimentation intracellulaire de l'AMPC dans les CML vasculaires**

## **I. Introduction**

Dans le système vasculaire, l'AMPC est un second messager très important qui régule de nombreuses fonctions physiologiques. Ainsi il inhibe la contraction, la prolifération et la migration des CML (McDaniel *et al.*, 1994; Koyama *et al.*, 2001). Les niveaux intracellulaires d'AMPC sont déterminés par la balance entre sa production par les AC et sa dégradation par des enzymes spécifiques, les PDE. Il est généralement admis que dans les CML vasculaires, trois familles de PDE dégradent l'AMPC : la PDE1 activée par le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline et hydrolysant l'AMPC et le GMPc, la PDE3 inhibée par le GMPc et hydrolysant préférentiellement l'AMPC et enfin la PDE4 qui est spécifique de l'AMPC. Les profils d'expression et d'activité de ces PDE varient en fonction de l'espèce, du lit vasculaire et du phénotype cellulaire (Maurice *et al.*, 2003). Toutefois, l'expression et l'activité de familles de PDE-AMPC identifiées plus récemment (PDE7 à PDE11) ont été peu étudiées dans les CML. Une étude seulement a comparé l'expression de l'ARNm de PDE1 à PDE10 dans des CML vasculaires pulmonaires et systémiques de rat. Elle montre que l'ARNm de PDE7 est exprimée dans toutes les cellules étudiées, mais que l'ARNm de PDE10 n'est pas détecté, alors que l'expression des ARNm de PDE8 et PDE9 varie en fonction du lit vasculaire (Phillips *et al.*, 2005).

Une telle multiplicité des isoformes de la PDE peut sembler fonctionnellement redondante. Cependant, il est maintenant admis que l'AMPC n'est pas uniformément réparti dans les cellules de sorte que son action peut être limitée à certains domaines intracellulaires, et que les différents composants de la voie de signalisation, y compris les PDE peuvent contribuer à ce phénomène. Ce concept a été largement examiné dans les myocytes cardiaques. Ainsi, différentes isoformes cardiaques de PDE sont localisées dans des microdomaines intracellulaires distincts et contribuent à la compartimentation intracellulaire des signaux AMPC en limitant leur diffusion à toute la cellule, générant des réponses cardiaques spécifiques au niveau de structures intracellulaires spécialisées (Fischmeister *et*

*al.*, 2006; Xiang, 2011; Mika *et al.*, 2012). En revanche, ce concept a été peu étudié dans les CML. Des études de réactivité vasculaire ont rapporté une absence de corrélation entre la concentration d'AMPC dans les tissus et les réponses fonctionnelles au cours de l'inhibition sélective d'isoformes de PDE suggérant la présence de différents pools d'AMPC intracellulaires dans les CML vasculaires contrôlés par des isoformes de PDE différentes. Cependant, ces données obtenues dans un tissu intégré n'ont jamais été confirmés au niveau cellulaire.

Ainsi, l'objectif principal de cette étude est d'examiner le rôle des différentes isoformes de PDE dans la compartimentation des signaux AMPC intracellulaires des CML d'aorte de rat grâce à la technique de FRET en utilisant une sonde basée sur la protéine Epac qui permet un suivi spatio-temporel des concentrations d'AMPC dans les cellules vivantes intactes (Nikolaev *et al.*, 2004; Nikolaev & Lohse, 2006). Au cours de la culture cellulaire, les CML subissent un changement phénotypique en passant d'un phénotype contractile à un phénotype prolifératif, mimant l'état d'une cellule isolée à partir d'une artère lésée (Thyberg *et al.*, 1990). On sait que ce changement phénotypique est associé à des modifications de l'activité des PDE, qui dépendent de l'espèce et peuvent varier selon les conditions de culture (Rybalkin *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; Dunkerley *et al.*, 2002). Ainsi, le premier objectif de cette étude était de déterminer le profil complet d'expression (par RT-PCR) et d'activité des PDE-AMPC (par dosage biochimique de l'activité PDE couplé à une approche pharmacologique à l'aide d'inhibiteurs sélectifs des familles de PDE) de nos CML en culture. Le second objectif de cette étude était de préciser le rôle des différentes familles de PDE-AMPC identifiées dans la modulation de la dynamique spatio-temporelle des signaux AMPC dans les CML, en utilisant des sondes FRET adressées au compartiment cytosolique ou à la membrane plasmique. L'effet des inhibiteurs de PDE a été évalué sur les niveaux d'AMPC basal et stimulé par un agoniste  $\beta$ -AR, l'isoprénaline. Enfin, la contribution des sous-types de récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR dans cette réponse a été examinée à l'aide d'antagonistes sélectifs de ces récepteurs.

## **II. Résultats**

### **II.A. Article “ $\beta$ -adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells”.**

Kui Zhai\*, **Fabien Hubert**\*, Valérie Nicolas, Guangju Ji, Rodolphe Fischmeister, Véronique Leblais.

\* These authors equally contributed to this study.

PLoS One. 2012;7(10):e47826. doi: 10.1371/journal.pone.0047826. Epub 2012 Oct 18.

# $\beta$ -Adrenergic cAMP Signals Are Predominantly Regulated by Phosphodiesterase Type 4 in Cultured Adult Rat Aortic Smooth Muscle Cells

Kui Zhai<sup>1,2,3</sup>, Fabien Hubert<sup>1,2</sup>, Valérie Nicolas<sup>2,4</sup>, Guangju Ji<sup>3\*</sup>, Rodolphe Fischmeister<sup>1,2</sup>, Véronique Leblais<sup>1,2\*</sup>

**1** Inserm UMR-S 769, LabEx LERMIT, Châtenay-Malabry, France, **2** Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France, **3** National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, **4** IPSIT IFR141, Plate-forme Imagerie Cellulaire, Châtenay-Malabry, France

## Abstract

**Background:** We investigated the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in the spatiotemporal control of intracellular cAMP concentrations in rat aortic smooth muscle cells (RASMCs).

**Methodology/Principal Findings:** The rank order of PDE families contributing to global cAMP-PDE activity was PDE4 > PDE3 = PDE1. PDE7 mRNA expression but not activity was confirmed. The Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-based cAMP sensor, Epac1-camps, was used to monitor the time course of cytosolic cAMP changes. A pulse application of the  $\beta$ -adrenoceptor ( $\beta$ -AR) agonist isoproterenol (Iso) induced a transient FRET signal. Both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR antagonists decreased the signal amplitude without affecting its kinetics. The non-selective PDE inhibitor (IBMX) dramatically increased the amplitude and delayed the recovery phase of Iso response, in agreement with a role of PDEs in degrading cAMP produced by Iso. Whereas PDE1, PDE3 and PDE7 blockades [with MIMX, cilostamide (Cil) and BRL 50481 (BRL), respectively] had no or minor effect on Iso response, PDE4 inhibition [with Ro-20-1724 (Ro)] strongly increased its amplitude and delayed its recovery. When Ro was applied concomitantly with MIMX or Cil (but not with BRL), the Iso response was drastically further prolonged. PDE4 inhibition similarly prolonged both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR-mediated responses. When a membrane-targeted FRET sensor was used, PDE3 and PDE4 acted in a synergistic manner to hydrolyze the submembrane cAMP produced either at baseline or after  $\beta$ -AR stimulation.

**Conclusion/Significance:** Our study underlines the importance of cAMP-PDEs in the dynamic control of intracellular cAMP signals in RASMCs, and demonstrates the prominent role of PDE4 in limiting  $\beta$ -AR responses. PDE4 inhibition unmasks an effect of PDE1 and PDE3 on cytosolic cAMP hydrolysis, and acts synergistically with PDE3 inhibition at the submembrane compartment. This suggests that mixed PDE4/PDE1 or PDE4/PDE3 inhibitors would be attractive to potentiate cAMP-related functions in vascular cells.

**Citation:** Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, et al. (2012)  $\beta$ -Adrenergic cAMP Signals Are Predominantly Regulated by Phosphodiesterase Type 4 in Cultured Adult Rat Aortic Smooth Muscle Cells. PLoS ONE 7(10): e47826. doi:10.1371/journal.pone.0047826

**Editor:** Alexander Pfeifer, University of Bonn, Germany

**Received:** June 8, 2012; **Accepted:** September 17, 2012; **Published:** October 18, 2012

**Copyright:** © 2012 Zhai et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from "University Paris-Sud" (Bonus Attractivité Paris-Sud 2009-2012; [http://www.u-psud.fr/fr/la\\_recherche/les\\_appels\\_a\\_projet.html](http://www.u-psud.fr/fr/la_recherche/les_appels_a_projet.html)), "Région Ile de France" (SETCI; <http://www.iledefrance.fr/appels-a-projets/recherche-enseignement-sup/clos/cotutelle-internationale/>) and "National Basic Research Program of China" (2011CB8091004 and 2009CB918701; <http://www.973.gov.cn/English/Index.aspx>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: veronique.leblais@u-psud.fr (VL); gj28@ibp.ac.cn (GJ)

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

In the vascular system, cAMP is a key physiological second messenger, which inhibits contraction, proliferation and migration of the smooth muscle cells (SMCs) [1,2]. Intracellular concentration of cAMP is determined by the balance of its production by adenylyl cyclase and its degradation by specific enzymes, the 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). PDEs are classified in 11 families based on structural similarity and enzymatic properties, including substrate specificity (cAMP *versus* cGMP), kinetic properties and regulation [3]. Within these PDE families, multiple isoforms are expressed, either as products of different genes or multiple transcriptional products of one gene. It is usually

admitted that vascular SMCs express three dominant cAMP-PDE families (PDE1, PDE3 and PDE4), with a pattern of activity depending on the species, the vascular bed and the phenotype of the cell [4]. However, the expression/activity of more recently identified cAMP-PDEs (PDE7 to PDE11) has been poorly investigated. By comparing the mRNA expression of PDE1 to PDE10 in rat pulmonary and systemic vascular SMCs, Phillips *et al.* showed that PDE7 mRNA was expressed in all studied cells but PDE10 mRNA was never detected, whereas PDE8 and PDE9 mRNAs were differentially expressed depending on the vascular bed [5]. PDE11 was not examined in this study.

Such a multiplicity of PDE isoforms might seem functionally redundant. However, it is now well-accepted that cAMP is not uniformly distributed within cells so that its action may be restricted to subcellular domains of the cells, and that different signaling pathway components, including PDEs and cAMP-dependent protein kinase (PKA), may contribute to this phenomenon. This concept has been extensively developed in cardiac myocytes: the different cardiac PDE isoforms are targeted to distinct subcellular microdomains and contribute to the intracellular compartmentation of cAMP by limiting its diffusion to the entire cell, generating specific cardiac responses at discrete intracellular loci [6–8]. A similar picture of cardiac cyclic nucleotide compartmentation is also proposed for cGMP [6,9]. By contrast, this concept has been poorly investigated in SMCs. In the case of cAMP signaling, Delpy *et al.* showed that, in rat endothelium-denuded aorta, PDE3 inhibition potentiates both the increase in intracellular cAMP level and the cAMP-dependent vasorelaxation elicited by  $\beta$ -adrenergic stimulation, whereas PDE4 inhibition only potentiates the former response without modifying the latter one [10]. The lack of correlation between the cAMP concentration and the functional response during PDE inhibition suggests the presence of distinct intracellular cAMP pools in vascular SMCs controlled by different PDE isoforms. However, these data obtained in an integrated tissue were never confirmed at the cellular level. In the case of cGMP signaling, recent studies provided evidence that in isolated vascular SMCs, nitric oxide and natriuretic peptides induce distinct cGMP signals, partly due to a differential regulation by PDE5 [11,12].

Thus, the main objective of this study was to investigate the role of the different PDE families in the intracellular cAMP compartmentation of vascular SMCs. For this purpose, we took advantage of the Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-based imaging technique, using Epac-based sensors which allow a spatiotemporal monitoring of cAMP concentrations in intact living cells [13,14]. As cellular model of vascular SMCs, we used rat aorta SMCs (RASMCs) maintained in culture. During cell culture, vascular SMCs undergo a phenotypic switch from a contractile/quiescent to a proliferative/synthetic phenotype, miming the phenotype of a cell isolated from an injured vessel [15]. It is known that this phenotypic switch is associated with modifications of PDE levels and activity, which depend on the species and may vary between culture conditions [16–18]. Thus, the first aim of this study was to characterize the expression and activity pattern of cAMP-PDE isoforms in cultured RASMCs. For this purpose, we performed reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments and a biochemical PDE activity assay coupled to a pharmacological approach by using selective PDE inhibitors. The second aim of this study was to delineate the role of PDEs in modulating the spatiotemporal dynamic of cAMP signals elicited in living RASMCs, by using FRET-based sensors targeted to either the cytosolic or the plasma membrane compartments. Isoproterenol (Iso), a  $\beta$ -adrenoceptor ( $\beta$ -AR) agonist, was used here as a physiological cAMP-elevating stimulus.

## Materials and Methods

All experiments performed conform to the European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J no. L358, December 18, 1986), the local ethics committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines, and the French decree no. 97–848 of October 19, 1987 (J Off République Française, October 20, 1987, pp 12245–12248). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were

obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (no. 92–283, June 27, 2007).

## Pharmacological agents

CGP-20712A methanesulfonate salt (CGP), ICI 118,551 hydrochloride (ICI), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and (-)-isoproterenol hydrochloride (Iso) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin, Fallavier, France). Cilostamide (Cil) and BRL 50481 (BRL) were from Tocris Bioscience (Bristol, UK), 8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthine (MIMX) and Ro-20-1724 (Ro) from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK), and BAY-60-7550 (BAY) from Cayman Chemical (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France). As all PDE inhibitors stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma), control experiments were performed in the presence of equivalent concentrations of DMSO.

## Cell isolation and culture

RASMCs were prepared as previously described with minor modifications [19]. Briefly, RASMCs were isolated from the thoracic medial layer of adult male Wistar rat (180–200 g) by an enzymatic digestion with collagenase type 2 (60 U/mL; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) and elastase (0.3 mg/mL; MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA) for 3 hours at 37°C, with continuous slow shaking. After periods of 30 minutes, the suspension was centrifuged at 1300 rpm for 3 minutes, and the cells were collected and placed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing antibiotics/antimycotic (100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B; GIBCO) and supplemented with 20% Fetal Bovine Serum "Gold" (FBS; PAA Laboratories, Les Mureaux, France). Cells obtained during the first period were discarded. Those obtained in the subsequent cycles were pooled, centrifuged, suspended in DMEM containing 20% FBS, seeded in a flask coated with collagen I (rat tail, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and maintained at 37°C in a 95% air-5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The medium was changed every 2 days with DMEM containing 10% FBS. At confluence, cells were detached with 0.05% trypsin containing 0.53 mM EDTA (GIBCO) and seeded in coated flasks (passage 1). All experiments were performed on cells cultured between passages 2 and 6. Cells were plated on collagen-coated Petri dishes for RT-PCR experiments and PDE activity assay or on collagen-coated glass coverslips for FRET experiments, at a density of 3.10<sup>3</sup> or 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> for experiments performed at 24 or 48 hours, respectively. As shown in **Figure S1**, markers characteristic of cells with a synthetic phenotype were expressed in cultured RASMCs.

## Quantitative RT-PCR

Cells, maintained in DMEM containing 10% FBS for 48 hours after plating, were washed twice with cold PBS, immediately frozen and kept at –80°C. Cells were scrapped and homogenized using a tissue homogenizer (Bertin Technologies) in ice-cold TRI reagent (Molecular Research center, Cincinnati, USA). Total RNA was extracted using standard procedure. cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g total RNA using iSCRIPT cDNA synthesized (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Negative controls were performed without the reverse transcriptase. Then, qPCR was performed using the SYBR®-Green method on a CFX96 real-time PCR detection system (Biorad). Reactions were carried out in SYBR-Green master mix with 12.5 ng cDNA and 0.5  $\mu$ M sense and anti-sense primers for subtypes of PDE 1 to 8 and housekeeping genes (TBP: Tata Box Binding Protein,

RPL32: Ribosomal protein L32 and Ywhaz: 14–3–3 protein zeta/delta) (**Table 1**). Negative controls were performed without cDNA template to check for exogenous contamination. The cycling conditions were 30 seconds at 95°C, following by 35 cycles with one step at 95°C for 5 seconds and another step at 60–62°C for 20 seconds. For each target gene, a standard curve was constructed from the analysis of serial dilution of cDNA and was used to determine efficiency (E). Threshold cycle (Ct) for target was subtracted from the geometric mean of Ct for housekeeping genes to calculate  $(1+E)^{\Delta C_t}$  according to the  $2^{\Delta C_t}$  method. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 3% agarose gel and visualized with GelRed® (Biotium, Hayward, USA) under UV light.

### Cyclic AMP-PDE activity assay

Cells, maintained in DMEM containing 10% FBS for 48 hours after plating, were washed twice with cold PBS, homogenized using a tissue homogenizer (Bertin Technologies) in ice-cold lysis buffer (containing: NaCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, glycerol 10%, NP40 0.5% and microcystin 1 μM) and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid protein assay,

according to the manufacturer's protocol (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France). The cAMP-PDE activity was measured in the supernatant according to a modification of the two-step assay procedure method described by Thompson and Appleman [20], using 20–30 μg of RASMCs proteins in a total volume of 200 μl including 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoethanol and 1 μM cAMP and supplemented with 10<sup>5</sup> cpm [<sup>3</sup>H]-cAMP, as detailed previously [21]. To evaluate PDE families-specific activities, the assay was performed in the absence or presence of either one or a combination of several selective PDE inhibitors: 10 or 50 μM MIMX for PDE1, 100 nM BAY for PDE2, 1 μM Cil for PDE3, 10 μM Ro for PDE4, 50 μM BRL for PDE7 and 1 mM IBMX as a non-selective PDE inhibitor. The residual hydrolytic activity observed in the presence of PDE inhibitors was expressed as a percentage of the total cAMP-PDE activity, corresponding to the cAMP-PDE activity in the absence of inhibitor.

### FRET imaging

Two different FRET-based cAMP sensors were used: Epacl-camps, containing the single cAMP-binding domain of Epacl fused to an enhanced yellow fluorescent protein (YFP) and an

**Table 1.** Primers pairs used in RT-PCR to quantify mRNA expression.

Target	Accession number	Primers Forward 5'→ 3'	Reverse 5'→ 3'	Product size (Bp)	Annealing temperature (°C)
PDE1A	NM_030871	GAAGTTTCGACGATTGTCC	GCAGGATATGTCAAACCAACC	96	60
PDE1B	NM_022710	TGCAGTCCACAACGTCTCA	CCCGGTTCAAAGAGAAGACA	65	62
PDE1C	NM_031078	GCAGTGC AAGCTGGGATATT	TTACAGCCGGTGGATAGCTC	82	60
PDE2A	NM_001143847	CTGTGCTGGCTGCACTCTAC	GAGGATAGCAATGCCTGAG	77	62
PDE3A	NM_017337	ACCTCCCTGCCCTGCATAC	CCTCTTGTGGTCCCATTTC	65	60
PDE3B	NM_017229	GTGGCTACAAATGCACCTCA	CTGGGCGAGAAAGATACAGA	100	60
PDE4A	NM_013101	CGTCAGTGCTGCGACAGTC	CCAGCGTACTCCGACACACA	190	60
PDE4B	NM_017031	GATGAGCAGATCAGGGAACC	GATGGGATTTCCACATCGTT	81	60
PDE4C	XM_214325	GACCCTGTCCTTCTGTTGA	AACCGTCTCAGGATCACACC	99	60
PDE4D	NM_001113328	GCCAGCCTTCGAACTGTAAG	ATGGATGGTTGGTTGCACAT	98	60
PDE7A	NM_031080	TTGGAATTTTGATATCTTTCTGTTTG	CTCAATCAATCCATGAAGACTAAA	97	60
PDE7B	NM_080894	GGCCATGCACTGTTACTTGA	CCAGAGGTGTGAGGAAGCTC	56	60
PDE8A	NM_198767	CGGAGGTTTTTCAGGAAATGA	GGCCAACTGGCTTGAAGAT	69	60
PDE8B	NM_199268	GCCTATTGTTTCAGACACA	GGCGATTCTGTAGGCTTGG	98	62
RPL32	NM_013226	GCTGCTGATGTGCAACAAA	GGGATTGGTGACTCTGATGG	115	60
TBP	NM_001004198	CGGTTTGCTGCAGTCATCAT	GTGCACACCATTTTCCAGA	82	60
Ywhaz	NM_013011	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA	GAAGCATTGGGGATCAAGAA	127	60

doi:10.1371/journal.pone.0047826.t001



enhanced cyan fluorescent protein (CFP) [13]; and the plasma membrane-targeted cAMP sensor Epac2-camps, called pm-Epac2-camps, corresponding to Epac2-camps (containing the cAMP-binding domain B of Epac2 fused to YFP and CFP) which was N-terminally-modified with the "SH4" motif of Lyn kinase [22]. FRET between CFP and YFP appears in the absence of cAMP. Upon increase in cAMP concentration, cAMP binding to its Epac domain promotes reversible conformational changes of the sensor, resulting in a decrease in FRET between CFP and YFP [13].

RASMCs were transfected with a pcDNA3 plasmid encoding Epac1-camps by using Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) diluted in Opti-MEM medium<sup>®</sup> (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 6 hours, the transfection medium was replaced with DMEM containing 10% FBS. In some experiments, the RASMCs were infected with an adenovirus encoding pm-Epac2-camps (MOI 600 pfu/cell) in DMEM containing 10% FBS. FRET experiments were performed 42 hours after transfection with Epac1-camps or 24 hours after infection with pm-Epac2-camps. We previously determined these incubation times to get an optimal subcellular localization of the sensors.

Cells were maintained in a K<sup>+</sup>-Ringer solution containing (in mM): NaCl 121.6, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, HEPES 10 (pH 7.4), at room temperature. To study changes in FRET signals in response to pharmacological agents, the cell of interest was continuously and locally perfused with K<sup>+</sup>-Ringer solutions containing or not these agents, using a microperfusion system allowing rapid applications of these solutions. Iso was applied either at steady state to perform cumulative concentration-response curves or as a pulse of 15 s (at a submaximal concentration) to evaluate the effect of pharmacological agents on the dynamics of its response. PDE inhibitors and  $\beta$ -AR antagonists were applied 3 min before the brief application of Iso and maintained throughout the experiment.

Images were captured every 5 s using the 40X oil immersion objective of an inverted microscope (Nikon TE 300) connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices) cooled charge-coupled device camera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany). CFP was excited during 150–300 ms by a Xenon lamp (100 W, Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual emission imaging of CFP and YFP was performed using an Optosplit II emission splitter (Cairn Research, Faversham, UK) equipped with a 495LP dichroic mirror and BP filters 470/30 and 530/30, respectively. Average fluorescence intensity was measured in a region of interest comprising the entire cell. For analysis, background was subtracted and YFP intensity was corrected for CFP spillover into the 535 nm channel before calculating the ratio of CFP/YFP emitted fluorescence intensities. Data were expressed as a percentage of the CFP/YFP ratio measured before application of the drug. Ratio images were obtained with ImageJ software (National Institutes of Health). Kinetic parameters of the Iso-induced FRET signal ( $t_{\max}$ : time to peak,  $t_{1/2\text{on}}$ : time to half-peak,  $t_{1/2\text{off}}$ : time from the peak to obtain half recovery) were determined using Microsoft Excel software. EC<sub>50</sub> value (concentration that produces 50% of the maximum response) was estimated in each individual concentration-response curves using the Boltzman equation fit using Origin 6 software.

## Data analysis and statistics

Data are represented as mean  $\pm$  SEM of *N* experiments in RT-PCR studies and cAMP-PDE activity assay or *n* cells in FRET imaging experiments. The different parameters were compared

using Student's *t*-test for paired or unpaired data, where appropriate. A difference was considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### Expression pattern of PDE isoforms in cultured RASMCs

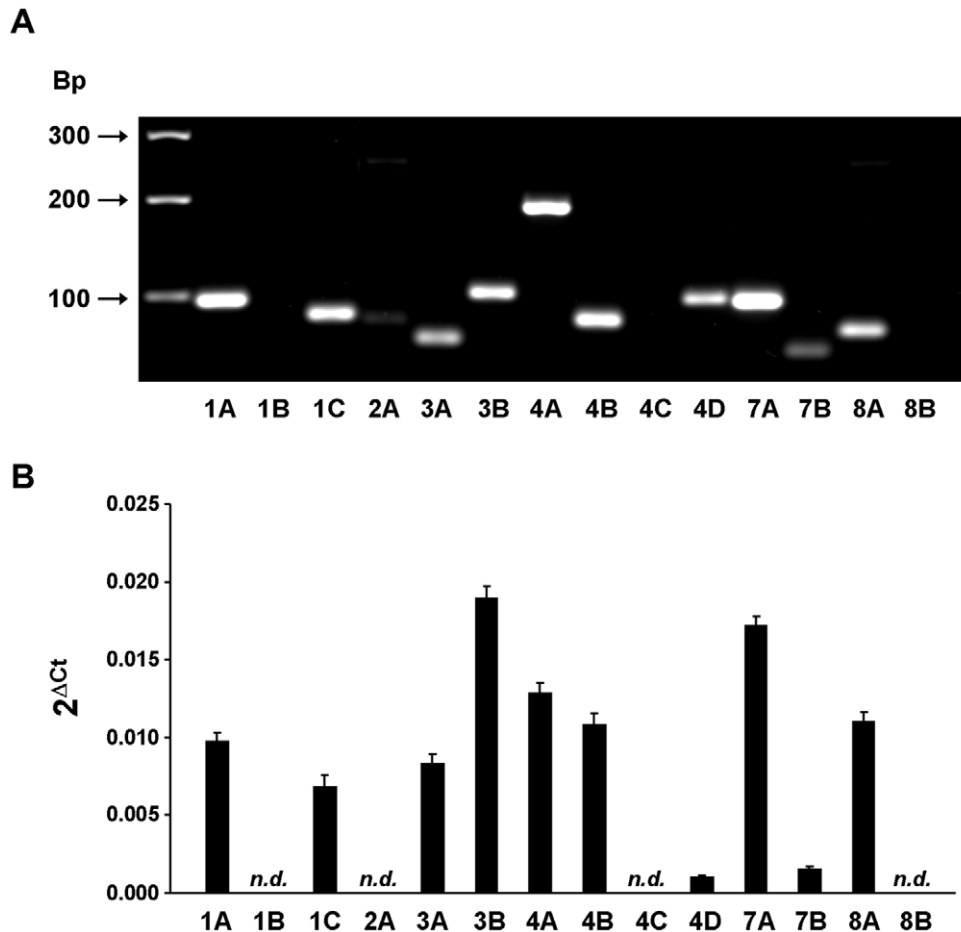
mRNA species encoding PDEs 1A, 1C, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 7A, 7B and 8A were detected in cultured RASMCs (**Figure 1**). RT-PCR products for PDE 1B, 2A, 4C and 8B isoforms were absent.

### cAMP-PDE activity in cultured RASMCs

Total cAMP-PDE activity measured in lysates from cultured RASMCs was  $37.4 \pm 7.1$  pmol/min/mg protein ( $n = 6$ ). To determine which PDE families contribute to this total hydrolyzing activity, the assay was also conducted in the presence of different PDE inhibitors (**Figure 2**). Consistent with the absence of PDE2 mRNA expression, BAY (100 nM), a selective PDE2 inhibitor [23], had no effect on cAMP-PDE activity. Cil (1  $\mu$ M, a selective PDE3 inhibitor [24]) and Ro (10  $\mu$ M, a selective PDE4 inhibitor [25]) reduced cAMP-PDE activity by 20% and 40%, respectively. As no perfect PDE1 inhibitor is commercially available, we used MIMX which blocks PDE1 activity by interfering with its catalytic site with a low micromolar affinity and exhibits a selectivity over other PDEs of 30- to 50-fold [25–27]. MIMX decreased cAMP-PDE activity by 22% and 37%, when used at 10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M, respectively. In the simultaneous presence of MIMX (10  $\mu$ M), Cil and Ro, total cAMP-PDE activity was reduced by 75%. Increasing the concentration of MIMX to 50  $\mu$ M had no further effect under this condition. The PDE7 inhibitor BRL (50  $\mu$ M) [28] lowered the total cAMP-PDE activity by 16%. However, BRL had no additive inhibitory effect on the cAMP-PDE activity measured in the presence of MIMX (10  $\mu$ M), Cil and Ro which questions its specificity on PDE7. Finally, the broad-spectrum PDE inhibitor IBMX (1 mM) [25] inhibited the total cAMP-PDE activity by 96%. In summary, the rank order of PDE families contributing to global cAMP-PDE activity in cultured RASMCs was PDE4 > PDE3 = PDE1. PDE2 activity is absent and PDE7 activity uncertain.

### FRET measurements of cytosolic cAMP signals in cultured RASMCs

We then evaluated the functional contribution of the different PDE isoforms in controlling intracellular cAMP concentration ( $[cAMP]_i$ ) in RASMCs.  $[cAMP]_i$  changes in response to Iso were monitored in real-time by fluorescence imaging using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps. As illustrated on the images in **Figure 3A** and **Figure 4A**, the CFP/YFP ratio fluorescence was distributed throughout the cytosol in cells expressing Epac1-camps, indicating a cytosolic localization of the probe. Cumulative increasing concentrations of Iso (0.1 nM to 1  $\mu$ M) induced a significant increase in CFP/YFP ratio in a concentration-dependent manner, with a maximum response of  $27.9 \pm 2.0\%$  and an EC<sub>50</sub> value of  $18.1 \pm 2.2$  nM ( $n = 7$ ) (**Figure 3B**). These alterations of FRET signal reflect the production of cytosolic cAMP upon  $\beta$ -AR stimulation. To analyze the dynamics of this cAMP signal, Iso was then applied transiently at the concentration of 0.1  $\mu$ M. As shown in **Figure 4**, a 15 s-pulse of Iso induced a rapid increase in the CFP/YFP ratio to reach a maximum of  $14.1 \pm 0.7\%$  at  $48.7 \pm 1.4$  s ( $n = 124$ ) before returning to baseline with a  $t_{1/2\text{off}}$  of  $51.5 \pm 3.0$  s. Thus, a short  $\beta$ -AR stimulation induced a transient increase in cytosolic  $[cAMP]_i$ , suggesting that cAMP is rapidly metabolized in RASMCs, most likely through cAMP hydrolysis by PDEs.



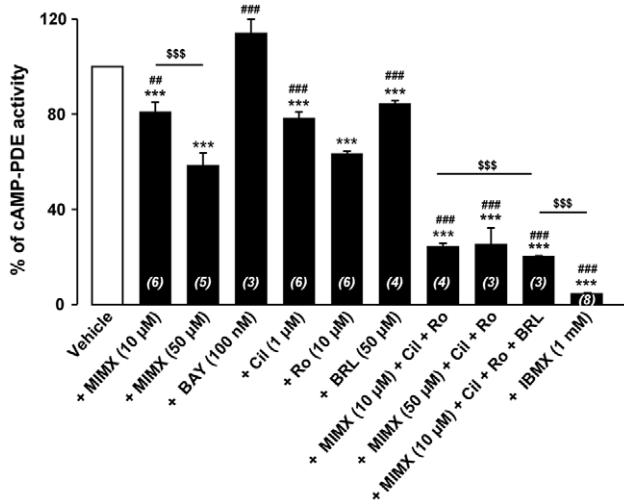
**Figure 1. Expression analysis of mRNA encoding cAMP-PDE isoforms in RASMCs.** RT-qPCR reactions were carried out on mRNAs isolated from RASMCs. The expression of PDE1A (1A), PDE1B (1B), PDE1C (1C), PDE2A (2A), PDE3A (3A), PDE3B (3B), PDE4A (4A), PDE4B (4B), PDE4C (4C), PDE4D (4D), PDE7A (7A), PDE7B (7B), PDE8A (8A) and PDE8B (8B) was analyzed. **A:** PCR products were resolved by electrophoresis on a 3% agarose gel. Shown is the picture of a representative gel stained with GelRed<sup>®</sup>. Position of molecular weight markers is indicated in base pairs (Bp). **B:** mRNA expression was expressed using the 2<sup>ΔAct</sup> method as described in Materials and methods. Data are mean ± SEM of 9 experiments. n.d. not detectable. doi:10.1371/journal.pone.0047826.g001

### Role of PDE families in the control of cytosolic cAMP concentrations in cultured RASMCs

To evaluate the functional contribution of the different PDE families in regulating the cAMP response to  $\beta$ -AR stimulation, RASMCs were incubated in the presence of PDE inhibitors during 3 min before Iso pulse. Application of PDE inhibitors alone, with the exception of BAY and BRL, induced a slight but significant increase in basal FRET ratio, which was maximal with 50  $\mu$ M MIMX (the PDE1 inhibitor) and 100  $\mu$ M IBMX (the non-selective PDE inhibitor) (Table 2). 50  $\mu$ M MIMX (Figure 5A), 100 nM BAY (the PDE2 inhibitor, Figure 5B) and 1  $\mu$ M Cil (the PDE3 inhibitor, Figure 5C) had no effect on the dynamics of the Iso-induced FRET signal. 50  $\mu$ M BRL (the PDE7 inhibitor, Figure 5E) had only minor effects on its kinetics (with a slight increase in the time to peak of 17%,  $n=9$ ,  $P<0.05$ ), whereas 10  $\mu$ M Ro (the PDE4 inhibitor, Figure 5D) markedly increased its amplitude (by 52%,  $n=13$ ,  $P<0.01$ ) and significantly delayed its onset and recovery phases. IBMX (Figure 5I) also increased the amplitude of Iso response (by 76%,  $n=9$ ,  $P<0.05$ ) and dramatically prolonged its duration. The IBMX effect on the decay phase was significantly higher than that induced by Ro ( $t_{1/2off}$  increased by 99% and 770% with Ro and IBMX, respectively,  $P<0.001$ ; Figure 6B). This indicates that, in RASMCs, PDE4 is

an essential regulator of  $\beta$ -AR-elicited cytosolic cAMP signals, but that other PDEs might also contribute to this regulation.

We then evaluated the effect of the simultaneous inhibition of PDE4 and one of the 3 other PDEs detected in these cells (as shown by PDE activity assay: PDE1, PDE3 and also PDE7) on the Iso response. Ro+MIMX significantly increased the amplitude of Iso response (by 109%,  $n=12$ ) and delayed its onset and recovery phases (Figure 5F). Only the effect of Ro+MIMX on the decay phase was significantly higher than that induced by Ro alone [ $t_{1/2off}$  increased by 99% ( $n=13$ ) and 280% ( $n=12$ ) with Ro and Ro+MIMX, respectively,  $P<0.001$ ; Figure 6]. However, this effect was still lower than that induced by IBMX. It should be noticed that a similar potentiating effect of MIMX in the presence of Ro was also observed when MIMX was used at a smaller concentration, 10  $\mu$ M (Figure S2). Ro+Cil significantly increased the amplitude of Iso response (by 80%,  $n=9$ ) and drastically prolonged its duration (Figure 5G), with an effect on the decay phase which was significantly higher than that induced by Ro alone [ $t_{1/2off}$  increased by 99% ( $n=13$ ) and 377% ( $n=9$ ) with Ro and Ro+Cil, respectively,  $P<0.001$ ; Figure 6B] and by Ro+MIMX [ $t_{1/2off}$  increased by 280% ( $n=12$ ) and 377% ( $n=9$ ) with Ro+MIMX and Ro+Cil, respectively,  $P<0.001$ ; Figure 6B]. In the presence of Ro+BRL (Figure 5H), the Iso



**Figure 2. cAMP-PDE activity in RASMCs.** cAMP-PDE activity was determined in lysates of cultured RASMCs in the absence (*vehicle*) or presence of selective PDE inhibitors (PDE1: 10 or 50 µM MIMX; PDE2: 100 nM BAY; PDE3: 1 µM Cil; PDE4: 10 µM Ro; PDE7: 50 µM BRL) or a non-selective PDE inhibitor (1 mM IBMX) or a combination of several inhibitors as indicated. Results are expressed in % of cAMP-PDE activity measured in the absence of inhibitors (*vehicle*). Data are mean ± SEM of 3–6 independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$  versus vehicle; ##  $P < 0.01$  and ###  $P < 0.001$  versus Ro; \$\$\$  $P < 0.001$  as indicated. doi:10.1371/journal.pone.0047826.g002

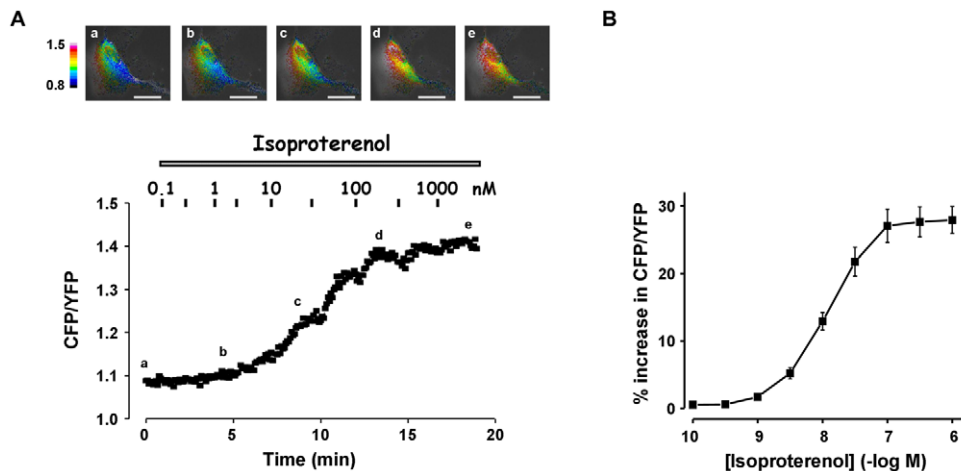
response was significantly increased in amplitude (by 90%,  $n = 9$ ) and duration ( $t_{1/2\text{off}}$  increased by 160%), but to a similar extent to that obtained in the presence of Ro alone (Figure 6). Altogether, these results suggest that PDE4 inhibition unmasks the effect of PDE3 and PDE1 on cytosolic cAMP generated by  $\beta$ -AR stimulation.

### Role of $\beta_1$ - and $\beta_2$ -AR subtypes in cytosolic cAMP production in cultured RASMCs

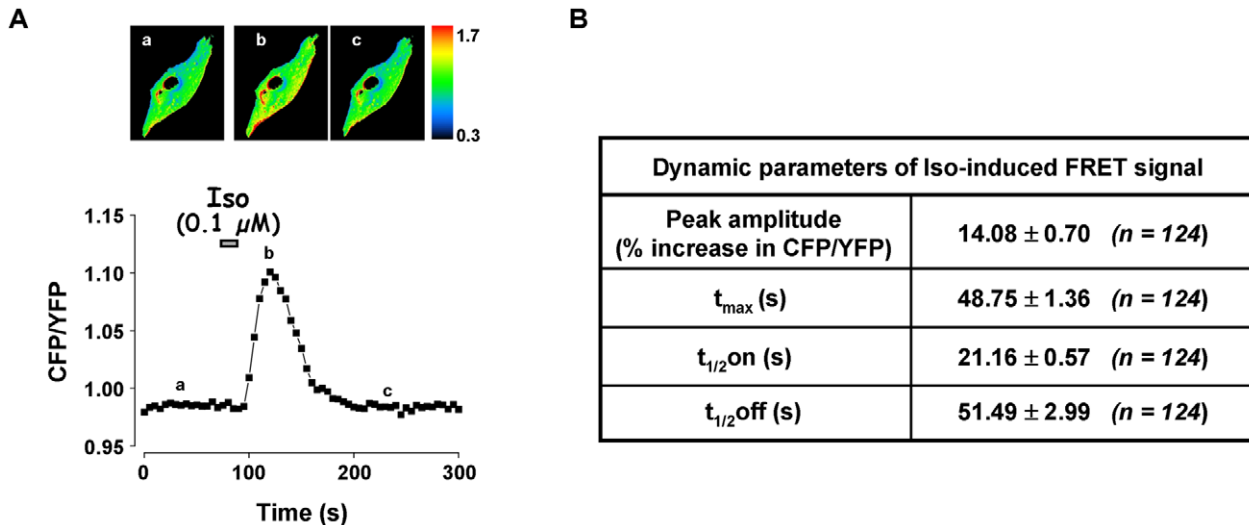
To evaluate the contribution of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR subtypes in cytosolic cAMP production elicited by Iso, RASMCs were

incubated in the presence of  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR antagonists during 3 min before the Iso pulse. The selective  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A was used at a concentration of 100 nM, which is about 100-fold higher than its binding affinity [29,30]. At this concentration, CGP-20712A did not modify the FRET signal induced by a selective  $\beta_2$ -AR agonist (Figure S3), confirming its selectivity towards  $\beta_1$ -ARs in our experimental conditions. By contrast, CGP-20712A significantly decreased the amplitude of Iso response by 39% without affecting its kinetics (Figure 7A), indicating that  $\beta_1$ -ARs are involved in this response. To antagonize  $\beta_2$ -ARs, we used ICI 118,551, which exhibits a binding affinity for  $\beta_2$ -ARs of around 1 nM and a selectivity ratio for  $\beta_2$ -ARs over  $\beta_1$ -ARs of about 70 [30]. We evaluated the effect of different concentrations of ICI 118,551 (1, 5, 10 and 100 nM) on FRET signal induced by Iso in RASMCs. ICI 118,551 significantly reduced the amplitude of Iso response in a concentration-dependent manner [by 14% ( $n = 6$ ), 48% ( $n = 7$ ), 55% ( $n = 5$ ) and 90% ( $n = 9$ ) at 1, 5, 10 and 100 nM, respectively], without affecting its kinetics (Figure S4 and Figure 7B for ICI 118,551 at 5 nM), indicating that  $\beta_2$ -ARs are involved in this response. In the following experiments, we decided to use ICI 118,551 at 5 nM, a concentration which should preserve its selectivity towards  $\beta_2$ -ARs according to its binding affinities.

As PDE4 is the main PDE family controlling Iso-induced cytosolic cAMP signals, we then evaluated the role of PDE4 in hydrolyzing cAMP produced by either  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -AR stimulation. The  $\beta_1$ -AR response was elicited through an Iso pulse in the presence of the  $\beta_2$ -AR antagonist ICI 118,551, whereas the  $\beta_2$ -AR response was elicited through an Iso pulse in the presence of the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A. The PDE4 inhibitor (10 µM Ro) slightly but not significantly increased the amplitude of the Iso+CGP-20712A response, and significantly prolonged its duration with a strong effect on its recovery phase ( $t_{1/2\text{off}}$  increased by 155%,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ ; Figure 7C). Similarly, the Iso+ICI 118,551 response (Figure 7D) was markedly increased by Ro in amplitude (by 120%,  $n = 7-8$ ,  $P < 0.01$ ) and duration ( $t_{1/2\text{off}}$  increased by 178%,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ ). This indicates that PDE4 hydrolyses cytosolic cAMP pool generated by both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR stimulations.



**Figure 3. Effect of steady-state activation of  $\beta$ -AR on cytosolic [cAMP] in RASMCs.** Cytosolic cAMP measurements were conducted using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps in cultured RASMCs cells incubated with cumulative increasing concentrations of isoproterenol (0.1 nM to 1 µM). **A**: Representative cAMP signals monitored in one cell. Pseudocolor images reflecting the CFP/YFP ratio were recorded at the times indicated by the letters on the graph. **B**: Concentration-response curve of isoproterenol effect as shown in A. Data are mean ± SEM of 7 independent cells. doi:10.1371/journal.pone.0047826.g003



**Figure 4. Effect of transient activation of  $\beta$ -AR on cytosolic [cAMP] in RASMCs.** Cytosolic cAMP measurements were conducted in cultured RASMCs cells using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps in response to a short application of isoproterenol (Iso, 0.1  $\mu$ M, 15 s). **A:** Representative cAMP signals monitored in one cell. Pseudocolor images reflecting the CFP/YFP ratio were recorded at the times indicated by the letters on the graph. **B:** Dynamic parameters (peak amplitude, t<sub>max</sub>, t<sub>1/2 on</sub>, and t<sub>1/2 off</sub>) of isoproterenol-induced FRET signal as shown in A. Data are mean  $\pm$  SEM of 124 independent cells. doi:10.1371/journal.pone.0047826.g004

### Role of PDE families in the control of submembrane cAMP concentrations in cultured RASMCs

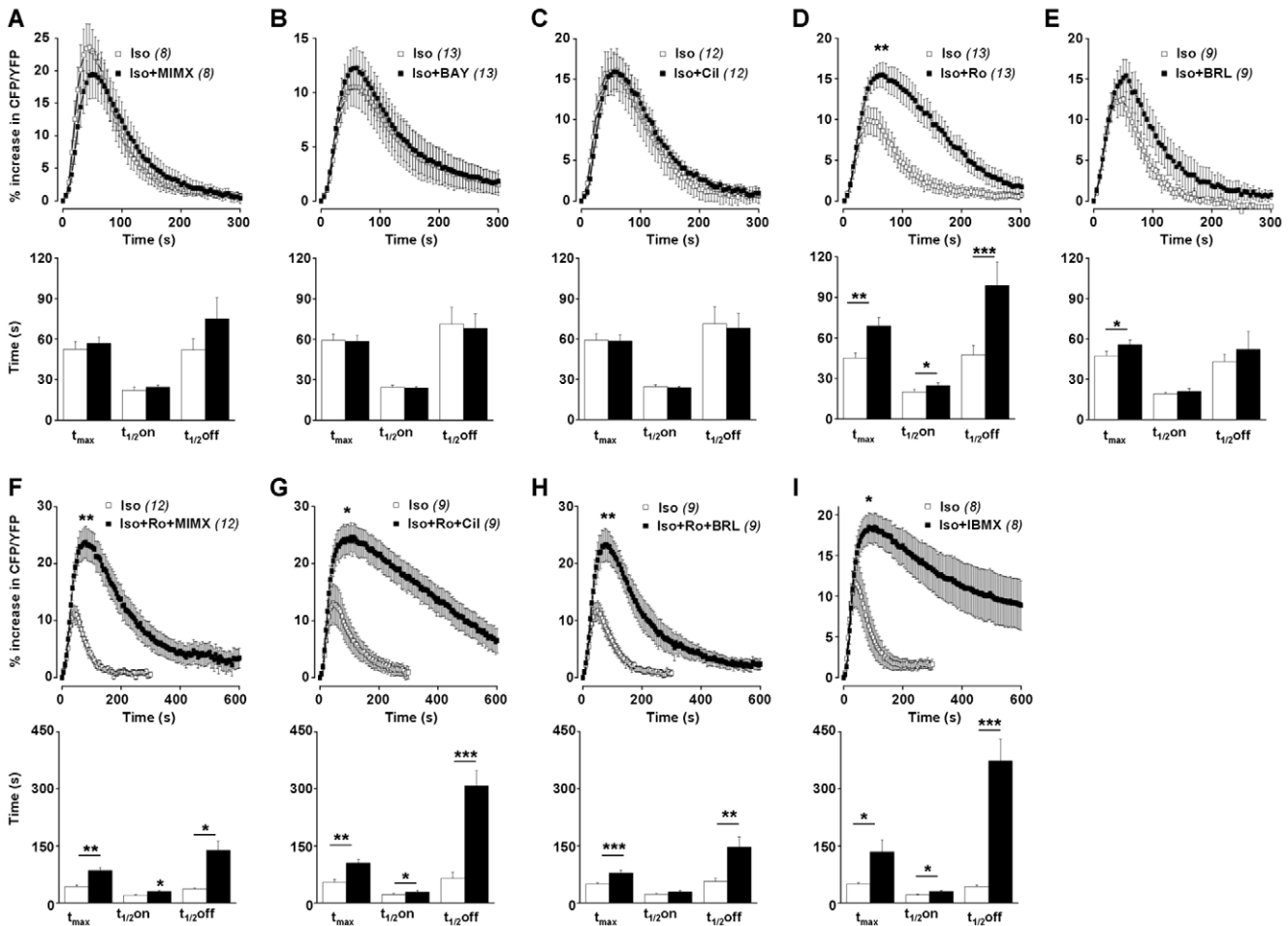
To directly monitor cAMP dynamics in the submembrane compartment, we used the modified FRET-based cAMP sensor, pm-Epac2-camps, which was effectively targeted to the plasma membrane (Figure 8A). As shown in Figure 8B, pm-Epac2-camps generated a FRET response upon transient stimulation with Iso at the concentration of 10 nM. The FRET signal reached a maximum of  $11.9 \pm 1.3\%$  at  $99.8 \pm 4.4$  s ( $n = 23$  cells) before returning to baseline with a t<sub>1/2 off</sub> of  $78.4 \pm 8.8$  s (Figure 8C). We then investigated the role of PDE3 and PDE4 families in regulating submembrane cAMP produced by  $\beta$ -AR stimulation. Application of 1  $\mu$ M Cil or 10  $\mu$ M Ro slightly increased the basal FRET ratio (Table 3). Both PDE3 and PDE4 inhibitors significantly affected the Iso-induced FRET signal by increasing its amplitude (by 51% and 38%, respectively) and delaying its recovery phase (Figure 9A and B). When Cil and Ro were applied concomitantly, the basal FRET ratio was markedly enhanced (Table 3) and the Iso response was significantly increased in amplitude by 59% ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ) and dramatically prolonged in duration (t<sub>1/2 off</sub> increased by 548%, compared to 150% and 85% with Cil and Ro alone, respectively,  $P < 0.001$ ; Figure 9C). It should be noted that the effect of PDE inhibitors on the amplitude of Iso response was underestimated here given their effect on the basal FRET ratio. Altogether, these results suggest that, unlike in the cytosol, both PDE3 and PDE4 control submembrane cAMP concentration in RASMCs.

### Discussion

In this study, we evaluated the role of individual PDEs in regulating the spatiotemporal dynamics of cAMP signals in cultured RASMCs. The main findings are as follows: (1) mRNAs encoding several cAMP-PDE isoforms (including PDE7A, 7B, 8A) are present in cultured RASMCs; (2) the rank order of PDE activity in RASMCs is PDE4 > PDE1 = PDE3; (3) Iso strongly increases cytosolic cAMP concentration, through both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR activation; (4) PDE4 is the main PDE controlling the cytosolic

cAMP signal elicited by  $\beta$ -AR stimulation. However, PDE4 inhibition unmasks an effect of PDE3 and PDE1 in hydrolyzing cytosolic cAMP; (5) both PDE3 and PDE4 contribute to regulate basal and  $\beta$ -AR-stimulated cAMP levels in the submembrane compartment.

Cell culture is known to induce a phenotypic switch of vascular smooth cells associated with modifications of PDE expression [16–18]. In this study, we performed a large PDE activity assay to characterize our cultured RASMC model in terms of biochemical cAMP-PDE activity. By using selective pharmacological inhibitors of PDE3 and PDE4 (cilostamide and Ro-20-1724, respectively) [24,25], we observed that the most important cAMP-PDE was PDE4, accounting for around 40% of total cAMP hydrolyzing activity, whereas PDE3 accounted only for 20%. In this regard, mRNAs encoding 2 PDE3 isoforms (3A and 3B) and 3 PDE4 isoforms (4A, 4B and 4D) were detected in these cells. This is in accordance with Dunkerley *et al* who described a reduced PDE3/PDE4 activity ratio in cultured rat aorta cells compared to fresh cells; this modification appeared from the passage 1 of culture and was correlated with a reduced PDE3 activity [16]. Other classical cAMP-PDEs include PDE1 and PDE2. Here, we show that mRNAs encoding PDE1A and 1C but not 1B were expressed and that PDE1 accounted for at least 20% of total PDE activity according to the inhibitory effect of 10  $\mu$ M MIMX. PDE1 protein expression was previously described in cultured aorta SMCs isolated from several species including rat [17], but PDE1 hydrolyzing cAMP activity was essentially shown in cells from other species [17,31,32]. Increasing MIMX concentration to 50  $\mu$ M further increased the inhibitory effect of MIMX when used alone, but had no additive effect in the presence of PDE3 and PDE4 inhibitors suggesting that increasing MIMX concentration induces non-selective inhibition, probably towards PDE3 or PDE4, according to its affinity values [25,27]. Finally, we confirmed the absence of PDE2 expression and activity in our conditions, as shown in previous works [33]. Thus, cultured RASMCs exhibited PDE1+PDE3+PDE4 activities, which contributed to 80% of total cAMP-PDE activity. However, IBMX-sensitive PDE activity represented about 96% of total activity. This



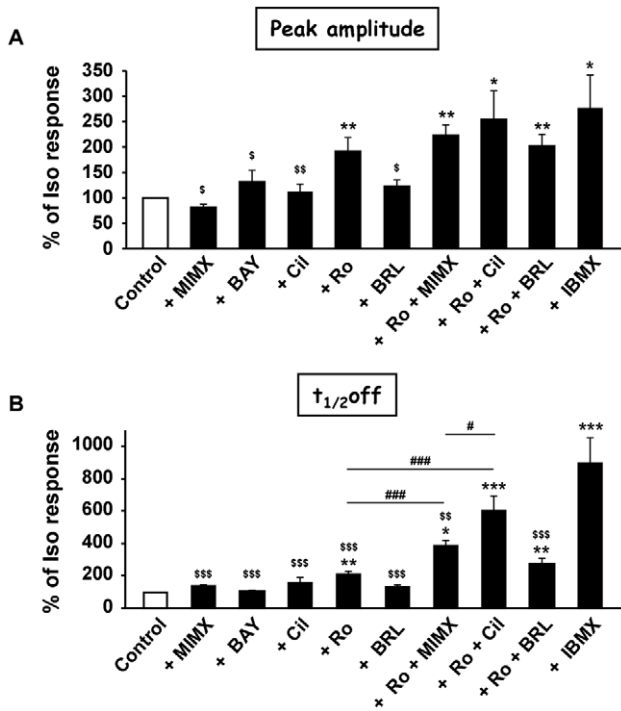
**Figure 5. Effect of PDE inhibition on  $\beta$ -AR-induced cytosolic cAMP signal in RASMCs.** Cytosolic cAMP measurements were conducted in cultured RASMCs cells using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps in response to a short application of isoproterenol (Iso, 0.1  $\mu$ M, 15 s) after a pre-treatment in the absence ( $\square$ ) or presence ( $\blacksquare$ ) of one selective PDE family inhibitor (A: 50  $\mu$ M MIMX for PDE1; B: 100 nM BAY for PDE2; C: 1  $\mu$ M Cil for PDE3; D: 10  $\mu$ M Ro for PDE4; E: 50  $\mu$ M BRL for PDE7) or a combination of several inhibitors (F: 10  $\mu$ M Ro + 50  $\mu$ M MIMX +; G: 10  $\mu$ M Ro + 1  $\mu$ M Cil; H: 10  $\mu$ M Ro + 50  $\mu$ M BRL) or the non-selective PDE inhibitor (I: 100  $\mu$ M IBMX). Top and lower panels represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the corresponding kinetic parameters, respectively. Data are mean  $\pm$  SEM of 8–13 independent cells as indicated. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus Iso.

doi:10.1371/journal.pone.0047826.g005

suggests either that the concentrations of PDE inhibitors are not sufficient to fully block the related PDE activities, or that PDEs other than PDE1, 3 and 4 participate in the cAMP hydrolyzing PDE activity. Other IBMX-sensitive cAMP-PDEs include PDE7, PDE10 and PDE11. Phillips *et al* have shown that PDE7 mRNA is expressed in cultured RASMCs (at passage 2), and proposed that PDE7-PDE11 account for less than 10% of total cAMP-PDE activity of these cells [5]. Here, we observed that cultured RASMCs (at passages 2–6) express both PDE7A and PDE7B mRNAs, PDE7A being dominant. We further investigated the potential role of PDE7 in total cAMP-hydrolyzing activity by using a recently described PDE7 inhibitor (BRL) [28]. BRL decreased total cAMP-PDE activity by 16%, but had no additive effect to that induced by the association of PDE1+PDE3+PDE4 inhibitors. Furthermore, BRL did not alter the cAMP concentration measured by FRET-based imaging in intact living cells. Thus, the effect of BRL observed *in vitro* in cell lysates might be explained by a non-selective action on other PDEs than PDE7, particularly PDE4, for which BRL exhibits some affinity [28]. Therefore, the function of PDE7 isoforms in RASMCs remains to be elucidated

by using more specific tools. In the absence of commercialized selective PDE10 and PDE11 inhibitors, we were unable to evaluate the contribution of these two isoforms in our PDE activity assay. To conclude, despite some limits of the pharmacological approach used in the PDE activity assay regarding the selectivity of PDE inhibitors, our data clearly show that the rank order of PDE activity in cultured RASMCs is PDE4 > PDE1 = PDE3. The PDE2 activity is absent, and the PDE7 activity uncertain.

In the second part of the work, we analyzed the functional contribution of these PDE isoforms in controlling intracellular cAMP concentration. For this purpose, we took advantage of the FRET technique using an Epac1-based sensor which allows a real-time monitoring of cAMP concentrations in living cells [13,14]. This approach has been applied extensively in several cell types, including cell lines [14] or freshly isolated cells such as cardiomyocytes [34], but rarely in vascular smooth muscle cells [35,36]. In mice aorta SMCs maintained one week in culture after dissociation, Iso increased intracellular cAMP with an EC<sub>50</sub> of about 40 nM [36]. In our study, we also used the physiological  $\beta$ -AR stimulation as cAMP-elevating agent. Cumulative application



**Figure 6. Effect of PDE inhibitors on the peak amplitude and  $t_{1/2}$ off of  $\beta$ -AR-induced cytosolic cAMP signal in RASMCs.** Dynamic parameters (peak amplitude, **A** and  $t_{1/2}$ off, **B**) obtained in Figure 5 are expressed in % of isoproterenol-induced response (Control). Data are mean  $\pm$  SEM of 8–13 independent cells as indicated. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus Control; <sup>s</sup>  $P < 0.05$ , <sup>ss</sup>  $P < 0.01$  and <sup>sss</sup>  $P < 0.001$  versus IBMX; #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$  as indicated. doi:10.1371/journal.pone.0047826.g006

of Iso produced a significant rise in  $[cAMP]_i$ , with an  $EC_{50}$  value of about 18 nM which is in the same range of concentration as that related to its functional relaxant effect in intact rat aorta [37]. Furthermore, both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR subtypes contributed to this response, the  $\beta_2$  subtype being predominant according to the efficiency of the selective  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR antagonists to inhibit this response. This is consistent with the fact that both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR are localized at the SMC membrane and contribute to the  $\beta$ -adrenergic relaxation in rat aorta [38,39]. This also indicates that our culture protocol maintains the expression of these receptors [40]. We did not explore the role of the  $\beta_3$ -AR as this subtype has been shown to be expressed and functional in endothelial cells of rat aorta [37,41].

A short  $\beta$ -AR stimulation of RASMCs during 15 s induced a fast but transient increase in the cytosolic cAMP concentration with a return to baseline in about 200 s. This is similar to what was observed in other cell types, including rat ventricular cardiomyocytes [34]. The broad spectrum PDE inhibitor, IBMX, markedly prolonged the Iso-triggered cAMP signal, by increasing the  $t_{1/2}$ off by almost 800%, demonstrating that PDEs play a key role in modulating cytosolic cAMP concentrations in RASMCs. However, even in the presence of IBMX, the cAMP signal was not stable in time and slowly decreased. Several hypotheses might be proposed to explain this observation: (1) the failure of IBMX to totally block PDEs; (2) the role of an IBMX-insensitive PDE isoform in cAMP degradation, such as PDE8; accordingly, we detected PDE8A mRNA in RASMCs. However, we were unable to characterize PDE8 function in our model as no selective PDE8 inhibitor is commercially available; (3) the decrease in cAMP

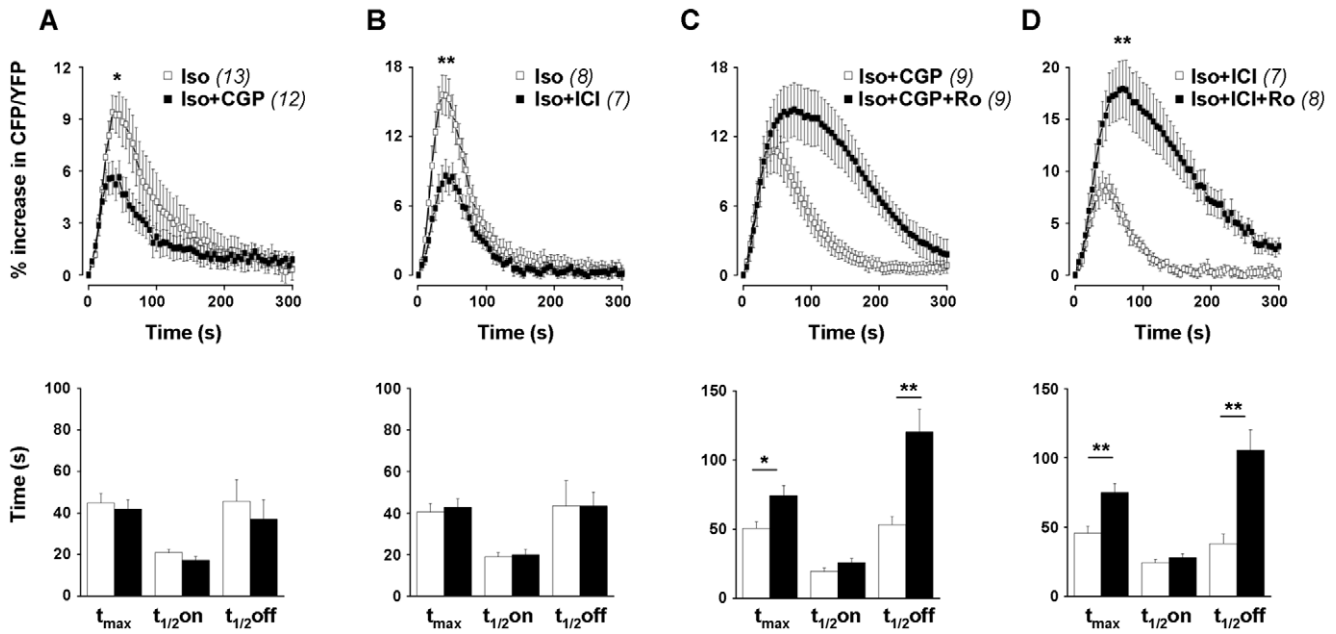
**Table 2. Effect of PDE inhibition on basal cytosolic cAMP signal in RASMCs.**

PDE inhibitor	% increase in CFP/YFP
Vehicle	0.8 $\pm$ 0.1 (n = 9)
MIMX (50 $\mu$ M)	3.1 $\pm$ 0.3 (n = 8) ***
BAY (100 nM)	0.3 $\pm$ 0.1 (n = 13)
Cil (1 $\mu$ M)	1.7 $\pm$ 0.4 (n = 12) *
Ro (10 $\mu$ M)	1.8 $\pm$ 0.4 (n = 13) *
BRL (50 $\mu$ M)	1.4 $\pm$ 0.3 (n = 9)
Ro (10 $\mu$ M) + MIMX (50 $\mu$ M)	2.8 $\pm$ 0.3 (n = 12) ***, #
Ro (10 $\mu$ M) + Cil (1 $\mu$ M)	2.4 $\pm$ 0.7 (n = 9) *
Ro (10 $\mu$ M) + BRL (50 $\mu$ M)	1.8 $\pm$ 0.2 (n = 9) **
IBMX (100 $\mu$ M)	3.4 $\pm$ 1.1 (n = 8) *

Cytosolic cAMP measurements were conducted in cultured RAMSCs cells using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps. The % increase in CFP/YFP ratio induced by the different PDE inhibitors or the vehicle was calculated after a 3 min-incubation. Data are mean  $\pm$  SEM of 8–13 independent cells as indicated. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus vehicle; #  $P < 0.05$  versus Ro. doi:10.1371/journal.pone.0047826.t002

concentration due to its extrusion out of the cell through a multidrug resistance-associated protein, the MRP-4, which inhibition has been shown to slightly increase cAMP concentration in response to forskolin in RASMCs [35]; and (4) the biophysical properties of the Epac1-camps sensor [13], as the decrease of the signal in the presence of IBMX was slowed down when a different Epac-based cAMP sensor was used, the Epac2-camps sensor, characterized by a two times higher affinity than Epac1-camps [13]. Nevertheless, the strong effect of IBMX demonstrates that IBMX-sensitive PDEs play a major role in regulating the dynamic of the  $\beta$ -adrenergic cytosolic cAMP signal.

The PDE subtypes involved in this effect were further characterized using the PDE inhibitors at the concentrations established in the PDE activity assay. We observed that: (1) PDE4 was the main isoform hydrolyzing the cytosolic cAMP produced after  $\beta$ -AR stimulation in RASMCs; (2) PDE1 and PDE3 also contributed to this activity but only when PDE4 was inhibited; (3) PDE2 and PDE7 were absent or inactive. This functional PDE activity pattern is in perfect adequacy with the biochemical PDE activity pattern described above in the same cells, PDE4 being the main active and functional isoform. Furthermore, we observed that PDE4 similarly controlled the cytosolic cAMP pool produced by both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR stimulations in RASMCs. This is in agreement with studies showing that PDE4 regulates both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR signaling in heterologous expression systems as well as native cardiomyocytes [42,43]. However, the nature of the PDE4 isoform and the mode of interaction between PDE4 and  $\beta$ -AR subtypes remain to be identified. Interestingly, we showed that PDE4 masked the functional contribution of both PDE1 and PDE3 which was revealed only upon PDE4 inhibition. One explanation might be that under PDE4 inhibition, PDE1 and PDE3 activities are efficiently enhanced to a level allowing them to hydrolyze cAMP in living cells. In fact, PDE3 activity is known to be increased by PKA phosphorylation [44] that might occur following the cAMP increase induced by PDE4 inhibition. However, an opposite regulation pathway is described for PDE1, as its phosphorylation by PKA is known to decrease its activity [3], suggesting that this hypothesis is unlikely, at least for PDE1. A more relevant explanation is that PDE4 confines the cytosolic cAMP generated under  $\beta$ -AR stimulation into a subcellular

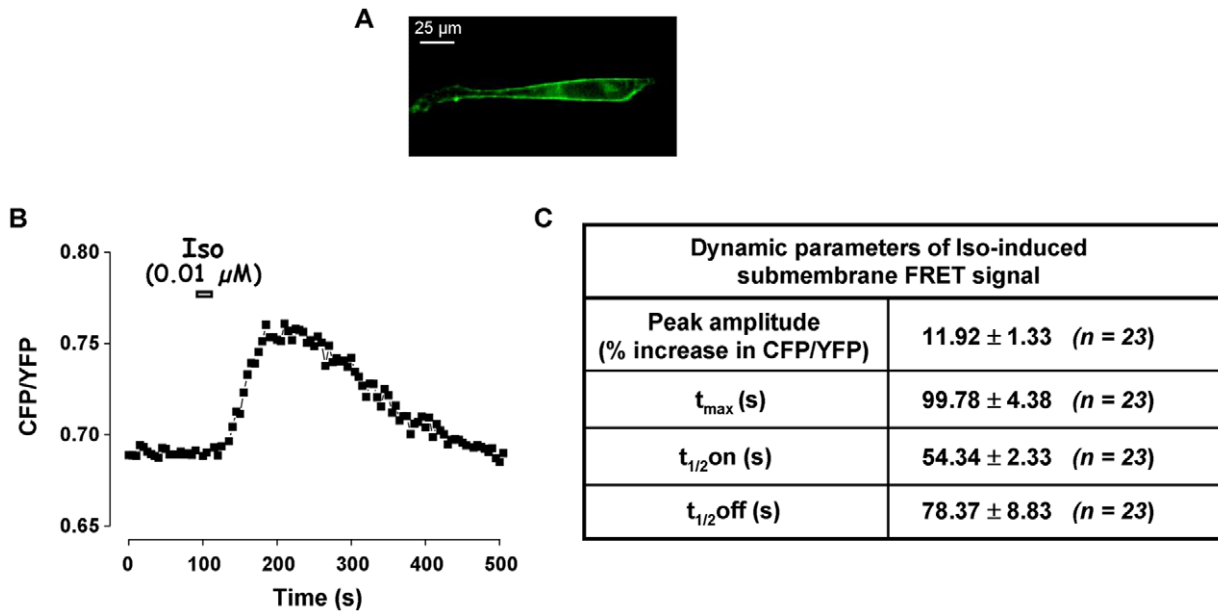


**Figure 7. Effect of  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR antagonists on  $\beta$ -AR-induced cytosolic cAMP signals in RASMCs.** Cytosolic cAMP measurements were conducted in cultured RASMCs cells using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps in response to a short application of isoproterenol (Iso, 0.1  $\mu$ M, 15 s) after a pre-treatment in the absence or presence of  $\beta$ -AR antagonists and PDE4 inhibitor. **A, B:** Effect of  $\beta_1$ -AR (100 nM CGP-20712A, CGP; **A**) and  $\beta_2$ -AR (5 nM ICI 118,551, ICI; **B**) antagonists on Iso response. **C, D:** Effect of PDE4 inhibitor (10  $\mu$ M Ro) on Iso response obtained in the presence of  $\beta_1$ -AR (Iso+CGP; **C**) or  $\beta_2$ -AR (Iso+ICI; **D**) antagonists. *Top and lower panels* represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the corresponding kinetic parameters, respectively. Data are mean  $\pm$  SEM of 7-13 independent cells as indicated. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus Iso (A, B), Iso+CGP (C) or Iso+ICI (D). doi:10.1371/journal.pone.0047826.g007

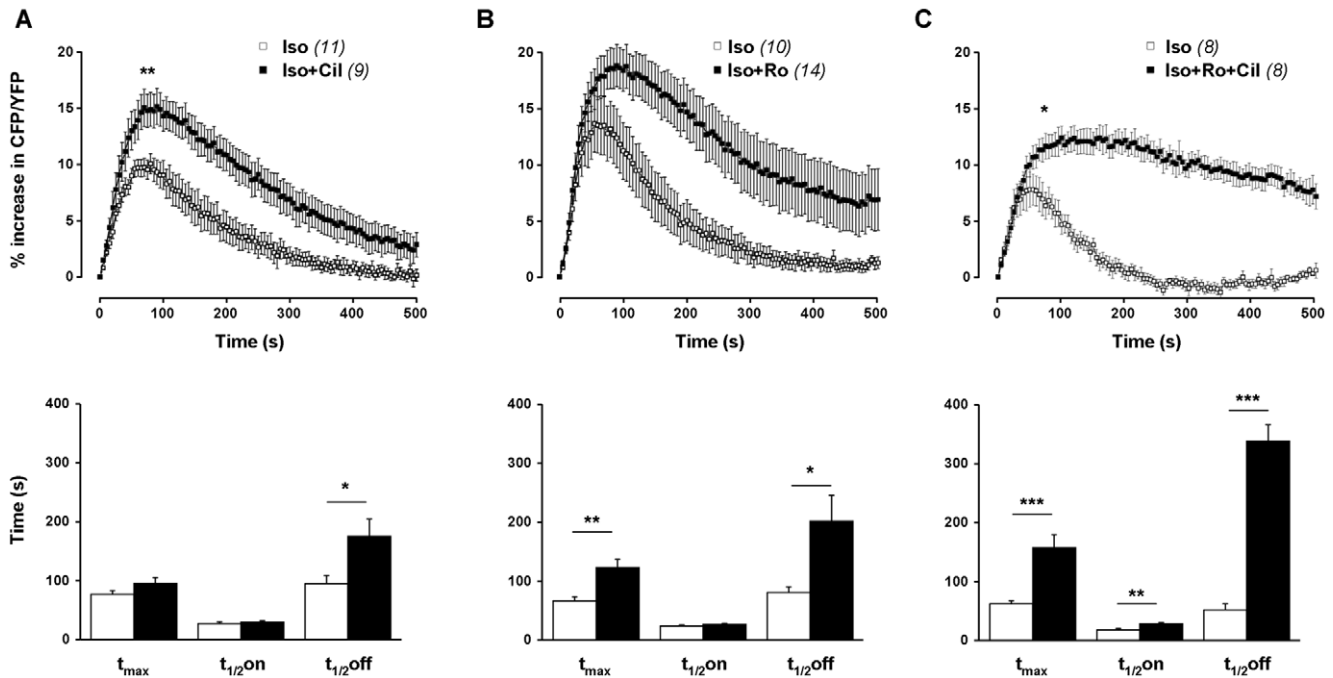
compartment devoid of PDE1 and PDE3, and that PDE4 inhibition allows cAMP to diffuse in other subcellular compartments enriched in PDE1 and PDE3. The role of PDEs in shaping

enzymatic barriers to limit cAMP diffusion has been extensively studied, particularly in cardiomyocytes [6].

To get some insight on the subcellular cAMP compartmentation in our cellular model, we measured cAMP underneath the plasma



**Figure 8. Effect of transient activation of  $\beta$ -AR on submembrane [cAMP] in RASMCs.** Submembrane cAMP measurements were conducted in cultured RASMCs cells using the plasma membrane-targeted FRET-based cAMP sensor pm-Epac2-camps in response to a short application of isoproterenol (Iso, 0.01  $\mu$ M, 15 s). **A:** Submembrane localization of pm-Epac2-camps was ascertained by recording the CFP emission. **B:** Variation of the CFP/YFP ratio monitored in one cell. **C:** Dynamic parameters (peak amplitude, t<sub>max</sub>, t<sub>1/2 on</sub>, and t<sub>1/2 off</sub>) of isoproterenol-induced FRET signal as shown in B. Data are mean  $\pm$  SEM of 23 independent cells. doi:10.1371/journal.pone.0047826.g008



**Figure 9. Effect of PDE inhibition on  $\beta$ -AR-induced submembrane cAMP signal in RASMCs.** Submembrane cAMP measurements were conducted in cultured RASMCs cells using the FRET-based cAMP sensor pmEpac2-camps in response to a short application of isoproterenol (Iso, 0.01  $\mu$ M, 15 s) after a pre-treatment in the absence ( $\square$ ) or presence ( $\blacksquare$ ) of one selective PDE family inhibitor (**A**: 1  $\mu$ M Cil for PDE3; **B**: 10  $\mu$ M Ro for PDE4) or a combination of 10  $\mu$ M Ro + 1  $\mu$ M Cil (**C**). *Top and lower panels* represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the corresponding kinetic parameters, respectively. Data are mean  $\pm$  SEM of 8–14 independent cells as indicated. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus Iso. doi:10.1371/journal.pone.0047826.g009

membrane. To do this, we used a FRET-based sensor which was modified by adding to its N-terminal the “SH4” motif of Lyn kinase. We confirmed that this modification targeted the sensor to the plasma membrane of RASMCs, as previously published in HEK cells [22]. We observed that PDE3 and PDE4 acted in a synergistic manner to hydrolyze the submembrane cAMP produced by  $\beta$ -AR stimulation in RASMCs. This is clearly different from what happened in the cytosolic compartment, suggesting that PDEs delineate distinct subcellular cAMP pools. However, these results should be interpreted with caution because of some differences between the cytosolic and the plasma membrane-targeted sensors. First, the cytosolic and plasma membrane-targeted sensors operate under 2 different vectors of expression, namely a plasmid and an adenovirus, respectively. This implies appropriate culture conditions for each vector, that

might be associated with distinct phenotypes [45]. Second, the two sensors possess distinct Epac-derived cAMP-binding domains, Epac1 and Epac2, which are known to exhibit different affinity for cAMP [13,22].

In conclusion, our study underlines the importance of cAMP-PDEs for the spatiotemporal control of intracellular cAMP in synthetic RASMCs, and demonstrates the prominent role of PDE4 in the control of both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR responses. The synthetic phenotype of SMCs is representative of the phenotype of proliferative SMCs observed in vascular diseases, like atherosclerosis and restenosis [46], and cAMP exerts anti-proliferative and anti-migratory properties in vascular smooth muscle cells. Thus, a therapeutic strategy to counter the pathological vascular proliferative state is to increase cAMP concentrations in these cells. Our data suggest that in this context, a combination of a PDE4 inhibitor with a PDE1 or PDE3 inhibitor would be more potent than a single inhibitor. Furthermore, the effectors regulated by cAMP differ regarding the SMC phenotype (synthetic *versus* contractile). It is thus tempting to speculate that PDE isoforms contribute to the functional specificity of cAMP by delineating distinct subcellular cAMP pools involved in distinct physiological processes. Further work is needed to explore this hypothesis.

## Supporting Information

**Figure S1 Synthetic phenotype of cultured RASMCs.** Immunolabeling of cultured RASMCs with antibodies specific for the  $\alpha$ -smooth muscle actin (clone 1A4, Sigma) used as a marker of SMC (**A**), the smooth muscle myosin heavy chain (SMMS-1, Dako) used as a marker of the contractile phenotype of SMC (**B**) or the non-muscle myosin heavy chain (ab684, Abcam) used as a marker of the synthetic phenotype of SMC (**C**). Bar = 20  $\mu$ m.

**Table 3. Effect of PDE inhibition on basal submembrane cAMP signal in RASMCs.**

PDE inhibitor	% increase in CFP/YFP
Vehicle	0.8 $\pm$ 0.1 (n = 10)
Cil (1 $\mu$ M)	1.8 $\pm$ 0.5 (n = 9) ***
Ro (10 $\mu$ M)	2.6 $\pm$ 0.3 (n = 14) ***
Ro (10 $\mu$ M) + Cil (1 $\mu$ M)	5.2 $\pm$ 0.9 (n = 8) ***, ##

Submembrane cAMP measurements were conducted in cultured RASMCs cells using the FRET-based cAMP sensor pm-Epac2-camps. The % increase in CFP/YFP ratio induced by the different PDE inhibitors or the vehicle was calculated after a 3 min-incubation. Data are mean $\pm$ SEM of 8–14 independent cells as indicated. \*\*\*  $P < 0.001$  versus vehicle; ##  $P < 0.01$  versus Cil and versus Ro. doi:10.1371/journal.pone.0047826.t003



(PPT)

**Figure S2 Effect of PDE1+PDE4 inhibition on  $\beta$ -AR-induced cytosolic cAMP signal in RASMCs.** Cytosolic cAMP measurements were conducted in cultured RASMCs cells using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps in response to a short application of isoproterenol (Iso, 0.1  $\mu$ M, 15 s) after a pre-treatment in the absence ( $\square$ ) or presence ( $\blacksquare$ ) of 10  $\mu$ M MIMX + 10  $\mu$ M Ro. *Top* and *lower panels* represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the corresponding kinetic parameters, respectively. Data are mean $\pm$ SEM of 10–15 independent cells as indicated. \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 *versus* Iso. (PPT)

**Figure S3 Effect of the  $\beta_1$ -AR antagonist on  $\beta_2$ -AR-induced cytosolic cAMP signals in cultured RASMCs.** Cytosolic cAMP measurements were conducted using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps in response to a maintained application of the  $\beta_2$ -AR agonist formoterol (0.1  $\mu$ M, 3 min) after a pre-treatment in the absence or presence of the  $\beta_1$ -AR antagonist (100 nM CGP-20712A). Data are mean $\pm$ SEM of 4 independent cells. (PPT)

**Figure S4 Effect of different concentrations of the  $\beta_2$ -AR antagonist on  $\beta$ -AR-induced cytosolic cAMP signals in cultured RASMCs.** Cytosolic cAMP measurements were conducted using the FRET-based cAMP sensor Epac1-camps in

response to a short application of isoproterenol (Iso, 0.1  $\mu$ M, 15 s) after a pre-treatment in the absence or presence of increasing concentrations of the  $\beta_2$ -AR antagonist (1, 5, 10 and 100 nM ICI 118,551, *ICI*). The peak amplitude of the FRET-signal obtained in the different conditions is expressed in % of the isoproterenol-induced response (*Control*). Data are mean $\pm$ SEM of 4–9 independent cells. \* P<0.05 *versus* Iso. (PPT)

## Acknowledgments

We thank Valérie Domergue-Dupont (IPSIT, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France) and the animal core facility for efficient animal care, Patrick Lechêne (Inserm UMR-S 769) for technical assistance in FRET experiments, Claudine Deloménie (Transcriptomic platform of IPSIT IFR141, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France) for technical assistance in RT-PCR experiments and Dr Grégoire Vandecasteele (Inserm UMR-S 769) for helpful discussions. We are grateful to Dr. V.O. Nikolaev (Universitätsmedizin Göttingen, Germany) for providing us the FRET-based cAMP sensors, Epac1-camps and pm-Epac2-camps.

## Author Contributions

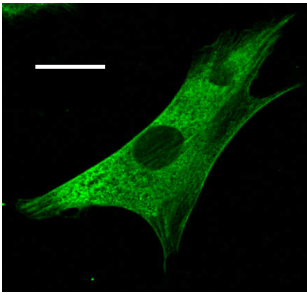
Conceived and designed the experiments: RF VL KZ FH. Performed the experiments: KZ FH VN. Analyzed the data: KZ FH VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: KZ FH VN VL. Wrote the paper: KZ GJ RF VL.

## References

- Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, Nishizawa Y (2001) Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol* 186: 1–10.
- McDaniel NL, Rembold CM, Murphy RA (1994) Cyclic nucleotide dependent relaxation in vascular smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1380–1385.
- Omori K, Kotera J (2007) Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100: 309–327.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, et al. (2003) Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64: 533–546.
- Phillips PG, Long L, Wilkins MR, Morrell NW (2005) cAMP phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogs in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L103–L115.
- Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicus J, et al. (2006) Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99: 816–828.
- Xiang YK (2011) Compartmentalization of  $\beta$ -adrenergic signals in cardiomyocytes. *Circ Res* 109: 231–244.
- Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R (2012) PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 52: 323–329.
- Castro LR, Verde I, Cooper DM, Fischmeister R (2006) Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113: 2221–2228.
- Delpy E, Coste H, Gouville AC (1996) Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol* 119: 471–478.
- Piggott LA, Hassell KA, Berkova Z, Morris AP, Silberbach M, et al. (2006) Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments. *J Gen Physiol* 128: 3–14.
- Nausch LW, Ledoux J, Bonev AD, Nelson MT, Dostmann WR (2008) Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 365–370.
- Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279: 37215–37218.
- Nikolaev VO, Lohse MJ (2006) Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology (Bethesda)* 21: 86–92.
- Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Botter BA (1990) Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 10: 966–990.
- Dunkerley HA, Tilley DG, Palmer D, Liu H, Jimmo SL, et al. (2002) Reduced phosphodiesterase 3 activity and phosphodiesterase 3A level in synthetic vascular smooth muscle cells: implications for use of phosphodiesterase 3 inhibitors in cardiovascular tissues. *Mol Pharmacol* 61: 1033–1040.
- Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Sonnenburg WK, Rybalkina IG, Kwak KS, et al. (1997) Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. *J Clin Invest* 100: 2611–2621.
- Liu H, Palmer D, Jimmo SL, Tilley DG, Dunkerley HA, et al. (2000) Expression of phosphodiesterase 4D (PDE4D) is regulated by both the cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and expression in cells. *J Biol Chem* 275: 26615–26624.
- Vallot O, Combettes L, Jourdon P, Inamo J, Marty I, et al. (2000) Intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1225–1235.
- Thompson WJ, Appleman MM (1971) Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *J Biol Chem* 246: 3145–3150.
- Saucerman JJ, McCulloch AD (2006) Cardiac  $\beta$ -adrenergic signaling: from subcellular microdomains to heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 1080: 348–361.
- Wachten S, Masada N, Ayling IJ, Ciruela A, Nikolaev VO, et al. (2010) Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci* 123: 95–106.
- Boess FG, Hendrix M, van der Staay EJ, Erb C, Schreiber R, et al. (2004) Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47: 1081–1092.
- Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, et al. (2000) Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* 59: 347–356.
- Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J, Karpen JW (2001) *In vivo* assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* 118: 63–78.
- Wells JN, Miller JR (1988) Methylxanthine inhibitors of phosphodiesterases. *Methods Enzymol* 159: 489–496.
- Goncalves RL, Lugnier C, Keravis T, Lopes MJ, Fantini FA, et al. (2009) The flavonoid dioclein is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. *Eur J Pharmacol* 620: 78–83.
- Smith SJ, Cieslinski LB, Newton R, Donnelly LE, Fenwick PS, et al. (2004) Discovery of BRL 50481. *Mol Pharmacol* 66: 1679–1689.
- Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, et al. (2008)  $\beta$ -Adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent  $\beta_2$  component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 77: 202–210.
- Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN (2004) Comparative pharmacology of human  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 369: 151–159.
- Palmer D, Maurice DH (2000) Dual expression and differential regulation of phosphodiesterase 3A and phosphodiesterase 3B in human vascular smooth

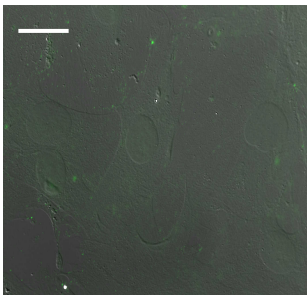
- muscle: implications for phosphodiesterase 3 inhibition in human cardiovascular tissues. *Mol Pharmacol* 58: 247–252.
32. Orallo F, Alvarez E, Basaran H, Lugnier C (2004) Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370: 452–463.
  33. Rose RJ, Liu H, Palmer D, Maurice DH (1997) Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* 122: 233–240.
  34. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, et al. (2008) Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type  $Ca^{2+}$  channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* 102: 1091–1100.
  35. Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, Nikolaev VO, Hatem SN, et al. (2008) Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest* 118: 2747–2757.
  36. von Hayn K, Werthmann RC, Nikolaev VO, Hommers LG, Lohse MJ, et al. (2010) Gq-mediated  $Ca^{2+}$  signals inhibit adenylyl cyclases 5/6 in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C324–C332.
  37. Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, et al. (1999)  $\beta_3$ -Adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 128: 69–76.
  38. Brawley L, Shaw AM, MacDonald A (2000)  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - and atypical  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 129: 637–644.
  39. Guimaraes S, Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53: 319–356.
  40. Ostrom RS, Liu X, Head BP, Gregorian C, Seasholtz TM, et al. (2002) Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol Pharmacol* 62: 983–992.
  41. Rautureau Y, Toumaniantz G, Serpillon S, Jourdon P, Trochu JN, et al. (2002)  $\beta_3$ -adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br J Pharmacol* 137: 153–161.
  42. Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S (2006) Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* 99: 1084–1091.
  43. Richter W, Day P, Agrawal R, Bruss MD, Granier S, et al. (2008) Signaling from  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J* 27: 384–393.
  44. Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC (1997) Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272: 6823–6826.
  45. Rovner AS, Murphy RA, Owens GK (1986) Expression of smooth muscle and nonmuscle myosin heavy chains in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 261: 14740–14745.
  46. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84: 767–801.

**A**



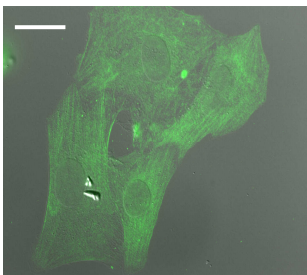
**$\alpha$ -smooth muscle actin**

**B**



**smooth muscle myosin heavy chain**

**C**



**non-muscle myosin heavy chain**

Supplemental data

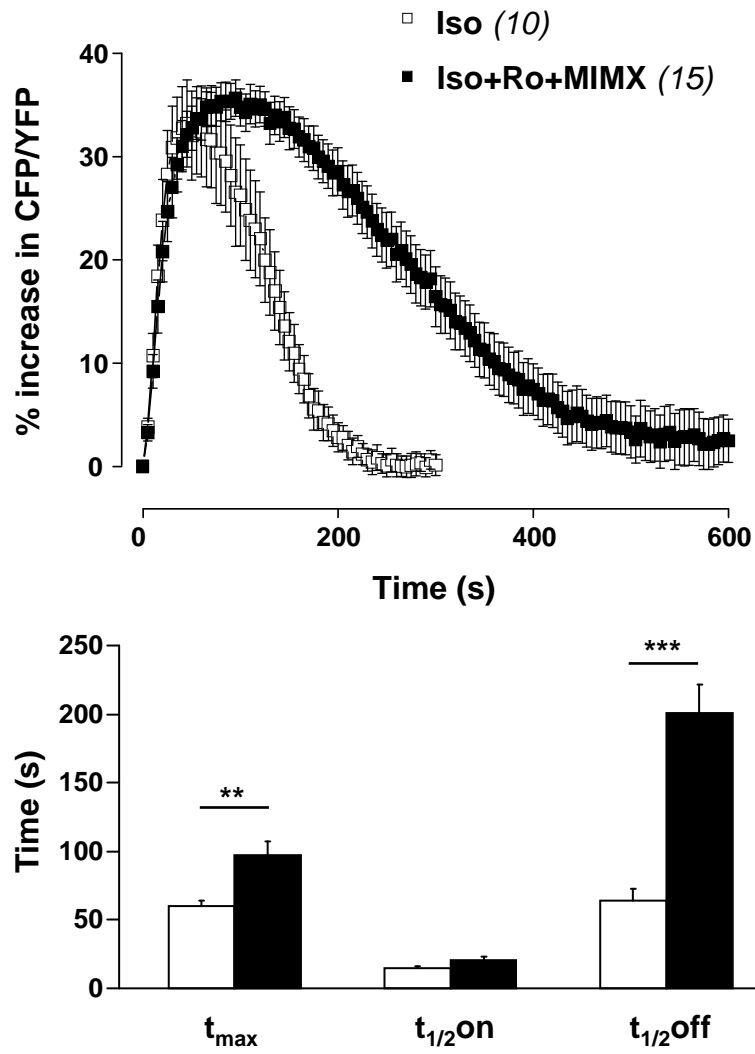


Figure S2

## Supplemental data

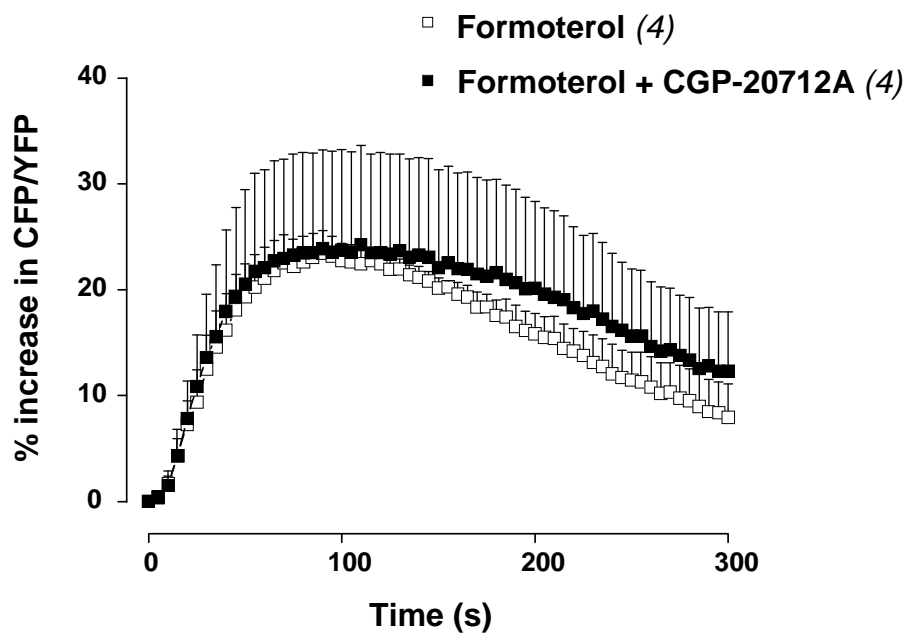


Figure S3

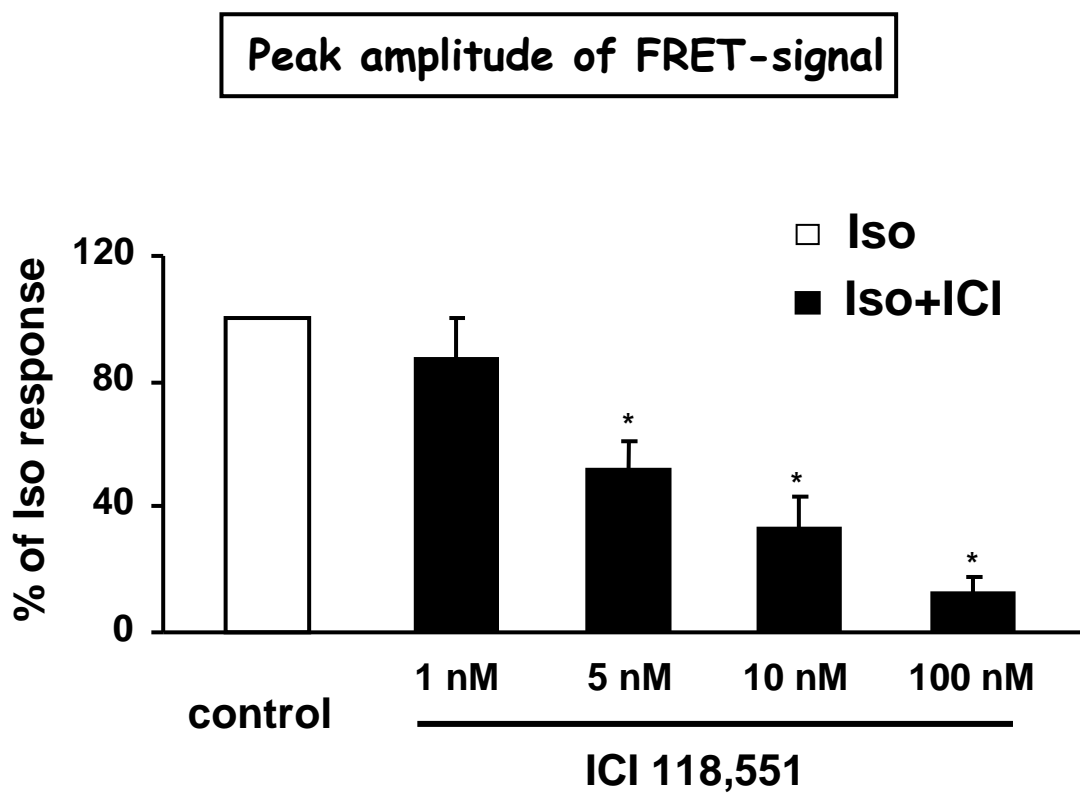
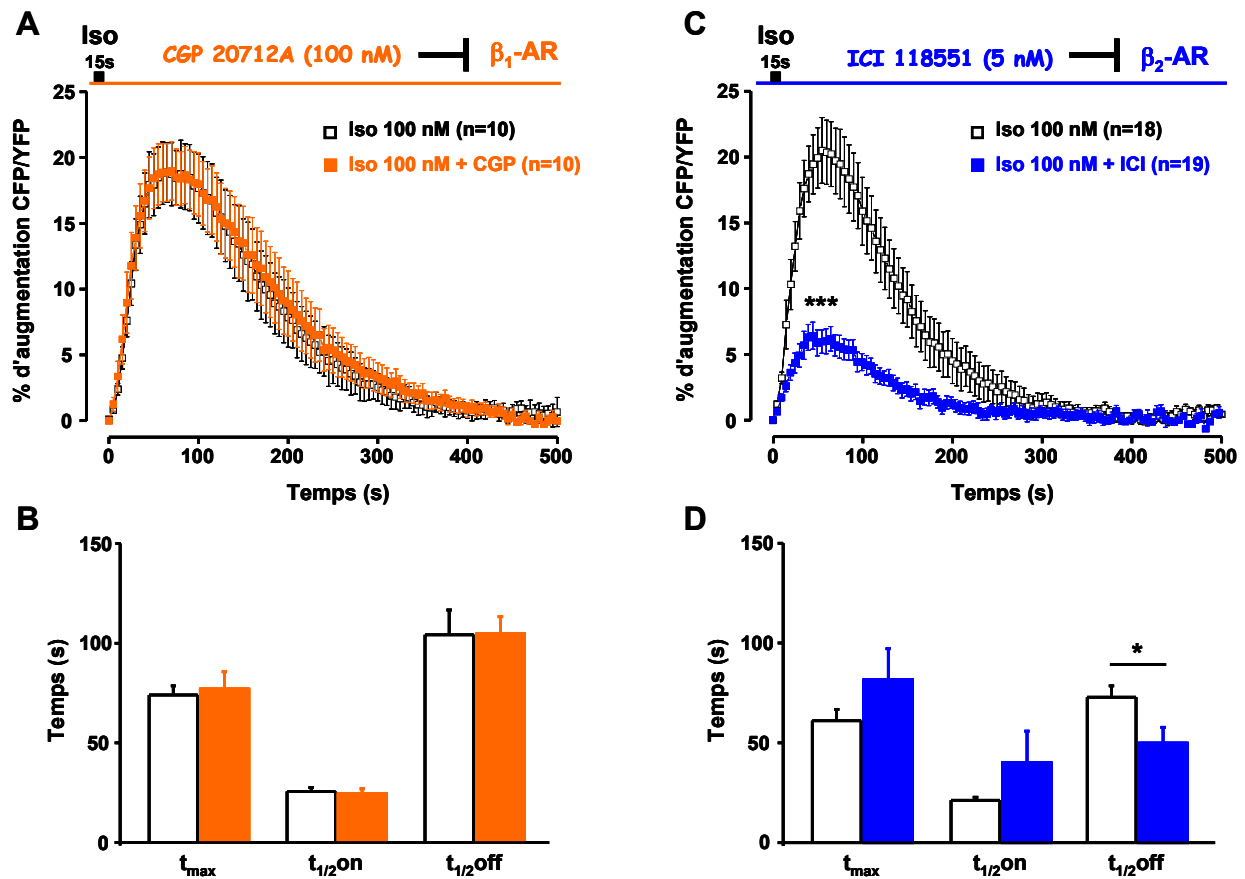


Figure S4

## **II.B. Rôle des sous-types de récepteurs $\beta_1$ - et $\beta_2$ -AR dans le signal AMPc sous-membranaire induit par une stimulation $\beta$ -adrénergique dans les CML d'aorte de rat en culture**

Dans l'étude présentée précédemment (Zhai *et al.*, 2012), nous avons montré que les deux sous-types de récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR participent à l'augmentation de la concentration en AMPc enregistrée dans le compartiment cytosolique, suite à l'application d'isoprénaline. Nous avons alors vérifié la participation de ces deux sous-types de récepteurs dans l'élévation du niveau d'AMPc sous-membranaire, mesuré avec la sonde Lyn-Epac2-camps.

Pour cela, les CMLV ont été incubées en présence d'antagoniste  $\beta_1$ - ou  $\beta_2$ -AR pendant 4 minutes avant une stimulation  $\beta$ -adrénergique brève par l'isoprénaline (Iso 100 nM pendant 15 secondes). L'antagoniste sélectif  $\beta_1$ -adrénergique, le CGP-20712A, a été utilisé à une concentration de 100 nM, ce qui est environ 100 fois plus élevé que son affinité pour ce récepteur et 10 fois plus faible que celle pour le sous-type  $\beta_2$  (Hoffmann *et al.*, 2004; Leblais *et al.*, 2008). A cette concentration, le CGP-20712A ne modifie pas le signal FRET transitoire sous-membranaire induit par l'isoprénaline (**Figure 1A et B**), ce qui semble indiquer que les récepteurs  $\beta_1$ -AR ne sont pas impliqués dans cette réponse. L'expérience a été reproduite en présence d'un antagoniste sélectif  $\beta_2$ -adrénergique, l'ICI 118,551 qui présente une affinité de liaison pour le sous-type  $\beta_2$  d'environ 1 nM et un ratio de sélectivité pour le sous-type  $\beta_2$  par rapport au sous-type  $\beta_1$  d'environ 70 (Hoffmann *et al.*, 2004). Nous avons utilisé l'ICI 118,551 à une concentration de 5 nM qui devrait permettre de conserver sa sélectivité envers les récepteurs  $\beta_2$ -AR en accord avec ses affinités de liaison. Contrairement à l'antagoniste  $\beta_1$ -adrénergique l'ICI 118,551 diminue considérablement l'amplitude de la réponse à l'isoprénaline (de 66% ;  $P < 0,001$ ; **Figure 1C**) en modifiant légèrement la phase de retour du signal (diminution du  $t_{1/2\text{off}}$  de 32% ;  $P < 0,05$ ), ce qui indique que les récepteurs  $\beta_2$ -AR sont impliqués dans cette réponse.



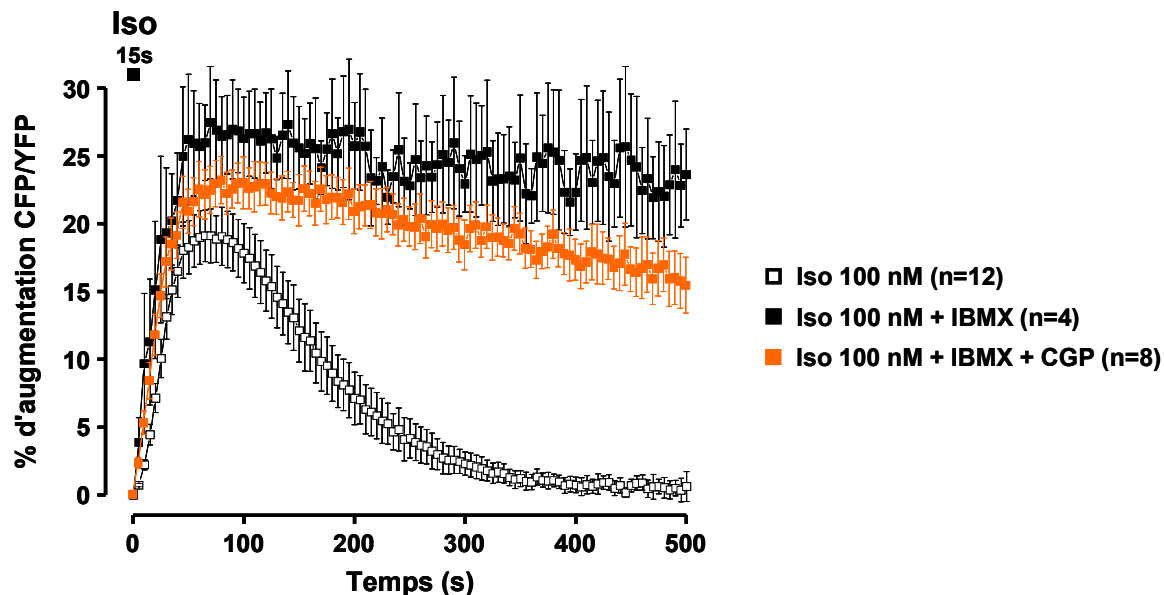
**Figure 1** : Effet des antagonistes des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR sur le signal AMPc sous-membranaire induit par une stimulation  $\beta$ -adrénergique dans les CML d'aorte de rat.

Les mesures d'AMPc sous-membranaires ont été effectuées dans des CML d'aorte de rat en culture en réponse à une stimulation brève à l'isoprénaline (Iso 100 nM, 15 secondes) en utilisant la sonde FRET Lyn-Epac2-camps sensible à l'AMPc et adressé à la membrane. **A-D**: Effet des antagonistes  $\beta_1$ -AR (100 nM CGP-20712A, CGP ; **A,B**) et  $\beta_2$ -AR (5 nM ICI 118,551, ICI; **C,D**) sur la réponse Iso. **A,C**: Pourcentage moyen d'augmentation du ratio CFP/YFP. **B,D**: Paramètres cinétiques du signal FRET ( $t_{max}$ ,  $t_{1/2on}$  et  $t_{1/2off}$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM du nombre de cellules (n=10-19). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 *versus* Iso.

L'absence de contribution des récepteurs  $\beta_1$ -AR à la réponse à l'isoprénaline pourrait être la conséquence d'une inhibition de ce signal par les PDE. Pour vérifier cela, nous avons incubé les CML avec l'inhibiteur non sélectif des PDE (100  $\mu$ M IBMX) en présence ou non de l'antagoniste des récepteurs  $\beta_1$ -AR (100 nM CGP-20712A). Conformément au rôle des PDE, l'amplitude du signal AMPc sous-membranaire est augmentée (+46%, n=4 ; P<0,05) et sa durée est considérablement prolongée par l'IBMX (**Figure 2**). L'antagoniste des récepteurs  $\beta_1$ -AR, le CGP-20712A, ne modifie pas le signal FRET sous-membranaire induit par



l'isoprénaline et prolongé en présence d'IBMX. Ce résultat indique que les PDE ne masquent pas la réponse  $\beta_1$ -AR dans le compartiment sous-membranaire.



**Figure 2** : Effet de l'antagoniste des récepteurs  $\beta_1$ -AR et de l'inhibition des PDEs sur le signal AMPc sous-membranaire induit par une stimulation  $\beta$ -adrénergique dans les CML d'aorte de rat.

Les mesures d'AMPc sous-membranaires ont été effectuées dans des CML d'aorte de rat en culture en réponse à une stimulation brève à l'isoprénaline (Iso 100 nM, 15 secondes) en utilisant la sonde FRET Lyn-Epac2-camps sensible à l'AMPc et adressé à la membrane. Effet de l'antagoniste  $\beta_1$ -AR (100 nM CGP-20712A, CGP) et de l'inhibiteur non-sélectif des PDEs (100  $\mu$ M IBMX) sur la réponse Iso. Pourcentage moyen d'augmentation du ratio CFP/YFP. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM du nombre de cellules (n=10-19).

## **II.C. Influence des conditions expérimentales sur la nature des signaux AMPc enregistrés dans les CML d'aorte de rat en culture**

Dans l'étude de Zhai *et al.* (Zhai *et al.*, 2012), nous avons souligné l'importance des PDE-AMPc dans le contrôle spatio-temporel de l'AMPc intracellulaire dans les CMLV présentant un phénotype synthétique, et démontré le rôle prépondérant de la PDE4 dans le contrôle des réponses  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR enregistrées dans le compartiment cytosolique. Nous avons également observé que l'AMPc sous-membranaire produit par une stimulation  $\beta$ -adrénergique, suite à l'activation du sous-type  $\beta_2$  sans participation du sous-type  $\beta_1$ , est contrôlé de façon synergique par la PDE3 et la PDE4. Ces différences de contribution des sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et des familles de PDEs entre les deux compartiments subcellulaires étudiés suggèrent l'existence de «pools» distincts d'AMPc intracellulaire.

Cependant, les mesures d'AMPc dans ces deux compartiments ont été réalisées à l'aide de sondes FRET basées sur des domaines de liaison à l'AMPc de la protéine Epac différents (Epac1 pour la sonde cytosolique et Epac2 pour la sonde membranaire) et de méthodes d'expression propres à chaque senseur (transfection pour la sonde cytosolique et infection pour la sonde membranaire). De plus, cela a nécessité des conditions de culture cellulaires différentes qui pourraient être associées à des modifications phénotypiques des CMLV (Rovner *et al.*, 1986). En effet, pour les expériences de FRET, les CMLV ont étéensemencées de manière à être sub-confluentes pour permettre la transfection du plasmide codant pour la sonde Epac1 cytosolique ou bien isolées pour assurer l'infection de l'adénovirus vecteur de la sonde Lyn-Epac2-camps membranaire.

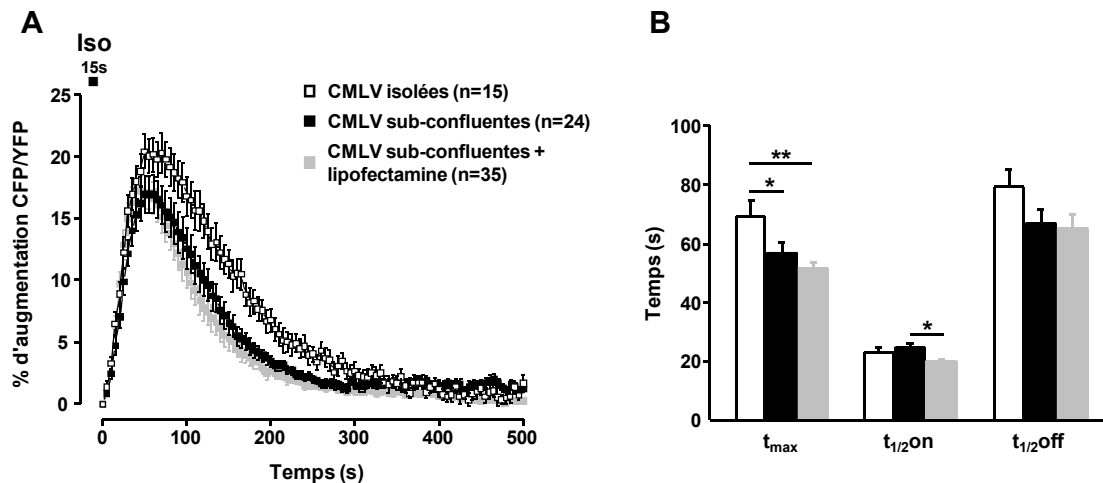
Pour évaluer l'impact de ces conditions expérimentales sur nos réponses FRET, nous avons testé une autre sonde FRET cytosolique, la sonde Epac2-camps, basée sur le domaine de liaison Epac2 et exprimée à l'aide d'un adénovirus (comme pour la sonde membranaire Lyn-Epac2-camps).

### II.C.1. Influence des conditions de culture cellulaire sur le signal AMPc cytosolique enregistré à l'aide de la sonde Epac2-camps dans les CML d'aorte de rat en culture

Afin d'évaluer l'influence des conditions de culture des CMLV et des méthodes d'expression des sondes FRET sur les signaux AMPc cytosoliques, nous avons mesuré la production d'AMPc en réponse à l'isoprénaline avec la sonde FRET cytosolique Epac2-camps dans plusieurs conditions expérimentales : dans des CMLV isolées ou sub-confluentes, traitées ou non à la lipofectamine pour mimer les conditions expérimentales utilisées dans l'étude publiée avec la sonde plasmidique Epac1-camps (Zhai *et al.*, 2012).

Dans les CMLV isolées (conditions optimales pour une infection adénovirale), la stimulation brève à l'isoprénaline (100 nM pendant 15 secondes) induit un signal FRET classique, avec une augmentation rapide du ratio CFP/YFP pour atteindre une valeur maximale de  $22,1 \pm 1,5\%$  à  $69,3 \pm 5,4$  secondes (n=15), avant de retourner au niveau basal avec un  $t_{1/2\text{off}}$  de  $79,4 \pm 6,1$  secondes.

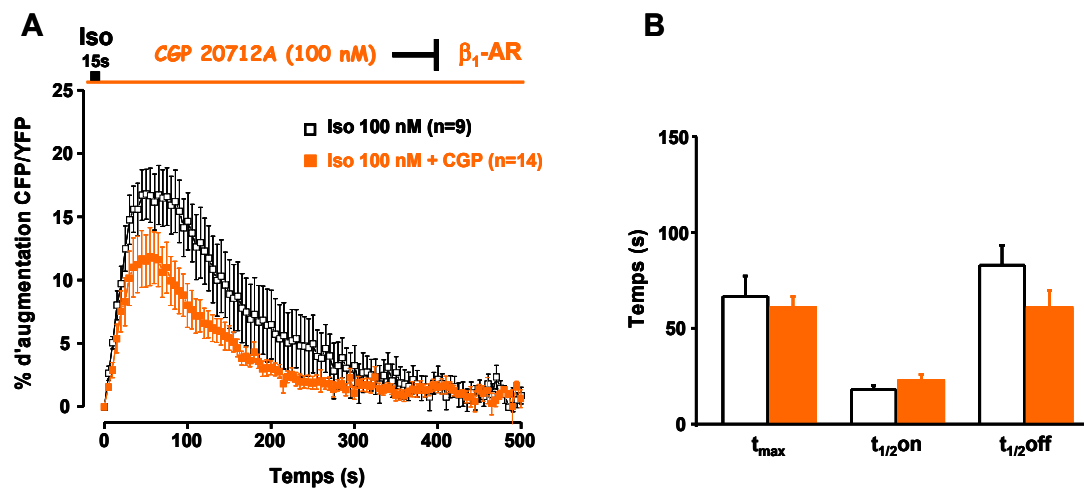
L'expression de la sonde Epac2-camps a ensuite été réalisée dans des CMLV sub-confluentes en présence ou non de lipofectamine. Dans ces conditions, le rendement d'infection est plus faible que celui obtenu dans les cellules isolées (30%), mais suffisant pour étudier une cellule unique. La stimulation brève à l'isoprénaline induit un signal similaire en l'absence ou en présence de lipofectamine, signal dont la phase d'augmentation ( $t_{\text{max}}$ ) est significativement diminuée par rapport à celle du signal enregistré dans les CMLV isolées, sans modification significative de l'amplitude et de la phase de décroissance (**Figure 3**).



**Figure 3** : Effet des conditions de culture sur le signal AMPc cytosolique induit par une stimulation  $\beta$ -adrénergique, enregistré à l'aide de la sonde Epac2-camps, dans les CML d'aorte de rat.

Les mesures d'AMPc cytosolique ont été effectuées dans des CML d'aorte de rat en culture en réponse à une stimulation brève à l'isoprénaline (Iso 100 nM, 15 secondes) en utilisant la sonde FRET Epac2-camps cytosolique sensible à l'AMPc. **A,B**: Mesures de l'AMPc cytosolique en réponse à l'Iso dans des CMLV isolées et sub-confluentes traitées ou non à la lipofectamine. **A**: Pourcentage moyen d'augmentation du ratio CFP/YFP. **B**: Paramètres cinétiques du signal FRET ( $t_{max}$ ,  $t_{1/2on}$  et  $t_{1/2off}$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM du nombre de cellules (n=15-35). \*P<0.05, \*\*P<0,01.

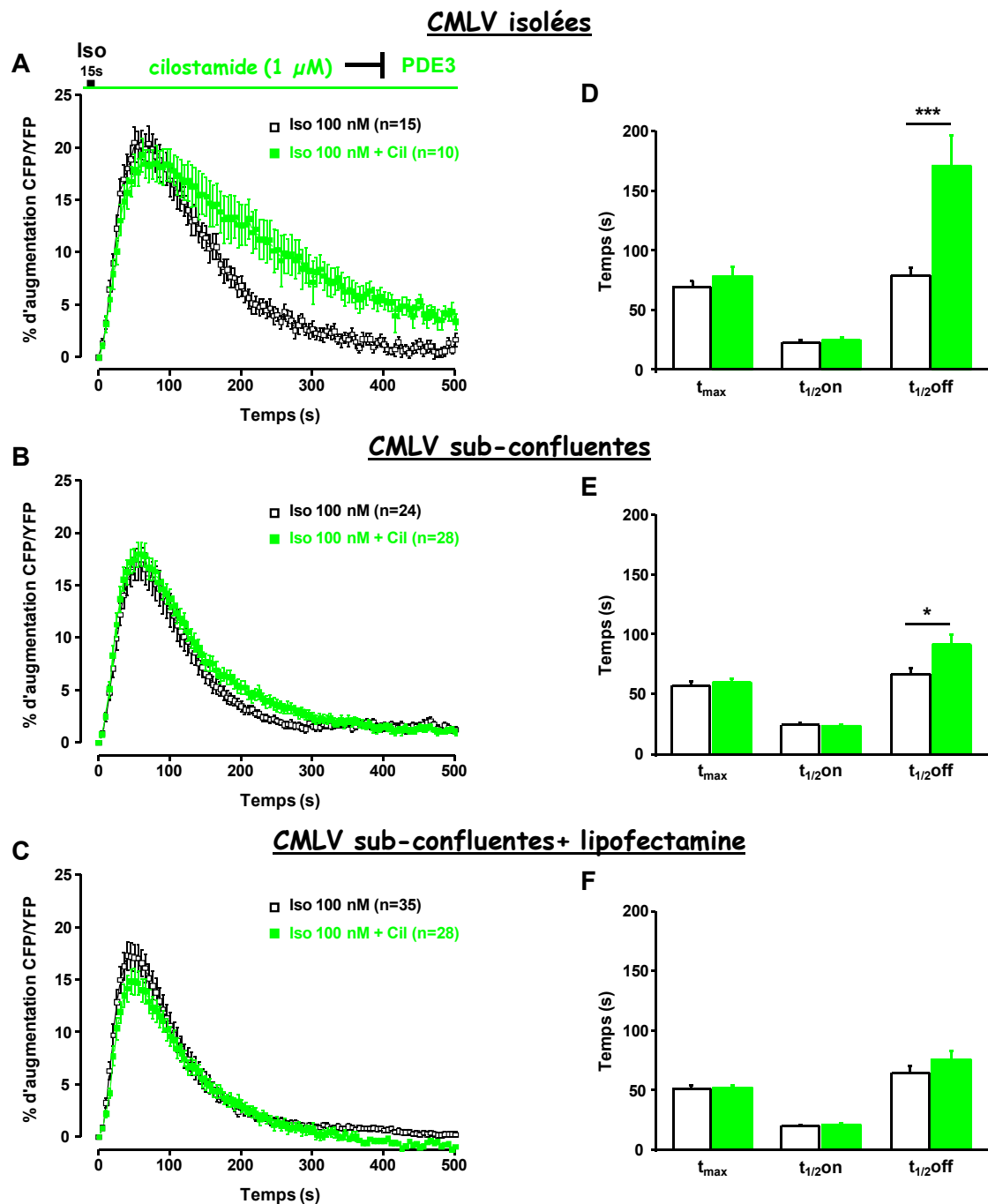
Dans une première série d'expériences, nous avons évalué la contribution du sous-type  $\beta_1$ -adrénergique dans la réponse à l'isoprénaline (100 nM) mesurée à l'aide de la sonde Epac2-camps, dans des CMLV isolées (conditions expérimentales requises pour une infection adénovirale optimale, identiques à celles utilisées lors de l'étude avec la sonde FRET membranaire). Dans ces conditions, le CGP-20712A (100 nM) tend à diminuer (de 29%), mais de manière non significative, l'amplitude de la réponse à l'isoprénaline (**Figure 4**). Pour mémoire, une diminution du signal de 39% était observée avec l'autre sonde cytosolique Epac1-camps, étudiée dans des CMLV sub-confluentes. Ces résultats restent à confirmer mais suggèreraient qu'il existe bien une contribution différentielle du sous-type  $\beta_1$ -adrénergique entre le compartiment cytosolique et le compartiment sous-membranaire, indépendamment de la densité cellulaire et du vecteur d'expression de la sonde FRET.



**Figure 4** : Effet de l'antagoniste des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques sur le signal AMPc cytosolique induit par une stimulation  $\beta$ -adrénergique dans les CML d'aorte de rat.

Les mesures d'AMPc cytosolique ont été effectuées dans des CML d'aorte de rat en culture en réponse à une stimulation brève à l'isoprénaline (Iso 100 nM, 15 sec) en utilisant la sonde FRET Epac2-camps cytosolique sensible à l'AMPc. A,B: Effet de l'antagonistes  $\beta_1$ -AR (100 nM CGP-20712A, CGP) sur la réponse Iso. A: Pourcentage moyen d'augmentation du ratio CFP/YFP. B: Paramètres cinétiques du signal FRET ( $t_{max}$ ,  $t_{1/2on}$  et  $t_{1/2off}$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM du nombre de cellules (n=9-14).

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de la PDE3 (par le Cil 1 $\mu$ M) sur la production d'AMPc cytosolique induite par l'isoprénaline en utilisant la sonde FRET Epac2-camps exprimée dans des CMLV isolées (densité cellulaire similaire à celle des mesures d'AMPc sous-membranaire) ou dans des CMLV sub-confluentes (densité cellulaire similaire à celle des mesures d'AMPc cytosolique avec la sonde Epac1-camps) traitées ou non à la lipofectamine. Les résultats montrent que dans les CMLV isolées, le Cil prolonge la phase de retour au niveau basal du signal AMPc cytosolique induit par l'isoprénaline (+115%, n=10-15 ;  $P < 0,001$ ), sans modifier son amplitude (**Figures 5A et D**). On peut noter que cet effet du Cil, à l'exception de l'impact sur l'amplitude, est comparable à celui observé dans le compartiment sous-membranaire avec la sonde Lyn-Epac2-camps dans des conditions expérimentales similaires. Dans les CMLV sub-confluentes, le Cil ne produit qu'une faible augmentation de la phase de retour du signal (+37%, n=24-28 ;  $P < 0,05$  ; **Figures 5B et E**), qui n'est plus observée lorsque les cellules sont incubées en présence de lipofectamine (**Figures 5C et F**). Cette absence d'effet du Cil sur la réponse à l'isoprénaline s'apparente à celle observée avec la sonde plasmidique Epac1-camps cytosolique dans les CMLV sub-confluentes. Au vu de ces résultats, l'effet du Cil semble dépendre de la densité cellulaire des CMLV (cellules isolées *versus* sub-confluentes).

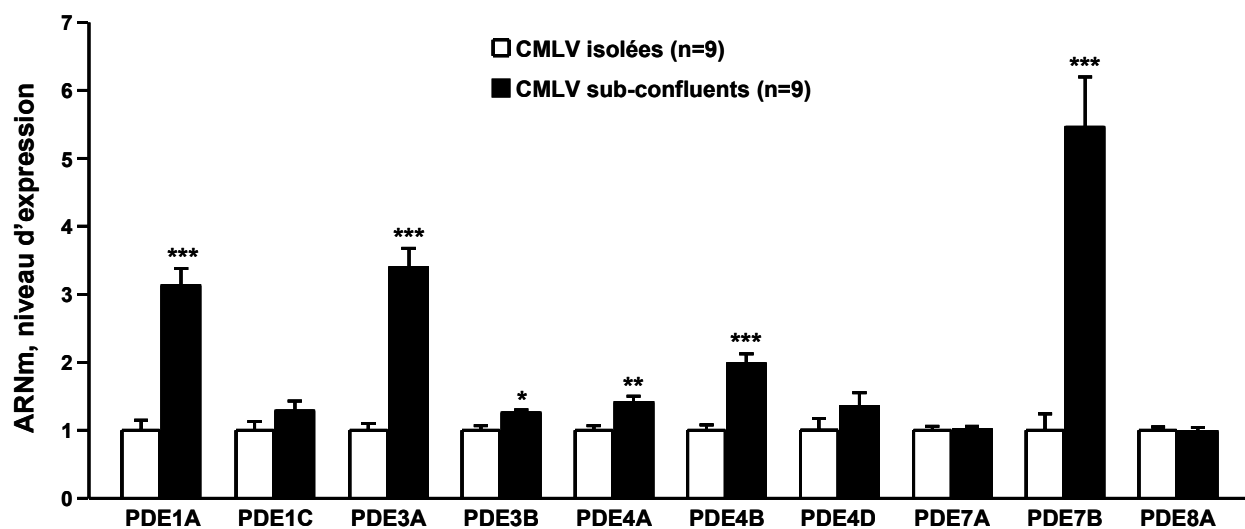


**Figure 5** : Influence des conditions de culture sur l'effet de l'inhibition de PDE3 sur le signal AMPc cytosolique induit par une stimulation  $\beta$ -adrénergique, enregistré à l'aide de la sonde Epac2-camps, dans les CML d'aorte de rat.

Les mesures d'AMPc cytosolique ont été effectuées dans des CML d'aorte de rat en culture en utilisant la sonde FRET Epac2-camps cytosolique sensible à l'AMPc, en réponse à une stimulation brève à l'isoprénaline (Iso 100 nM, 15 sec) en l'absence ou en présence de l'inhibiteur sélectif de PDE3 (Cil 1  $\mu$ M). Mesures de l'AMPc cytosolique en réponse à l'Iso dans des CMLV isolées (A,D) et sub-confluentes traitées (C,F) ou non (B,E) à la lipofectamine. A, B et C: Pourcentage moyen d'augmentation du ratio CFP/YFP. D, E et F: Paramètres cinétiques du signal FRET ( $t_{max}$ ,  $t_{1/2on}$  et  $t_{1/2off}$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM du nombre de cellules (n=10-35). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001.

### II.C.2. Influence des conditions de culture cellulaire sur l'expression des ARNm codant pour les familles de PDE-AMPC dans les CML d'aorte de rat en culture

Afin d'évaluer l'effet des conditions de culture des CMLV sur l'expression des PDEs, nous avons comparé les niveaux d'expression des ARNm codant pour 14 isoformes de PDE-AMPC (PDE1A, 1B, 1C, 2A, 3A, 3B, 4A, 4B, 4C, 4D, 7A, 7B, 8A, 8B) dans les deux types de cultures de CMLV (cellules isolées *versus* sub-confluentes). Les ARNm codant pour les isoformes de PDE 1A, 1C, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 7A, 7B and 8A sont présents dans les CMLV, alors que les produits de PCR pour les isoformes PDE 1B, 2A, 4C et 8B n'ont pas été détectés (Zhai *et al.*, 2012) (**Figure 6**). La **Figure 6** montre que l'expression des ARNm codant pour les PDE 1A, 3A, 3B, 4A, 4B et 7B est significativement augmentée dans les CMLV sub-confluentes par rapport aux cellules isolées. On peut noter une très nette augmentation de l'expression de PDE1A (+213% ;  $P < 0,001$ ) et de PDE3A (+239% ;  $P < 0,001$ ). La forte augmentation de l'expression de PDE7B (+446% ;  $P < 0,001$ ) est à nuancer du fait de sa faible expression dans les CMLV sub-confluentes (Zhai *et al.*, 2012).



**Figure 6 : Influence des conditions de culture sur l'expression des isoformes de PDE-AMPC dans les CML d'aorte de rat.**

Les réactions de RT-PCR quantitatives en temps réel ont été effectuées sur des ARNm isolés à partir des CMLV cultivées à deux densités cellulaires différentes. L'expression de PDE1A, PDE1C, PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4D, PDE7A, PDE7B et PDE8A a été analysée et exprimée de manière relative à la condition «CMLV isolées» normalisée à 1. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  CMLV sub-confluentes *versus* CMLV isolées.

### III. Conclusions

L'objectif général de cette étude était d'évaluer le rôle des familles de PDE-AMPC dans la régulation de la dynamique spatio-temporelle des signaux AMPc dans les CML d'aorte de rat en culture. L'approche d'imagerie de FRET que nous avons mis en place a nécessité l'utilisation de cellules cultivées à des densités différentes (cellules isolées ou sub-confluentes), conditions expérimentales adaptées pour une expression optimale des senseurs de l'AMPC utilisés pour analyser les compartiments cytosolique et sous-membranaire. Or, il s'est avéré que la densité cellulaire des CMLV jouait un rôle important dans la signalisation dépendante des PDE-AMPC. Les principales conclusions de cette étude sont les suivantes:

(1) dans les CMLV en culture, les ARNm codant pour plusieurs isoformes de PDE-AMPC sont présents (PDE 1A, 1C, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 7A, 7B and 8A), alors que ceux codant pour les isoformes PDE 1B, 2A, 4C et 8B n'ont pas été détectés. L'expression de l'ARNm de certaines isoformes de ces PDEs (PDE1A, 3A, 3B, 4A, 4B et 7B) est significativement plus élevée dans les CMLV sub-confluentes par rapport aux cellules isolées.

(2) l'ordre de classement de l'activité d'hydrolyse PDE-AMPC dans les CMLV sub-confluentes est le suivant :  $PDE4 > PDE1 = PDE3$ . L'activité PDE2 est absente. L'activité PDE7 n'a pas été confirmée, en raison de la faible sélectivité de l'inhibiteur de PDE7 utilisé.

(3) dans les CMLV en culture, l'application brève d'isoprénaline, agoniste des récepteurs  $\beta$ -AR (pulse de 15 secondes), induit un signal FRET caractéristique, témoignant d'une augmentation rapide de la concentration d'AMPC, suivie par une décroissance du signal pour revenir à un niveau basal. Ce signal est fortement prolongé en présence de l'inhibiteur non-sélectif des PDE, l'IBMX, ce qui démontre le rôle clé des PDEs dans la modulation des concentrations intracellulaires d'AMPC dans les CMLV d'aorte de rat. L'amplitude ainsi que les paramètres cinétiques du signal FRET induit par l'isoprénaline varie selon les sondes FRET utilisées.

(4) le signal AMPc cytosolique induit par la stimulation  $\beta$ -adrénergique est principalement contrôlé par la PDE4 dans les CMLV sub-confluentes, mais l'inhibition de PDE4 démasque une participation de PDE3 et PDE1 à l'hydrolyse de cet AMPc cytosolique (*étude avec la sonde Epac1-camps*). Cependant, une contribution directe de la PDE3 à l'hydrolyse de l'AMPC cytosolique stimulé par l'isoprénaline est révélée lorsque les CMLV sont isolées



(étude avec la sonde *Epac2-camps*). Ceci montre l'influence prépondérante des conditions de culture dans le rôle fonctionnel des PDEs dans les CMLV.

(5) le signal AMPc sous-membranaire basal et stimulé par l'isoprénaline est régulé conjointement par les PDE3 et PDE4 dans les CMLV isolées (étude avec la sonde *Lyn-Epac2-camps*). Le compartiment sous-membranaire n'a pas été étudié dans des CMLV sub-confluentes.

(6) le signal AMPc, mesuré dans le compartiment sous-membranaire à l'aide de la sonde *Lyn-Epac2-camps*, suite à l'application d'isoprénaline, implique uniquement l'activation des récepteurs  $\beta_2$ -AR dans les CMLV isolées. Au contraire, la réponse à l'isoprénaline dans le compartiment cytosolique implique l'activation des deux sous-types  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -AR dans les CMLV sub-confluentes. Nos résultats préliminaires tendent à suggérer que la contribution du sous-type  $\beta_1$ -AR dans la réponse cytosolique est maintenue dans les CMLV sub-confluentes. Ces derniers résultats doivent être confirmés par des expériences supplémentaires.

La **Table 1** qui suit résume les principales différences observées dans la régulation des signaux AMPc selon la densité des CMLVs.

Densité des CMLVs en culture	Sondes FRET	Effet du Cil	Effet du Ro	Contribution des sous-types de $\beta$ -ARs	Expression ARNm des PDEs
Sub-confluentes	Epac1-camps (plasmide) cytosolique	O	+	$\beta_1$ et $\beta_2$	PDE1 A, C PDE3A, B PDE4 A, B, D
	Epac2-camps (adénovirus) cytosolique	O	ND	ND	PDE7 A, B PDE8 A
Isolées	Epac2-camps (adénovirus) cytosolique	+	ND	$\beta_1$ à confirmer $\beta_2$ : ND	<i>versus</i> CMLVs sub-confluentes ↓↓↓ PDE1A ↓↓↓ PDE3A ↓ PDE3B ↓ PDE4A ↓↓ PDE4B ↓↓↓ PDE7B
	Lyn-Epac2-camps (adénovirus) sous-membranaire	+	+	$\beta_2$	

**Table 1 : Régulation des signaux AMPc selon les conditions de culture des CMLVs.**

O : pas d'effet ; + : effet ; ND : effet non déterminé ; ↓ : amplitude de la diminution

## **Partie II: Rôle des PDE-AMPC dans la réactivité vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque**

### **I. Introduction**

L'IC est un syndrome clinique défini par une diminution de la capacité du cœur à adapter le débit sanguin aux besoins métaboliques conduisant à une perfusion tissulaire insuffisante. Les altérations structurelles et fonctionnelles cardiaques observées dans cette pathologie sont associées à une altération de la voie de signalisation dépendante de l'AMPC et notamment d'une altération des réponses cellulaires médiées par les récepteurs  $\beta$ -AR, impliquant en partie une désorganisation de leur contrôle par les PDE (Yanaka *et al.*, 2003; Lehnart *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2005; Pokreisz *et al.*, 2009; Abi-Gerges *et al.*, 2009). Une des pistes thérapeutiques actuellement à l'étude pour traiter l'IC vise à restaurer la compartimentation spatio-temporelle de la voie de signalisation de l'AMPC, en ciblant directement l'activité d'une isoforme de PDE.

L'IC est également caractérisée par des changements morphologiques et fonctionnels à l'échelle vasculaire, en particulier une augmentation de l'épaisseur de la paroi, une augmentation du tonus vasomoteur au repos et une diminution des réponses vasodilatatrices (Francis & Cohn, 1990; Negrao *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001). Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces altérations vasculaires ne sont pas clairement identifiés. Même si plusieurs études ont rapporté une diminution de la vasorelaxation  $\beta$ -adrénergique dans les artères systémiques et/ou pulmonaires isolées à partir de différents modèles d'animaux IC (Mathew *et al.*, 1993; Nasa *et al.*, 1996; Toyoshima *et al.*, 1998; McGoldrick *et al.*, 2007) dans certains cas liés à une diminution de la densité des récepteurs  $\beta$ -AR (Kiuchi *et al.*, 1993; Gaballa *et al.*, 2001), l'impact de la pathologie sur le rôle fonctionnel des PDE vasculaires n'a pas été évalué. Il a seulement été fait état d'une augmentation de l'activité de PDE3 dans l'aorte isolée d'un modèle d'IC consécutive à une HTA, le rat Dahl traité au sel (Takahashi *et al.*, 2002).

En outre, la dysfonction endothéliale associée au stress oxydatif, caractéristique des maladies cardio-vasculaires, est également observée dans des modèles animaux d'IC ainsi que

chez l'Homme (Katz *et al.*, 1992; Drexler *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 2005; Bauersachs & Widder, 2008). Cette dysfonction peut résulter d'une libération réduite des EDRFs tels que le NO, ou accrue des facteurs contractants (EDCFs). Les EDCFs identifiés dans les processus pathologiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide arachidonique, par l'activation de la cyclo-oxygénase (COX) et la production de prostanoïdes vasoconstricteurs (Delannoy *et al.*, 2010; Feletou *et al.*, 2011). Il a notamment été montré que l'expression de la COX-2 est augmentée dans les cellules endothéliales veineuses de patients atteints d'IC (Colombo *et al.*, 2005) et dans l'aorte d'un modèle murin d'IC (Miller *et al.*, 2010).

Les objectifs de notre étude sont de caractériser le rôle des principales familles de PDE-AMPC vasculaires dans la régulation du tonus vasculaire basal ainsi que dans la réponse relaxante induite par la stimulation  $\beta$ -adrénergique et d'évaluer l'impact de l'IC sur ces fonctions. Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'IC provoquée chez le rat par surcharge chronique de pression. Etant données les différences de réactivité vasculaire (notamment dans la nature des réponses relaxantes  $\beta$ -adrénergiques et la nature des facteurs endothéliaux relaxants) entre les artères de conductance et les artères de résistance, notre étude a porté sur deux types d'artères, l'aorte thoracique et l'artère mésentérique, respectivement. Dans un premier temps, nous avons vérifié que notre modèle pathologique était associé à des altérations de la capacité contractile vasculaire. Dans un deuxième temps, le rôle fonctionnel des PDE-AMPC a été évalué par une approche pharmacologique, à l'aide d'inhibiteurs sélectifs des 4 familles principales de PDE-AMPC vasculaires (PDE 1 à 4). Cette étude de réactivité vasculaire a l'avantage de conserver l'intégrité du vaisseau, et notamment le contrôle de la CML par l'endothélium. Aussi, la contribution des facteurs endothéliaux (dépendants de la NOS et de la COX) dans ces réponses a été évaluée.

## **II. Résultats**

### **II.A. Altération de la fonction vasculaire de l'aorte au cours de l'IC : rôle des PDEs de type 3 et 4**

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article suivant :

**Vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases type 3 and 4.**

**Fabien Hubert**, Kui Zhai, Valérie Domergue-Dupont, Philippe Mateo, Frédéric Joubert, Rodolphe Fischmeister, Véronique Leblais

*Article en cours de soumission*

## **Vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases type 3 and 4**

**Fabien Hubert**<sup>1,2</sup>, Kui Zhai<sup>1,2,3</sup>, Valérie Domergue-Dupont<sup>2,4</sup>, Philippe Mateo<sup>1,2</sup>, Frédéric Joubert<sup>1,2</sup>, Rodolphe Fischmeister<sup>1,2</sup>, Véronique Leblais<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR-S 769, LabEx LERMIT, F-92296 Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup>Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, F-92296 Châtenay-Malabry, France

<sup>3</sup>National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

<sup>4</sup>IPSIT/IFR141, Plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle », F-92296 Châtenay-Malabry, France

## Introduction

In the vascular system, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is a key physiological second messenger, which inhibits the contraction, the proliferation and the migration of the smooth muscle cells (SMCs). Intracellular concentration of cAMP is determined by the balance of its production by adenylyl cyclase (AC) and its degradation by specific enzymes, the 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs).

Stimulation of  $\beta$ -adrenoceptors ( $\beta$ -ARs), which are typically coupled to the AC/cAMP pathway, causes vasodilation through protein kinase-dependent mechanisms [1]. The contribution of the endothelium to this  $\beta$ -adrenergic response partly depends on the  $\beta$ -AR subtype, the vascular bed and the precontracting agent. In rat aorta precontracted by noradrenaline, isoproterenol-induced relaxation was proposed to be elicited by an endothelial  $\beta$ -AR which induces the production of nitric oxide (NO) responsible for the accumulation of the vasorelaxant second messenger, 3'-5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP), in the SMC [2]. However, another study did not support an obligatory role for the endothelium in this isoproterenol-induced relaxation [3]. Thus, the contribution of the endothelium to the  $\beta$ -adrenergic relaxant response remains controversial.

The cAMP-mediated relaxation can be blunted by its degradation under the action of PDEs. PDEs comprise a large group of more than 50 isoenzymes that are classified into 11 families (PDEs 1 to 11). It is usually admitted that blood vessels express four dominant cAMP-PDE families, with a pattern of activity depending on the species, the vascular bed and the phenotype of the cell [4]. These PDEs are the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-stimulated PDE1, the cGMP-stimulated PDE2, the cGMP-inhibited PDE3 and the cAMP-specific PDE4 [4-9]. Of these, the cAMP-hydrolysing activity in vascular SMC and endothelial cells was mainly due to PDE3 and PDE4 activities [4,6]. In precontracted rat aorta, both PDE3 and PDE4 inhibitors induced a vasorelaxation which was either endothelium-independent or endothelium-dependent, respectively [10,11]. In rat endothelium-denuded aorta, PDE3 inhibition potentiates both the increase in intracellular cAMP level and the cAMP-dependent vasorelaxation elicited by  $\beta$ -adrenergic stimulation, whereas PDE4 inhibition only potentiates the former without modifying the latter response. The lack of correlation between the cAMP concentration and the functional response during PDE inhibition suggests the presence of distinct intracellular cAMP pools in vascular SMCs controlled by different PDE isoforms [12].

Heart failure (HF) is a clinical syndrome related to a decreased ability of the heart to provide sufficient cardiac output and resulting in inadequate tissue perfusion. HF is also characterized by vascular morphological and functional changes, in particular an increase in vessel wall thickness, an increase in the vasomotor tone at rest and a decrease in vasodilator endothelium-dependent and -independent responses [13-15]. Declined peripheral vasodilatation causes higher systemic vascular resistance which is thought, initially, to serve as a compensatory mechanism to help maintain perfusion to the vital organs by sustaining blood pressure in the failing heart. However, in the long-term, the raise in pre- and after-load leads to deleterious effects by increasing the cardiac workload that further exacerbates cardiac dysfunction [16]. The pathophysiological mechanisms underlying the vascular alterations existing in HF are not clearly identified.

Numerous studies have reported down-regulation of the cardiac  $\beta$ -AR signaling pathway in HF [17-20]. More recently, alterations of the expression, distribution or activity of cardiac PDEs were also shown to be involved in cardiac hypertrophy [21,22] and HF [23-25]. Less attention was paid on the vascular system. Most of studies reported a decrease in the  $\beta$ -AR-mediated vasorelaxation in systemic and/or pulmonary arteries isolated from different models of HF animals [26-29], which was in some cases related to a decrease in  $\beta$ -AR density [30,31]. It was also reported an enhanced PDE3 activity in the rat aorta isolated from a model of salt-induced hypertension and HF [32]. However, the impact of HF disease on the functional role of vascular PDEs has been poorly evaluated.

Additionally, endothelial dysfunction associated with an oxidative stress, which is an hallmark of cardiovascular diseases, is also observed in animal models of HF as well as in humans [33-36]. This dysfunction may result from impaired release of endothelium-derived relaxing factors such as NO or increased release of endothelium-derived contracting factors (EDCFs). Pathological EDCFs, initially identified in hypertension and then in diabetes, aging or pulmonary hypertension, are mainly derived from the metabolism of arachidonic acid, through activation of cyclooxygenase (COX) and production of vasoconstrictor prostanoids [37,38]. Previous work has shown that in humans and dogs with chronic HF, vascular function can be improved by inhibition of COX, suggesting a role for an EDCF in the endothelial dysfunction observed in HF [39,40]. Accordingly, the expression of COX2 protein or COX2 mRNA was shown to be increased in venous endothelial cells from patients with HF [41] and in aorta from a mouse model of HF [42], respectively.



The aims of this study were to characterize the role of the main vascular cAMP-PDE families in the regulation of the basal vascular tone as well as in the relaxant response to  $\beta$ -AR stimulation and to evaluate the impact of HF disease on these functions. In this context, the contribution of the endothelium and related factors (NO synthase- and COX-derived) will be taken into consideration.

## **Materials and Methods**

All experiments performed conform to the European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J no. L358, December 18, 1986), the local ethics committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines, and the French decree no. 97-848 of October 19, 1987 (J Off République Française, October 20, 1987, pp 12245-12248). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (no. 92-283, June 27, 2007).

### **Pharmacological agents**

Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>; dinoprost tromethamine, Dinoprost<sup>®</sup>) was obtained from Pfizer (Paris, France). Carbamylcholine chloride (carbachol), indomethacin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), (-)-isoproterenol hydrochloride, Nω-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) and phentolamine hydrochloride were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin, Fallavier, France). Cilostamide (Cil) was from Tocris Bioscience (Bristol, UK), 8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthine (MIMX) and Ro-20-1724 (Ro) from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK), and BAY-60-7550 (BAY) from Cayman Chemical (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France). When pharmacological inhibitors were dissolved in non water vehicle, control experiments were performed in the presence of equivalent concentration of vehicle.

### **Surgical procedure**

Experiments were performed on a total of 91 male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, France). The surgical procedure was carried out on 3-week-old rats (weighing <60g), under anaesthesia with pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p.). Aortic stenosis was induced by placing a stainless steel hemoclip of 0.6 mm-internal diameter on the ascending aorta via thoracic incision, as previously described[43]. Age-matched control animals (SHAM-operated) underwent the same procedure without placement of the clip. 22 weeks after surgery, 19 rats underwent echocardiographic studies to assess cardiac dysfunction in the stenosis group. All other rats were sacrificed for sampling the aorta.

### **Echocardiography**

Echocardiography was performed at 21 weeks after surgery on 10 SHAM-operated and 9

stenosed rats using a 12 MHz transducer (Vivid 7, General Electric Healthcare) under 2.5% isoflurane gas anesthesia. Two-dimensional-guided (2D) M-mode echocardiography was used to determine wall thickness and left ventricular chamber diameter at systole and diastole, and contractile parameters such as fractional shortening (FS). Left ventricular mass (LVM) was calculated according to the Penn formula home-adapted for the rat heart:  $(LVM = 1.04 \times [(Dtd + SIV + PP)^3 - (Dtd)^3])$  [44].

### **Rat aorta sampling**

22 weeks after surgery, rats were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p.). The thoracic aorta was rapidly isolated, placed in ice-cold physiological salt solution [PSS containing (mmol/l): NaCl 119, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.17, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, glucose 11, NaHCO<sub>3</sub> 25] to be cleaned of adventitial tissue and cut into 2 mm length rings for subsequent experiments. In some preparations, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface of the vessel with fine forceps. Heart, lungs and liver were removed and weighed. The right tibia was isolated and its length was measured using a vernier caliper.

### **Vascular reactivity measurement**

Aortic rings were mounted onto hooks in standard organ bath chambers filled with 5 ml of PSS maintained at 37°C and aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4).. Vessels were passively stretched to their optimal resting force (2 g) and equilibrated for 60 min. At the beginning of each experiment, vessel integrity was evaluated by its contractile response to a 60 mM KCl depolarizing solution (PSS containing 60 mM KCl by equimolar substitution with NaCl). Rings developing a contraction below 1.5 g were discarded. Endothelial functionality was assessed by the relaxant response to carbachol (10 µM) on 60 mM KCl-precontacted rings. The amplitude of relaxation was > 20% and 10 % in intact arteries isolated from SHAM and HF rats, respectively, and abolished in endothelium-denuded rings. Following assessment of tissue integrity, the rings were equilibrated for 60 min in PSS, and then two different protocols were carried out.

In the first set of experiments, concentration-response curves to increasing concentrations of the vasoconstrictor agent PGF<sub>2α</sub> (1 nM to 30 µM) were performed in arteries pretreated in the absence or presence of a selective PDE inhibitor (1 µM Cil for PDE3 or 10 µM Ro for PDE4) for 10 min.

In the second set of experiments, aortic rings were submaximally precontracted with a concentration of PGF<sub>2α</sub> inducing 80% of its contractile response to the 60 mM

KCl-depolarizing solution. When the contractile response reached a steady state (after ~25 min), concentration-response curves to increasing concentrations of a vasorelaxant drug were established with the muscarinic agonist carbachol (1 nM to 10  $\mu$ M), the selective PDE inhibitors [Cil for PDE3 (1 nM to 30  $\mu$ M) or Ro for PDE4 (1 nM to 30  $\mu$ M)] or the  $\beta$ -adrenoceptor agonist isoproterenol (10 pM to 30  $\mu$ M) in the presence of the  $\alpha$ -adrenoceptor antagonist (10  $\mu$ M phentolamine) to avoid possible influence of  $\alpha$ -adrenoceptors[45]. In some cases, these experiments were performed in arteries pretreated in the absence or presence of the following pharmacological inhibitors: the PDE3 inhibitor (1  $\mu$ M Cil for 10 min), the PDE4 inhibitor (10  $\mu$ M Ro for 10 min), the NOS inhibitor (300  $\mu$ M L-NAME for 15 min) and the COX inhibitor (10  $\mu$ M indomethacin for 30 min).

Contractile responses were expressed in grams as a difference from baseline tone. Vasorelaxant responses were expressed as the percentage of the precontraction evoked by  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

### **Cyclic AMP-PDE activity assay**

Cyclic AMP-PDE activity was measured according to a modification of the two-step assay procedure method described by Thompson and Appleman[46]. Aorta rings were homogenized using a tissue homogenizer (Bertin Technologies) in ice-cold lysis buffer [containing: NaCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, glycerol 10%, NP40 0.5% and microcystin 1  $\mu$ M] and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid protein assay, according to the manufacturer's protocol (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France). Samples (4  $\mu$ g of proteins) were assayed in a reaction mixture of 200  $\mu$ L containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1  $\mu$ M cAMP, and  $10^5$  cpm of [ $^3\text{H}$ ]-cAMP for 25 min at 33°C. The reaction was ended by heat inactivation in a boiling water bath for 1 min. The PDE reaction product 5'-AMP was then hydrolyzed by incubation of the assay mixture with 50  $\mu$ g of *Crotalus atrox* snake venom for 20 min at 33°C, and the resulting adenosine was separated by anion exchange chromatography using 2 mL of AG1-X8 resin (BioRad, Hercules, CA, USA) and quantified by scintillation counting. To evaluate cAMP-PDE isoform-specific activities, the assay was performed in the absence or presence of PDE inhibitors: 10  $\mu$ M MIMX for PDE1, 100 nM BAY for PDE2, 1  $\mu$ M Cil for PDE3, 10  $\mu$ M Ro for PDE4 or 100  $\mu$ M IBMX as a non-selective PDE inhibitor. The residual hydrolytic activity observed in the presence of PDE inhibitors was expressed as a percentage of the total cAMP-PDE activity, corresponding to the

cAMP-PDE activity in the absence of inhibitor (vehicle condition).

### **Data and statistical analysis**

EC<sub>50</sub> value (concentration that produces 50% of the maximum response) was estimated, when relevant, in each individual concentration-response curve using the Boltzman equation fit (Origin 6 software) and converted to negative logarithm value (pD<sub>2</sub>).

All data are expressed as mean ± SEM, where “n” represents the number of rats, except for Fig. 2 where “n” represents the number of vessels.

Differences between concentration-response curves were analysed using a two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA). Different parameters were compared using Student's *t*-test. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### Anatomic and echocardiographic parameters

22 weeks after surgery, stenosed rats exhibited a decreased body weight and an increase in heart and lungs weight normalized to the tibia length, compared to age-matched SHAM-operated animals (Table 1). Signs of congestive HF (i.e. ascites, pleural effusions and oedema) were also observed in these stenosed rats. Finally, echocardiographic analysis showed an increase in left ventricular mass by 80% ( $P < 0.01$ ) and a decrease in fractional shortening from  $48.5 \pm 2.3\%$  ( $n=10$ ) to  $24.4 \pm 2.7\%$  ( $n=9$ ) ( $P < 0.001$ ) after stenosis (Table 1). Overall, these anatomical and echocardiographic parameters provide evidence for the presence of left ventricular hypertrophy associated with major cardiac dysfunction in stenosed rats confirming the occurrence of severe HF in this model of chronic pressure overload.

### cAMP-PDE activity in aorta from SHAM and HF rats

cAMP-PDE activity was measured in lysates of intact or endothelium-denuded aorta rings isolated from SHAM and HF rats. Total cAMP-PDE activity was similar in these 4 groups of aortas (Fig. 1A).

To determine which PDE isoforms contribute to this total cAMP hydrolyzing activity, the assay was also conducted in the presence of different PDE inhibitors (Fig. 2B). In intact aorta isolated from SHAM rats, the total cAMP-PDE activity was weakly decreased by the PDE1 inhibitor (10  $\mu$ M MIMX; reduction by 9%)[47] but not modified by the PDE2 inhibitor (100 nM BAY) [48], suggesting the absence of PDE2 activity. Both PDE3 (1  $\mu$ M Cil)[49] and PDE4 (10  $\mu$ M Ro)[47] inhibitors significantly reduced the cAMP hydrolyzing activity by 48% and 28%, respectively. Finally, the broad-spectrum PDE inhibitor IBMX (1 mM)[47] almost abolished the total cAMP-PDE activity. This suggests that the rank order of PDE isoforms contributing to the global cAMP-PDE activity in SHAM aortas was PDE3 > PDE4 >> PDE1. Endothelium removal of SHAM aortas did not affect this pattern of cAMP hydrolyzing activities. Aortas isolated from HF rats exhibited similar cAMP-PDE isoforms activities compared to aortas isolated from SHAM rats. Overall, endothelium removal had no effect in HF aortas, except that it significantly lowered the decrease in cAMP-PDE activity elicited by the addition of the PDE4 inhibitor Ro. This indicates that in aortas isolated from HF rats, the PDE4 activity is reduced in the absence of functional endothelium.

### **Vascular function in aortas isolated from SHAM and HF**

We first explored the contractile capacity of aortas in response to two different contractile stimuli, a 60 mM KCl depolarizing solution and  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , a vasoconstrictor agent acting through stimulation of a prostanoid receptor. The contractile response induced by the 60 mM KCl depolarizing solution in intact aortic rings was significantly higher in HF than SHAM animals ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2A). Endothelium removal increased this response in both groups, by 18.5% in SHAM ( $n=56-43$ ,  $P < 0.001$ ) and 10.5% in HF ( $n=49-43$ ,  $P < 0.01$ ). The concentration-response curve to  $\text{PGF}_{2\alpha}$  was significantly shifted to the left in intact aorta removed from HF rats compared to that removed from SHAM rats, without modification of the maximum response (Fig. 2B). The  $\text{pD}_2$  value increased from  $5.6 \pm 0.1$  ( $n=28$ ) in SHAM to  $6.0 \pm 0.1$  ( $n=18$ ) in HF aortas ( $P < 0.001$ ). Endothelium removal caused a significant leftward shift of the concentration-response curve to  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in aortas from SHAM rats ( $\text{pD}_2 = 6.0 \pm 0.1$ ,  $n=26$ ;  $P < 0.001$ ) without any change in the maximum response (Fig 2B). In HF rat aortas, the curves were not significantly different in the presence or absence of a functional endothelium, although the  $\text{pD}_2$  value was weakly increased to  $6.2 \pm 0.1$  after endothelium removal ( $n=18$ ;  $P < 0.01$ ) (Fig. 2B).

In a second set of experiments, the endothelium-dependent relaxation was evaluated with the reference agent carbachol. In  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted aortic rings, endothelium-dependent relaxation elicited by carbachol was severely impaired in aortas from HF compared with those of SHAM rats (Fig. 2C). The maximum relaxation decreased from  $59.0 \pm 2.8\%$  ( $n=20$ ) in SHAM to  $42.3 \pm 2.3\%$  ( $n=20$ ) in HF aortas ( $P < 0.001$ ), and the  $\text{pD}_2$  value from  $7.0 \pm 0.1$  ( $n=20$ ) in SHAM to  $6.1 \pm 0.1$  ( $n=20$ ) in HF aortas ( $P < 0.001$ ), respectively.

These results provide evidence that aortas isolated from HF rats exhibit signs of vascular dysfunction, with hyper-reactivity to contractile agents and endothelial dysfunction.

### **Effect of pretreatment with PDE3 and PDE4 inhibitors on the contractile response to $\text{PGF}_{2\alpha}$ in aortas isolated from SHAM and HF**

In intact arteries isolated from SHAM and HF rats, the pretreatment in the presence of the PDE3 inhibitor, 1  $\mu\text{M}$  Cil, similarly shifted to the right the contractile response curves to  $\text{PGF}_{2\alpha}$  compared to their respective control (Fig. 3A and B). The  $\text{pD}_2$  values decreased from  $5.6 \pm 0.1$  ( $n=4$ ) to  $5.2 \pm 0.1$  ( $n=7$ ) in SHAM group ( $P < 0.05$ ) and from  $6.2 \pm 0.1$  ( $n=5$ ) to  $5.8 \pm 0.1$  ( $n=5$ ) in HF group ( $P < 0.05$ ), in the presence of Cil, without modification of the maximum contraction. The inhibitory effect of Cil on the  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced contraction was preserved in endothelium-denuded rings from both groups (Fig. 3A and B). The  $\text{pD}_2$  values decreased from

6.0 ± 0.1 (n=5) to 5.5 ± 0.1 (n=7) in SHAM endothelium-denuded group ( $P<0.01$ ) and from 6.4 ± 0.1 (n=5) to 5.8 ± 0.1 (n=5) in HF endothelium-denuded group ( $P<0.01$ ), in the presence of Cil, without modification of the maximum contraction. These data indicate that PDE3 inhibition similarly decreases the sensitivity to PGF<sub>2α</sub> in aortas from SHAM and HF rats, independently of the presence of a functional endothelium.

In intact aortic rings isolated from SHAM rats, incubation with the PDE4 inhibitor, 10 μM Ro, decreased the contractile response to the maximum tested concentration of PGF<sub>2α</sub> (30 μM) by 19.5 ± 4.9% (n=6,  $P<0.05$ ) and reduced its pD<sub>2</sub> value to 5.3 ± 0.1 (n=6,  $P<0.01$ ) (Fig. 3C). In the endothelium-denuded arteries, the effect of Ro was abolished (Fig. 3C). In aortic rings isolated from HF rats, Ro treatment did not alter the contractile response to PGF<sub>2α</sub>, either in the presence or absence of a functional endothelium (Fig. 3D). These results suggest that PDE4 inhibition impairs the sensitivity to PGF<sub>2α</sub> only in SHAM aortas and in an endothelium-dependent manner.

### **Effect of PDE3 and PDE4 inhibitors in precontracted aortas isolated from SHAM and HF**

In this set of experiments, concentration-response curves to Cil, the PDE3 inhibitor, and Ro, the PDE4 inhibitor, were performed in rat aorta submaximally pre-contracted with PGF<sub>2α</sub> to ~80% of its response to the 60 mM KCl depolarizing solution. To explore the role of the endothelium and of related NOS- and COX-dependent factors in these responses, experiments were also performed in endothelium-denuded rings and in intact arteries pretreated by the NOS inhibitor (300 μM L-NAME) or the COX inhibitor (10 μM indomethacin), respectively. In aortas isolated from SHAM rats, Cil induced a concentration-dependent relaxation, which was increased to a similar extent after endothelium removal and in intact arteries pretreated in the presence of L-NAME (Fig. 4A). By contrast, the treatment in the presence of indomethacin did not affect the relaxant response to Cil (Fig. 4A). This indicates that in SHAM aortas, endothelial NO exerts an inhibitory control of PDE3 activity. In aortas isolated from HF rats, Cil induced a similar relaxation to that observed in SHAM rats [relaxation at the maximum tested concentration of Cil (30 μM): 54.6 ± 7.2% (n=13) and 46.7 ± 4.9% (n=13), respectively; not significant] (Fig. 4B). In HF aortas, the relaxation elicited by Cil was markedly potentiated after endothelium removal and to a lower extent after pretreatment in the presence of L-NAME (Fig. 4B). This suggested that in addition to NO, other endothelium-dependent factors contributed to inhibit the relaxant effect of Cil in aortas from HF rats. Indeed, the Cil-induced relaxant response was improved by indomethacin in intact (Fig. 4B)



but not in endothelium-denuded (Fig. 4C) aortas isolated from HF rats. Furthermore, in the presence of both L-NAME and indomethacin, the relaxant response to Cil was similar to that observed in endothelium-denuded arteries (Fig. 4C). This indicates that in HF aortas, both NOS- and COX-dependent endothelial factors exert an inhibitory control of PDE3 activity.

In PGF<sub>2α</sub>-precontracted aortic rings isolated from SHAM rats, increasing concentrations of Ro produced a concentration-dependent relaxation, which was not affected by indomethacin but abolished by L-NAME or removal of the endothelium (Fig. 5A). This indicates that the relaxant effect induced by PDE4 inhibition requires a functional endothelium and NO. In HF aortas, Ro did not modify the precontractile tone in control conditions or after incubation with L-NAME or indomethacin (Fig. 5B). The absence of relaxant effect of Ro in HF animals might be related to the endothelial dysfunction observed in these arteries.

We then evaluated the effect of a pretreatment of arteries with the PDE3 inhibitor Cil (1 μM for 10 min prior to PGF<sub>2α</sub> application) on the relaxant response to the PDE4 inhibitor. As shown in Fig. 5C, the pretreatment with Cil significantly enhanced the Ro-induced relaxation in SHAM endothelium intact aortic rings, and restored a relaxation in endothelium-denuded arteries to a similar extent to that observed in intact ones [relaxation at the maximum tested concentration of Ro (30 μM): 72.8 ± 2.8% (n=8) and 69.1 ± 3.6% (n=5), respectively; not significant]. In HF rats, Cil pretreatment restored a strong relaxant response to Ro in both endothelium-intact and -denuded aortas [relaxation at the maximum tested concentration of Ro (30 μM): 90.5 ± 1.4% (n=8) and 90.1 ± 1.4% (n=9), respectively; not significant] (Fig. 5D). These results indicate that PDE4 function is under the negative control of PDE3. In HF aortas, PDE3 activity masks PDE4 function.

### **β-adrenergic vasorelaxant response in aortas isolated from SHAM and HF**

In endothelium-intact aortas isolated from SHAM rats and precontracted with PGF<sub>2α</sub>, the non-selective β-AR agonist isoprenaline produced a concentration-dependent vasorelaxation, which was characterized by a pD<sub>2</sub> value of 7.5 ± 0.2 (n=13) and a maximum relaxation of 31.1 ± 3.2% (Fig. 6A). This relaxant response to isoprenaline was abolished in the presence of L-NAME or after endothelium removal (Fig. 6A). By contrast, pretreatment of aortas with indomethacin slightly increased the effect of isoprenaline by increasing its maximum relaxation to 47.5 ± 6.2% (n=13; *P*<0.05) without modifying its pD<sub>2</sub> value. In the presence of both L-NAME and indomethacin, the relaxation induced by isoprenaline was similar to that observed in untreated arteries (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, in aortas isolated from HF rats, the relaxant effect of isoprenaline was absent even in endothelium-intact arteries, and weakly

restored only in the presence of indomethacin [maximum relaxation of  $17.7 \pm 6.9\%$  (n=5)]. Altogether, these data indicate that the aortic  $\beta$ -adrenergic relaxation requires a functional endothelial NO pathway and is negatively controlled by COX-dependent factor(s). The loss of  $\beta$ -adrenergic relaxation observed in aortas isolated from HF rats might be related to their endothelial dysfunction.

### **Role of PDE3 and PDE4 in the $\beta$ -adrenergic vasorelaxant response in aortas isolated from SHAM and HF**

The effect of PDE3 and PDE4 inhibition on the  $\beta$ -adrenergic vasorelaxation was evaluated in arteries pretreated in the presence of the PDE3 inhibitor (1  $\mu$ M Cil) or the PDE4 inhibitor (10  $\mu$ M Ro), respectively, prior to the contraction with  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

As shown in Fig. 7A, Cil treatment slightly increased the maximum relaxation induced by isoprenaline in endothelium-intact aortas isolated from SHAM rats [maximum relaxation:  $47.4 \pm 5.0\%$  (n=10) in the presence of Cil compared to  $31.1 \pm 3.2\%$  (n=13) in the absence of Cil;  $P < 0.05$ ]. In aortas incubated with indomethacin, PDE3 inhibition also potentiated the isoprenaline-induced vasorelaxation, with a similar potency to that elicited in indomethacin-free rings. The maximum relaxation of isoprenaline was increased with Cil by 16% and 15% in the absence and presence of indomethacin, respectively. In aortas removed from HF rats, Cil treatment restored a strong relaxation to isoprenaline (Fig. 7B), which was similar to that observed in SHAM rats arteries in the presence of Cil [maximum relaxation:  $39.2 \pm 5.2\%$  (n=14) and  $47.4 \pm 5.0\%$  (n=10), in HF and SHAM aortas, respectively]. As in SHAM group, indomethacin potentiated the isoprenaline response to a similar extent in either the absence or presence of Cil (Fig. 7B). In endothelium-denuded aortas, incubation with Cil restored a relaxation to isoprenaline in both SHAM and HF groups (Fig. 7C and D). This relaxation elicited by isoprenaline in the presence of Cil was markedly enhanced by indomethacin in endothelium-denuded SHAM aortas, but unaffected by the COX inhibitor in HF ones (Fig. 7C and D). These results indicate that the aortic  $\beta$ -adrenergic relaxation is negatively controlled by PDE3 activity in addition to a COX-dependent factor. In HF aortas, the loss of  $\beta$ -adrenergic relaxation is unmasked by PDE3 and COX inhibition.

We then explored the contribution of PDE4 in the  $\beta$ -adrenergic vasorelaxation. As shown in Fig. 8A, Ro treatment significantly increased the relaxation induced by isoprenaline in SHAM endothelium-intact aortas to a similar extent to that observed in the presence of indomethacin. Ro and indomethacin exerted additive potentiating effects in these arteries (Fig. 8A). In intact

aortas from HF rats, Ro treatment restored a small relaxant response to isoprenaline, which was similar to that evoked in the presence of indomethacin (Fig. 8B), but lower than that observed in SHAM condition ( $P < 0.001$ ). As in SHAM group, Ro and indomethacin treatments induced additive potentiating effects in HF aortas (Fig. 8B). By contrast, neither Ro nor Ro+indomethacin treatments restored the isoprenaline-induced relaxation that was impaired by endothelium removal in both SHAM and HF groups (Fig. 8C and D). These results indicate that the aortic  $\beta$ -adrenergic relaxation is also negatively controlled by PDE4 activity in addition to a COX-dependent factor. PDE4 activity is largely dependent from the endothelium functionality. In HF aortas, the loss of  $\beta$ -adrenergic relaxation is unmasked by PDE4 inhibition albeit to a lower extent than with PDE3 inhibition.

## Discussion

The main results of this study are: (1) Both PDE3 and PDE4 control the basal and the  $\beta$ -AR stimulated cAMP concentration in rat aorta. (2) PDE3 does not require a functional endothelium but endothelial NO exerts an inhibitory effect on its activity. By contrast, PDE4 requires a functional endothelium and is under the negative control of PDE3. (3) In HF, PDE3 function is preserved and negatively controlled by NOS- and COX-dependent endothelial factors. PDE4 function is masked by PDE3. (4) In the absence of functional endothelium (SHAM-denuded or HF), the  $\beta$ -AR relaxation is abolished and restored by PDE3 inhibition.

We measured the activity of the main vascular cAMP-PDE families in aortas of both SHAM and HF groups of rats, in the presence or absence of endothelium. By using selective pharmacological inhibitors, we observed that the most important cAMP-PDE was PDE3, a cGMP-inhibited cAMP PDE, accounted for around 50% of total cAMP hydrolyzing activity, whereas PDE4 accounted for 30%. PDE1 activity contributed to approximately 10% of the total activity and PDE2 activity was not detected. The addition of these individual PDE activities is equal to IBMX-sensitive fraction which represents about 90% of the total cAMP-PDE activity. The rank order of cAMP-PDE activity in SHAM rat aorta, PDE3 > PDE4 >> PDE1, is in agreement with the biochemical PDE activity pattern described above in the vasculature [4-6,8,9]. Endothelium removal of SHAM aortas did not affect this pattern of cAMP hydrolyzing activities. Aortas isolated from HF rats exhibited similar cAMP-PDE isoforms activities compared to aortas isolated from SHAM rats. Overall, endothelium removal had not effect in HF aortas, except that it significantly lowered the decrease in cAMP-PDE activity elicited by the addition of the PDE4 inhibitor Ro. This indicates that in aortas isolated from HF rats, PDE4 activity is reduced in absence of functional endothelium.

HF is characterized by vascular morphological and functional changes, in particular an increase in vessel wall thickness, an increase in the vasomotor tone at rest and a decrease in vasodilator endothelium-dependent and -independent responses [13-15]. Our results provide evidence that aortas isolated from our rat model of HF exhibit signs of vascular dysfunction, with hyper-reactivity to contractile agents and endothelial dysfunction.

In the second part of the work, we analyzed the functional contribution of major cAMP-PDEs, PDE3 and PDE4, in controlling basal vascular tone and in  $\beta$ -AR-stimulated relaxant response. Our results reveal that, in SHAM intact aorta, PDE3 and PDE4 controlled the basal vascular tone similarly. While PDE4 activity was not different between intact and

endothelium-denuded SHAM aortas, PDE4 function in controlling vascular tone requires a functional endothelium. In HF rat aorta, in presence or in absence of functional endothelium, PDE4 was not involved in controlling vascular tone while PDE3 function was similar to that observed in SHAM rats.

This alteration of PDE4 function in HF aortas might be related to the endothelial dysfunction observed in these arteries and was similar to the effect observed in endothelium-denuded SHAM aortas. Study from Komasa *et al.*, support the hypothesis that cGMP enhances cAMP-mediated relaxation, possibly through the inhibition of the cyclic GMP-inhibited PDE3 [10]. Indeed, in our study, pretreatment with Cil significantly increases the relaxation induced by PDE4 inhibition in intact aortas from SHAM rats and restores relaxation in SHAM endothelium-denuded arteries. In HF rats, Cil restores a significant relaxant response to PDE4 inhibition in both intact and endothelium-denuded aortas. These results indicate that PDE4 function is under the negative control of PDE3 and in HF aortas, PDE3 activity masks PDE4 function

We observed that PDE3 inhibition reduced sensitivity to  $\text{PGF}_{2\alpha}$  and induced relaxation similarly in aortas from SHAM and HF rats, independently of the presence of a functional endothelium. However, endothelium removal enhanced PDE3 inhibition induced relaxation in both groups of rats. These data indicate that endothelial factors exert an inhibitory effect on PDE3 activity. To explore the implication of the endothelium, we investigated the role of related NOS- and COX-dependent factors. We observed that, in SHAM aortas, the relaxant effect induced by PDE3 inhibition was modulated by NO. In HF rat aortas, in addition to NO, a second endothelial factor appears to contribute to the inhibition of PDE3 function. Several studies have demonstrated a role of endothelium-derived contracting factors (EDCF) in endothelial dysfunction in several models of HF [35,39,40,42,50]. In our rat model of HF, indomethacin enhanced Cil-induced relaxation indicating that both NOS- and COX-dependent factors modulated PDE3 function.

In vasculature,  $\beta$ -AR system is important because it is primarily responsible for vascular smooth muscle-dependent vasodilatation. To examine vascular  $\beta$ -AR function in HF, we evaluate the role of PDE3 and PDE4, and the contribution of endothelial factors (NOS and COX-derived factors) in the relaxant response to  $\beta$ -AR stimulation in SHAM and HF aortas. Although  $\beta$ -ARs are primarily located in vascular smooth muscle, there are  $\beta$ -ARs on endothelial cells [51]. It is not clear whether vascular endothelial  $\beta$ -ARs participate in the  $\beta$ -ARs-mediated vasodilatation. Previous work indicates that activation of these receptors stimulates release of NO [2]. Our data describing the responses with removed endothelium or

under NOS inhibition show that the relaxant response to isoprenaline in SHAM rats is abolished, suggesting that  $\beta$ -adrenergic aortic relaxation requires a functional endothelial NO pathway. This endothelial contribution might be due either to the localization of  $\beta$ -AR on the endothelial cells and activation of the relaxant NOS pathway, and/or to the negative regulation of smooth muscle  $\beta$ -AR by endothelial NO. Moreover,  $\beta$ -AR relaxation is negatively controlled by COX-dependent factor(s).

Several studies reported a decrease in the  $\beta$ -AR-mediated vasorelaxation in systemic and/or pulmonary arteries isolated from different models of HF animals [26-29], which was in some cases related to a decrease in  $\beta$ -AR density [30,31]. The loss of  $\beta$ -adrenergic relaxation observed in aortas isolated from HF rats might be related to their endothelial dysfunction. In 1996, a study highlighted an important aspect of the regulation of cAMP-dependent vascular relaxation; an increase in cGMP levels can enhance the relaxant response to isoprenaline by increasing the level of cAMP [12]. This study also revealed a key role of PDE3 in this phenomenon. In our study, the endothelium-dependent  $\beta$ -AR vasorelaxation is totally rescued by PDE3 inhibition in addition to a COX-dependent factor.  $\beta$ -AR relaxation is also negatively controlled by PDE4 activity, in addition to COX-dependent factors, but this control is largely dependent on endothelium functionality. In HF aortas, the loss of  $\beta$ -adrenergic relaxation is unmasked by PDE3 and COX inhibition. PDE4 inhibition restores also  $\beta$ -adrenergic relaxant response in HF aortas albeit to a lower extent than with PDE3 inhibition.

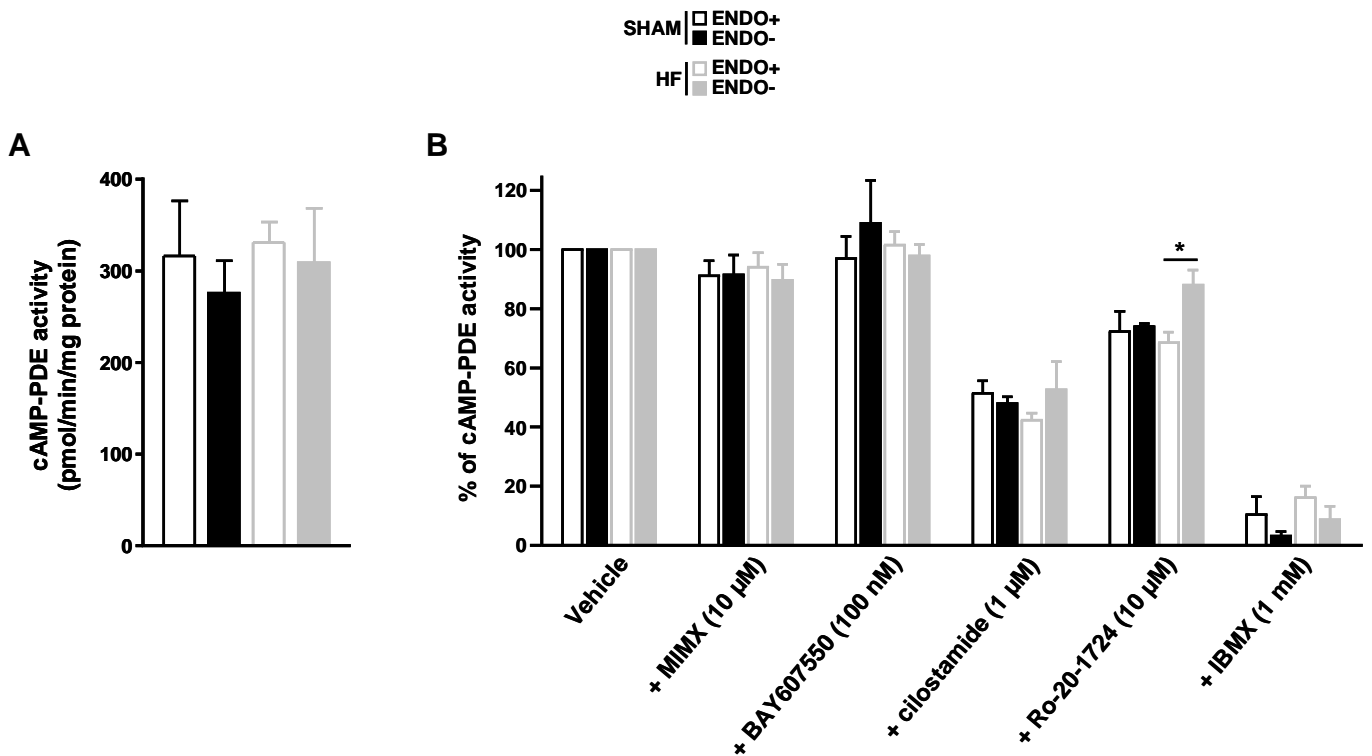
In conclusion, alterations in vascular reactivity observed in our rat model of HF may be related to functional changes of cAMP-PDEs. Although *in vitro* PDE activity assay did not show significant differences between SHAM and HF aortas, in presence or absence of endothelium, these results were not associated to the functional role of cAMP-PDEs in the control of vascular tone. We hypothesize that: (1) the functional role of PDEs is dependent of spatial organization of each PDE isoforms, supporting the concept of compartmentalization; (2) the regulation of PDE activity by endothelium through NOS- and COX-derived factors is lost during *in vitro* biochemical assay. Endothelial dysfunction in HF rat aorta leads to impaired PDE4 function and to loss of  $\beta$ -adrenergic relaxation which are completely restored when PDE3 activity is inhibited. These results suggest that NO/cGMP pathway could enhance the cyclic AMP accumulation and thereby increase the associated relaxation in VSMCs, probably through the inhibition of the cGMP-inhibited PDE3 in normal condition. Thus, NO/cGMP pathway could induce PDE4-dependent regulation of cAMP via PDE3 inhibition.

Our study underlines an increase of PDE3 functional activity in HF rat aorta which abolishes  $\beta$ -adrenergic relaxation and masks PDE4 function. In terms of therapeutic perspectives, we might consider the selective inhibition of PDE isoform whose function is increased in HF, in our case PDE3, with highly selective and tissue specific PDE inhibitors. Therefore, it would be possible to restore, selectively, normal intracellular cAMP signaling pathway and provide treatment with minimal adverse effects.

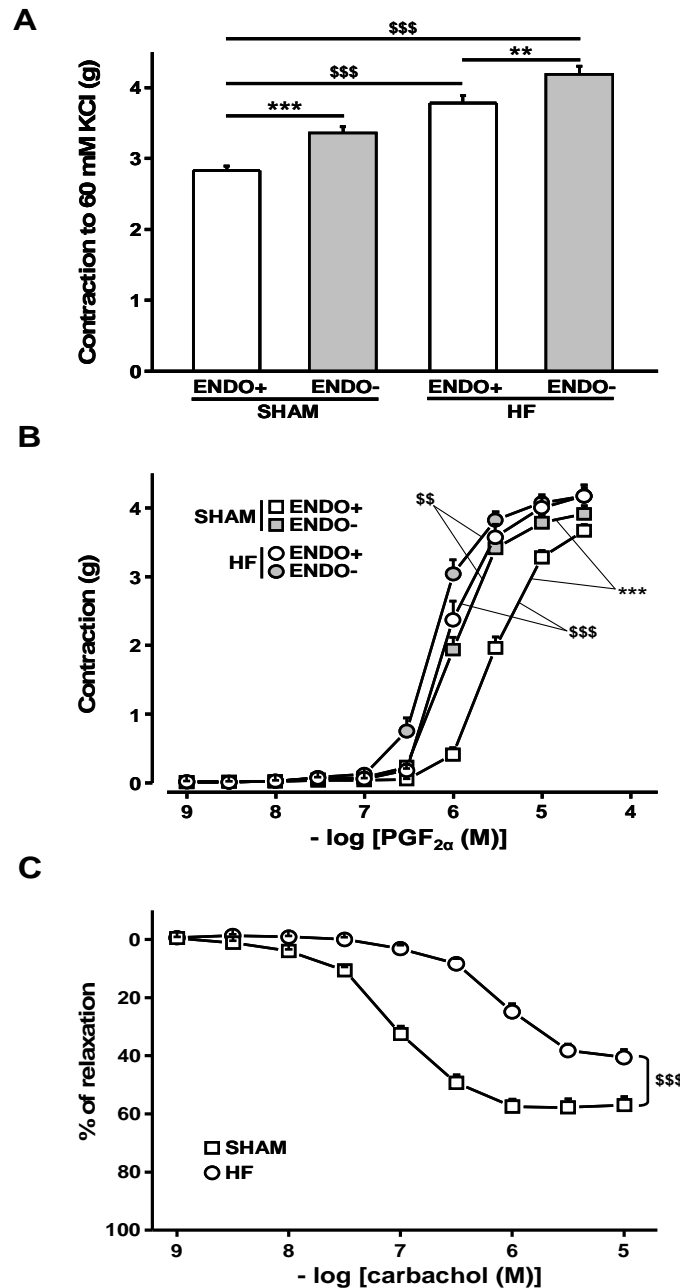
	SHAM (n=48)	HF (n=43)	<i>P</i>
Body weight (g)	601 ± 10	566 ± 11	<0.05
Heart weight (g)	1.81 ± 0.03	3.85 ± 0.11	<0.001
Tibia length (cm)	4.47 ± 0.02	4.44 ± 0.02	NS
Heart weight/tibia length (mg/cm)	404 ± 6	859 ± 25	<0.001
Lung weight/tibia length (mg/cm)	397 ± 6	908 ± 37	<0.001
Liver weight/tibia length (g/cm)	3.82 ± 0.08	3.93 ± 0.11	NS
	SHAM (n=10)	HF (n=9)	<i>P</i>
Left ventricular mass (mg)	1104 ± 73	1993 ± 238	<0.01
Fractional shortening (%)	48.5 ± 2.3	24.4 ± 2.7	<0.001

**Table 1: Anatomic and echocardiographic parameters from SHAM and HF rats.** Values are mean ± SEM. n = number of animals. *P*: statistical differences between SHAM and HF groups, NS: non significant (Student's *t*-test).

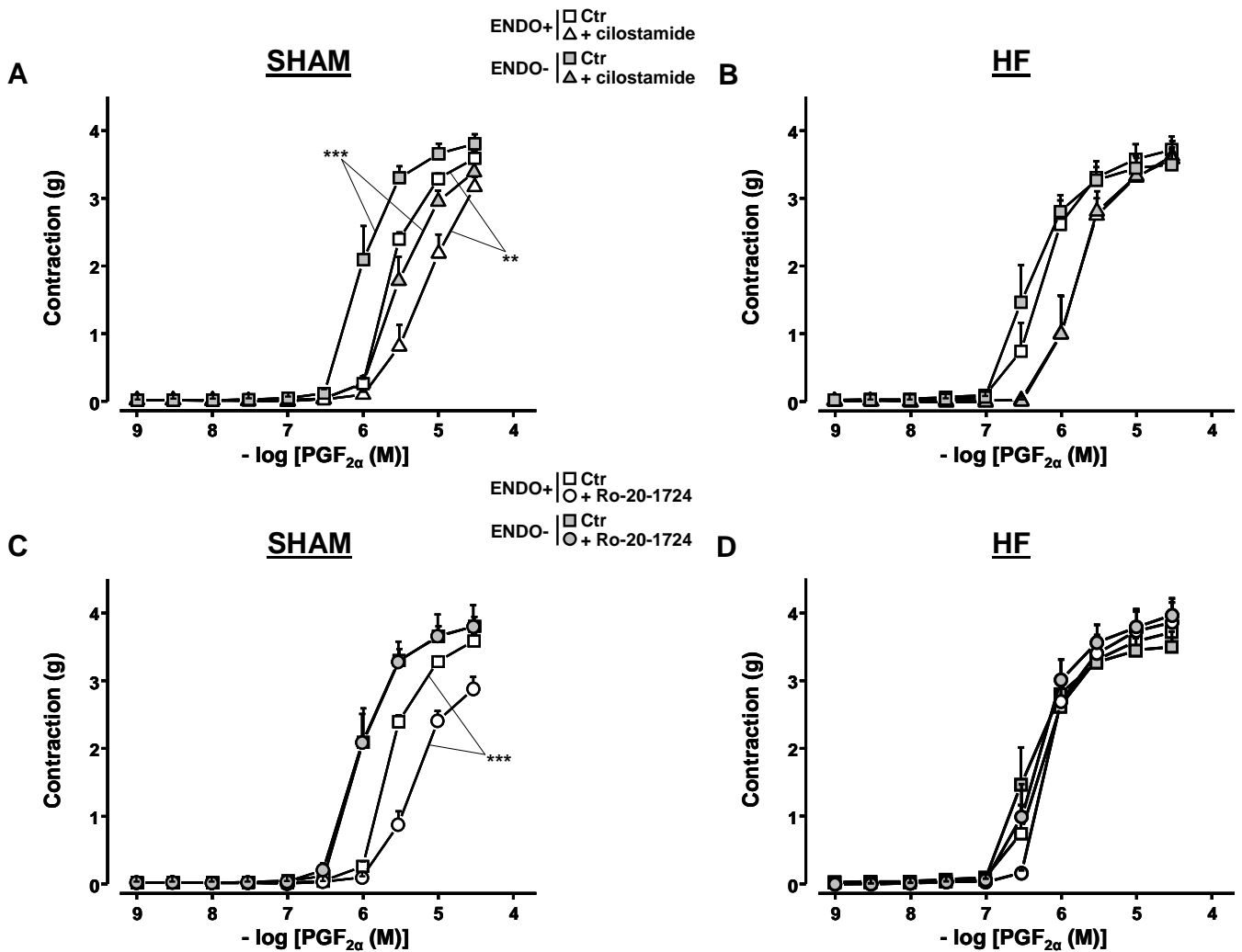




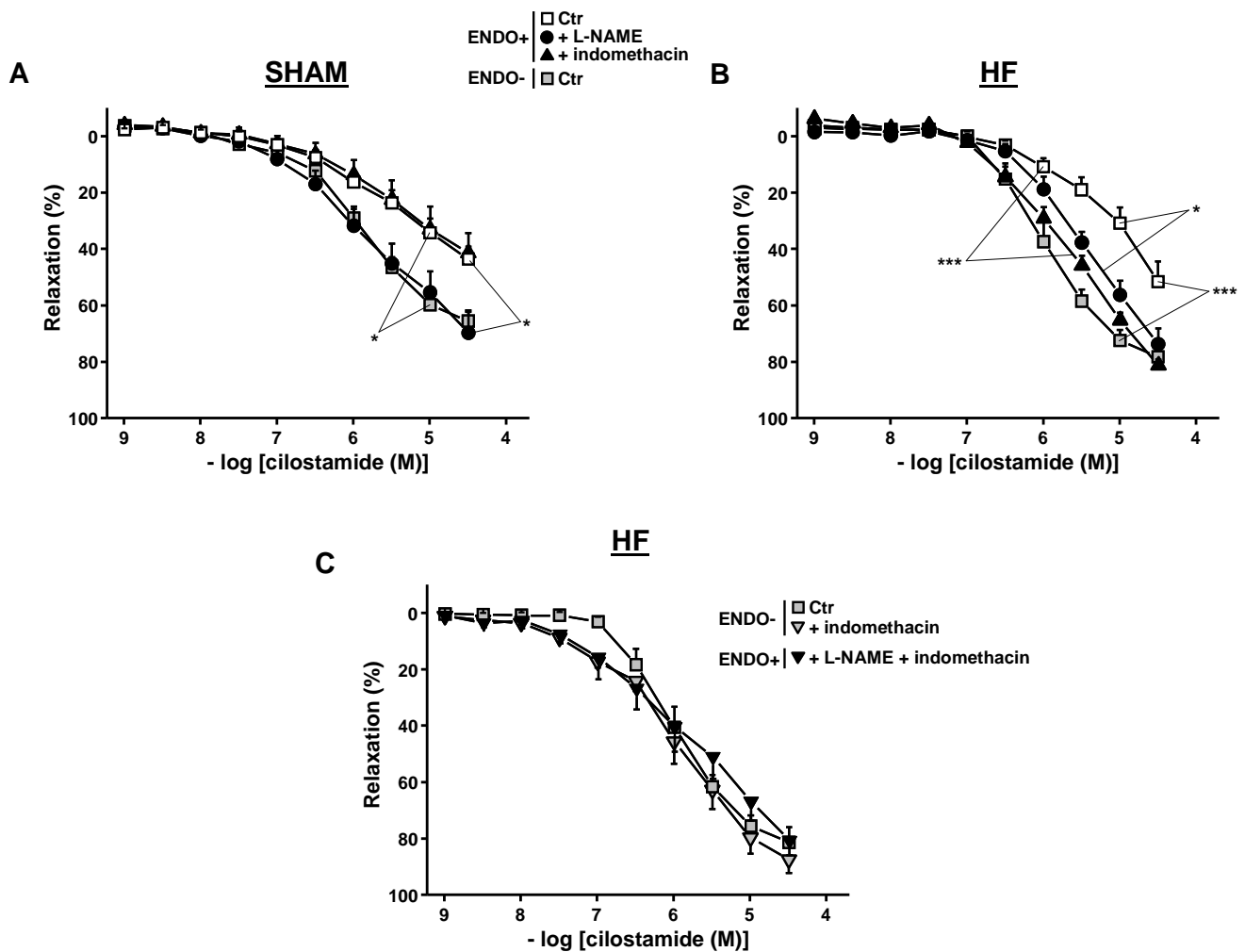
**Figure 1: cAMP-PDE activity in aorta with (ENDO+) or without (ENDO-) functional endothelium, isolated from SHAM and HF rats.** A: Total cAMP-PDE activity was determined in the presence of 1  $\mu$ M [ $^3$ H]-cAMP in lysates of SHAM and HF endothelium-intact (ENDO+, open bars) or endothelium-denuded (ENDO-, solid bars) aortic rings. B: cAMP-PDE activity pattern was determined in the absence (*vehicle*) or presence of a selective PDE isoform inhibitor (PDE1: 10  $\mu$ M MIMX; PDE2: 100 nM BAY; PDE3: 1  $\mu$ M Cil; PDE4: 10  $\mu$ M Ro) or a non-selective PDE inhibitor (100 mM IBMX). Results are expressed in % of cAMP-PDE activity measured in the absence of inhibitors (*vehicle*). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \* $P$ <0.05 *versus* ENDO+ (Student's *t*-test).



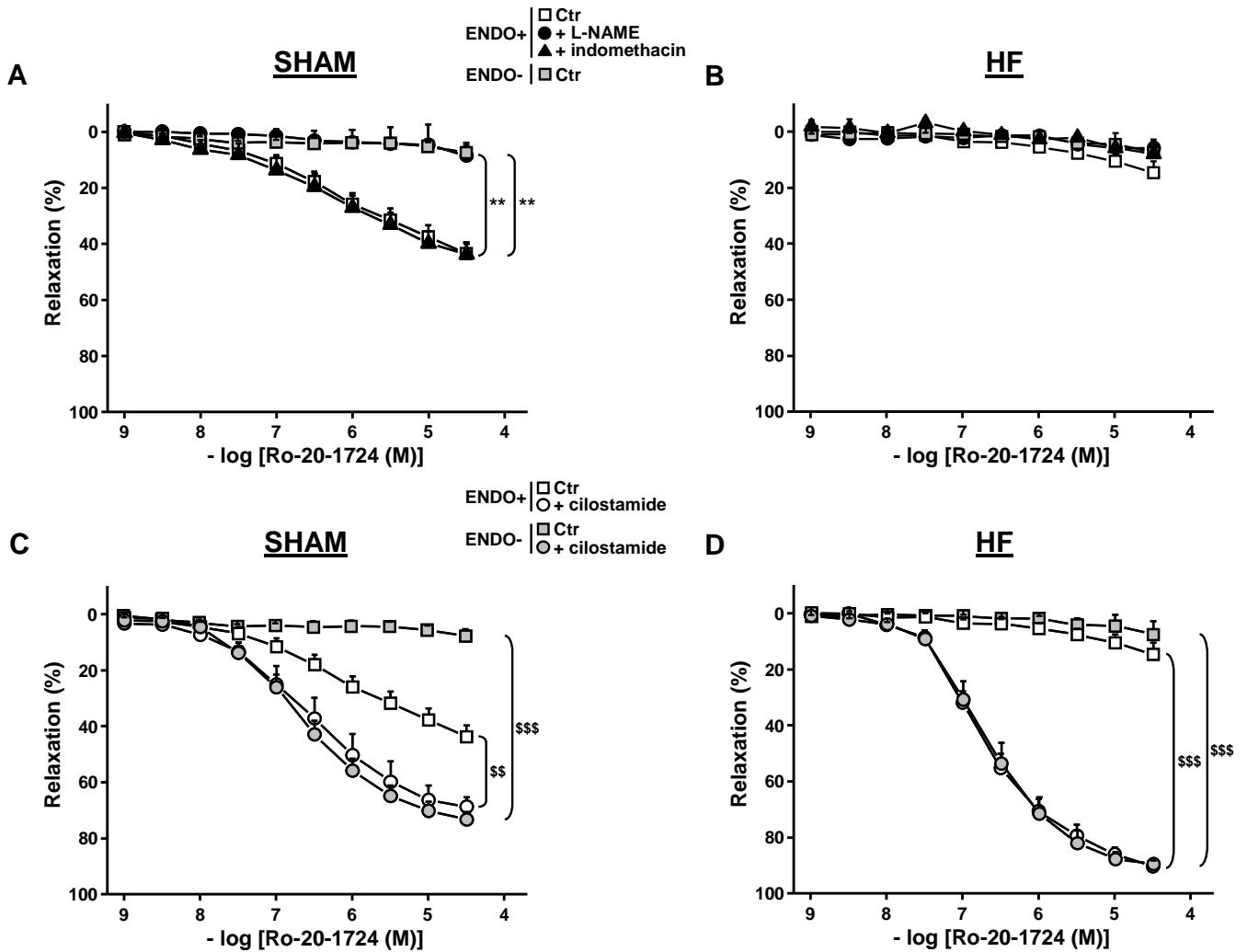
**Figure 2: Evaluation of vascular reactivity in aorta isolated from SHAM and HF rats with (ENDO+) or without (ENDO-) functional endothelium.** A: Contractile response to a depolarizing solution of 60 mM KCl in SHAM and HF endothelium-intact (ENDO+, open bars, n=56-49) or endothelium-denuded (ENDO-, solid bars, n=43) rat aortic rings. B: Concentration-response curves to PGF<sub>2α</sub> (1 nM - 30 μM) in SHAM and HF ENDO+ (open symbols, n=28-18) and ENDO- (solid symbols, n=26-18) aortic rings. C: Relaxant-response curves to carbachol (1 nM - 10 μM) on PGF<sub>2α</sub>-precontracted ENDO+ aortic rings isolated from SHAM and HF rats (n=20). Data are mean ± SEM. \*\**P*<0.01 and \*\*\**P*<0.001 versus corresponding ENDO+ group; \$\$*P*<0.01 and \$\$\$*P*<0.001 versus corresponding SHAM group (with Student's *t* test in A and ANOVA in B and C).



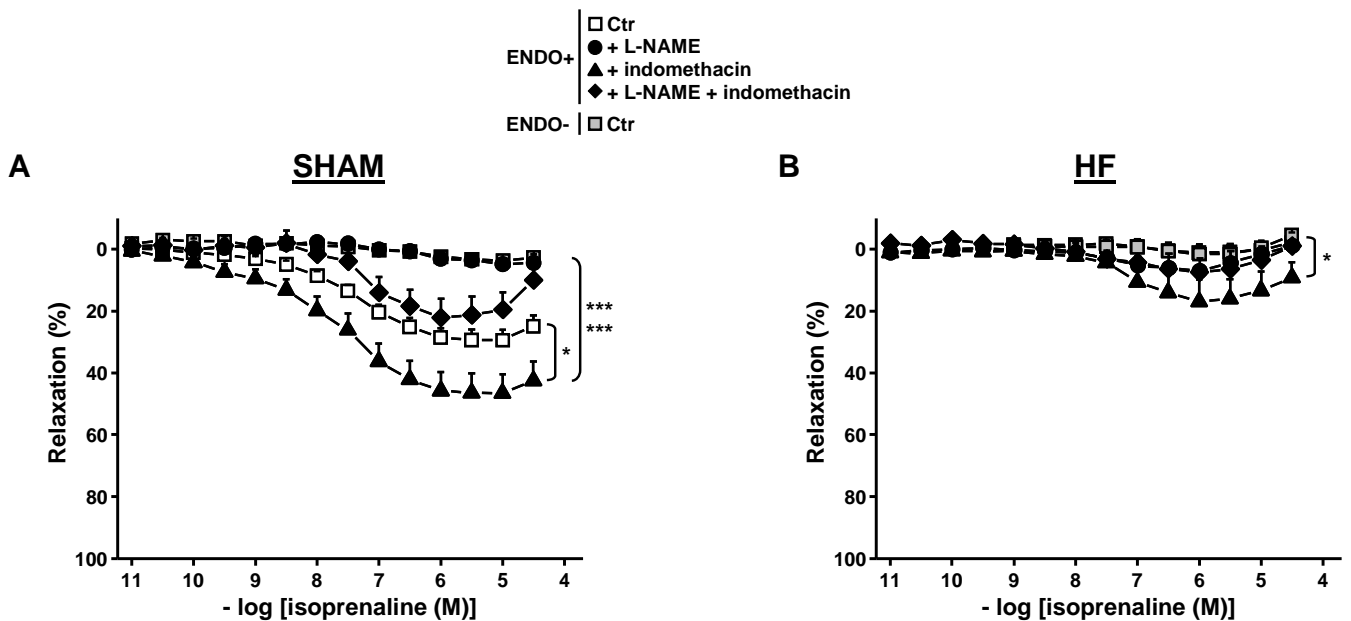
**Figure 3: Effect of PDE3 and PDE4 inhibition on PGF<sub>2α</sub>-induced contraction in aorta isolated from SHAM and HF rats with (ENDO+) or without (ENDO-) functional endothelium.** Concentration-response curves to PGF<sub>2α</sub> (1 nM - 30 μM) were performed in SHAM (A and C) and HF (B and D) endothelium-intact (ENDO+, open symbols) or endothelium-denuded (ENDO-, solid symbols) aortic rings, in the absence (ctr; n=4-5) or presence of selective PDE inhibitor: A and B: 1 μM Cil for PDE3 (n=5-7); C and D: 10 μM Ro for PDE4 (n=4-6). Data are mean ± SEM. \*\**P*<0.01 and \*\*\**P*<0.001 between ctr and PDE inhibitor-treated (ANOVA).



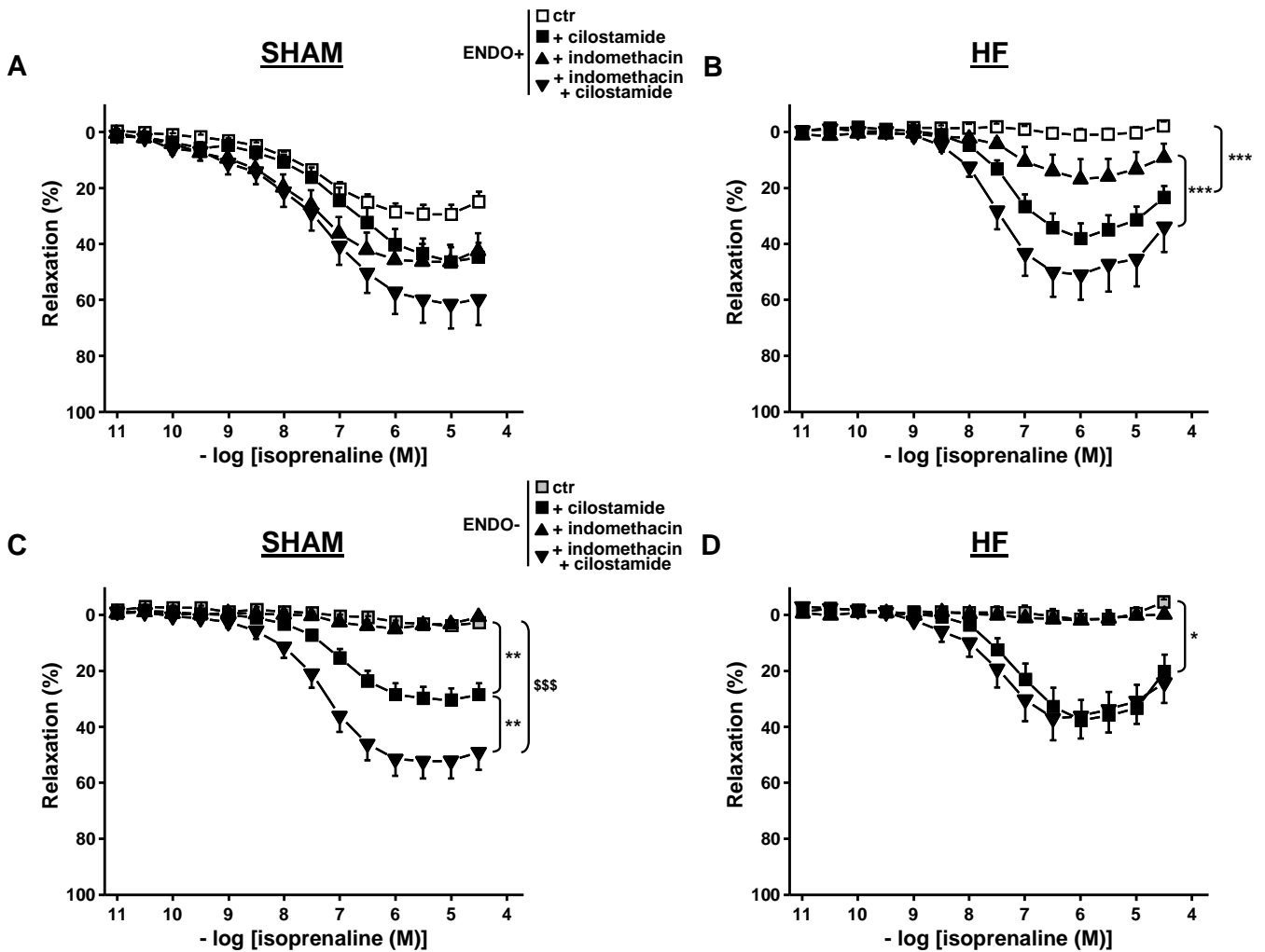
**Figure 4: Effect of L-NAME, indomethacin and endothelium removal on PDE3 inhibition-induced relaxant response in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats.** A and B: Concentration-response curves to Cil (1 nM - 30  $\mu$ M) were performed in endothelium-intact arteries pretreated in the absence (ENDO+; n=13) or presence of the NOS inhibitor (+ L-NAME; 300 $\mu$ M; n=9-7) or the COX inhibitor (+ Indo; 10  $\mu$ M; n=7-13) and in endothelium-denuded arteries (ENDO-; n=8-10) isolated from SHAM (A) and HF (B) rats and precontracted with PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . C: Concentration-response curves to Cil (1 nM - 30  $\mu$ M) were performed in endothelium-denuded arteries pretreated in the absence (ENDO-; n=10) or presence of the COX inhibitor (ENDO- + Indo; n=7) or in endothelium-intact arteries pretreated in the presence of NOS and COX inhibitors (+ L-NAME + Indo; n=6) isolated from HF rats and precontracted with PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 versus ENDO+ as indicated (ANOVA).



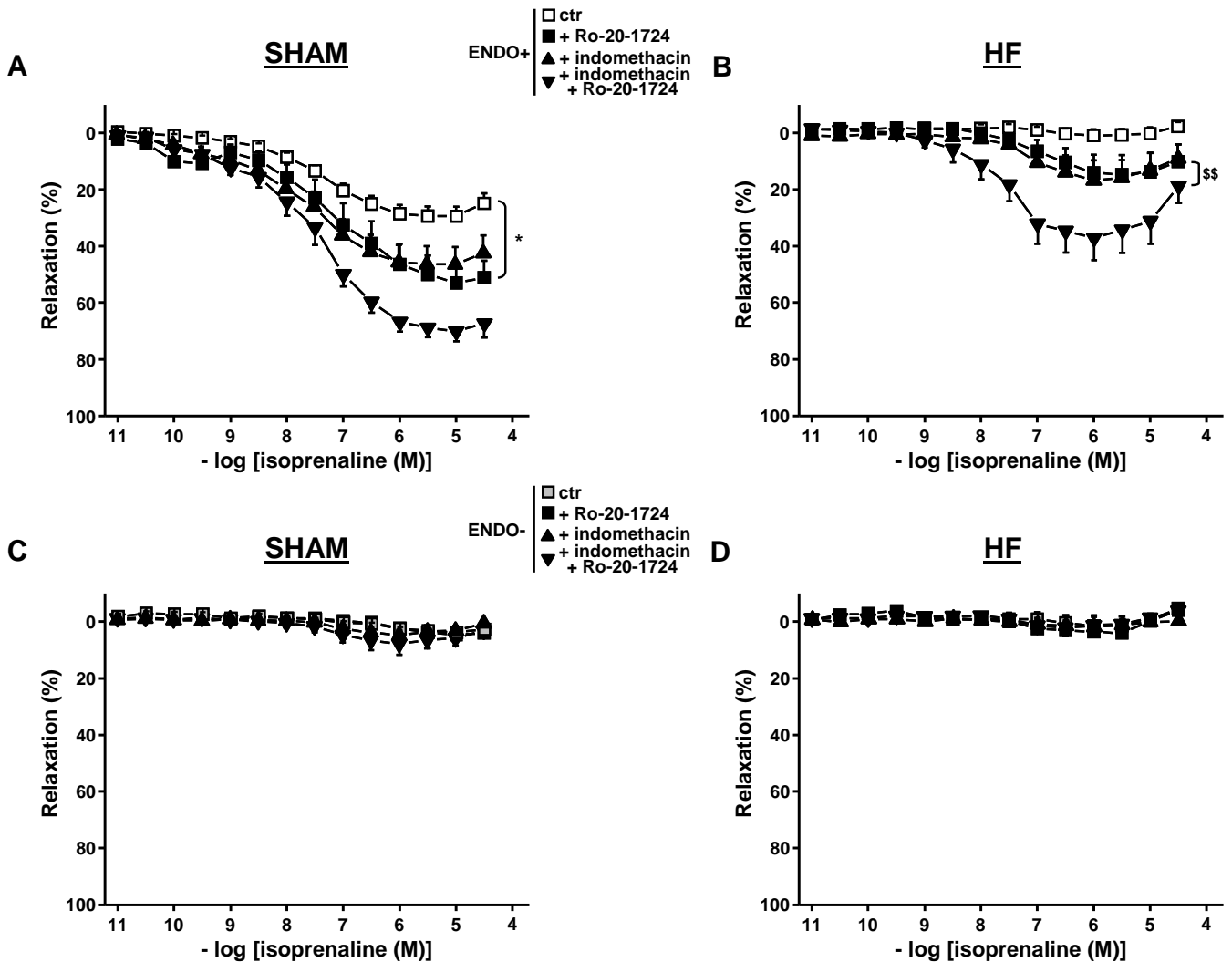
**Figure 5: Effect of L-NAME, indomethacin, Cil and endothelium removal on PDE4 inhibition-induced relaxant response in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats.** A and B: Concentration-response curves to Ro (1 nM - 30  $\mu$ M) were performed in endothelium-intact arteries pretreated in the absence (ENDO+; n=11-8) or presence of the NOS inhibitor (+ L-NAME; 300 $\mu$ M; n=5-6) or the COX inhibitor (+ Indo; 10  $\mu$ M; n=6-3) and in endothelium-denuded arteries (ENDO-; n=5) isolated from SHAM (A) and HF (B) rats and precontracted with PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . C and D: Concentration-response curves to Ro (1 nM - 30  $\mu$ M) were performed either in endothelium-intact (ENDO+) or endothelium-denuded (ENDO-) arteries isolated from SHAM and HF rats, and pretreated in the absence (ctr) or presence of Cil (1  $\mu$ M for 10 min) (ENDO+/Cil: n=5-8; ENDO-/Cil: n=8-9) prior the contraction with PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Data are mean  $\pm$  SEM. \*\* $P$ <0.01 *versus* ENDO+ as indicated; \$\$ $P$ <0.01, \$\$\$ $P$ <0.001 between control and the corresponding Cil-treated group (ANOVA).



**Figure 6: Effect of L-NAME, indomethacin and endothelium removal on  $\beta$ -adrenergic-induced relaxant response in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats.** Concentration-response curves to isoprenaline (0.01 nM - 30  $\mu$ M) were performed in endothelium-intact arteries pretreated in the absence (ENDO+; n=12-5) or presence of the NOS inhibitor (+ L-NAME; 300 $\mu$ M; n=4), the COX inhibitor (+ Indo; 10  $\mu$ M; n=13-5) or the combination of NOS and COX inhibitors (+ L-NAME + Indo; n=7-2), and in endothelium-denuded arteries (ENDO-; n=6-5) isolated from SHAM (A) and HF (B) rats and precontracted with  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 vs ENDO+ (ANOVA).



**Figure 7: Effect of PDE3 inhibition on  $\beta$ -adrenergic-induced relaxant response in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats.** Concentration-response curves to isoprenaline (0.01 nM - 30  $\mu$ M) were performed in endothelium-intact (A and B) and in endothelium-denuded (C and D) aortas isolated from SHAM (A and C) or HF (B and D) rats, pretreated in the absence (ctr; n=12-5-6-5 for A, B, C and D panels, respectively) or presence of the PDE3 inhibitor (+Cil; 1  $\mu$ M; n=10-14-16-13), the COX inhibitor (+ Indo; 10  $\mu$ M; n=13-5-5-3) or the combination of PDE3 and COX inhibitors (+ Indo +Cil; n=8-10-16-14) prior the contraction with PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 versus ctr as indicated; \$\$\$ $P$ <0.001 versus Cil or Indo as indicated (ANOVA).



**Figure 8: Effect of PDE4 inhibition on  $\beta$ -adrenergic-induced relaxant response in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats.** Concentration-response curves to isoprenaline (0.01 nM - 30  $\mu$ M) were performed in endothelium-intact (A and B) and in endothelium-denuded (C and D) aortas isolated from SHAM (A and C) or HF (B and D) rats, pretreated in the absence (ctr; n=12-5-6-5 for A, B, C and D panels, respectively) or presence of the PDE4 inhibitor (+Ro; 10  $\mu$ M; n=10-10-4-6), the COX inhibitor (+ Indo; 10  $\mu$ M; n=13-5-5-3) or the combination of PDE4 and COX inhibitors (+ Indo +Ro; n=8-11-7-6) prior the contraction with  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05 versus ctr as indicated; \$\$ $P$ <0.001 versus Ro as indicated (ANOVA).



## Reference List

1. Eckly-Michel A, Martin V, Lugnier C (1997) Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *British J Pharmacol* 122: 158-164.
2. Gray DW, Marshall I (1992) Novel Signal Transduction Pathway Mediating Endothelium- Dependent beta-Adrenoceptor Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta. *Br J Pharmacol* 107: 684-690.
3. Eckly AE, Stoclet JC, Lugnier C (1994) Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 271: 237-40.
4. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, *et al.* (2003) Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64: 533-546.
5. Lugnier C, Schini VB (1990) Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 39: 75-84.
6. Polson JB, Strada SJ (1996) Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle . *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 403-427.
7. Ashikaga T, Strada SJ, Thompson WJ (1997) Altered expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes during culture of aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 54: 1071-9.
8. Keravis T, Komasa N, Lugnier C (2000) Cyclic nucleotide hydrolysis in bovine aortic endothelial cells in culture: differential regulation in cobblestone and spindle phenotypes. *J Vasc Res* 37: 235-49.
9. Netherton SJ, Maurice DH (2005) Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol* 67: 263-72.
10. Komasa N, Lugnier C, Stoclet JC (1991) Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 104: 495-503.
11. Lugnier C, Komasa N (1993) Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J* 14 Suppl I: 141-8.
12. Delpy E, Coste H, Degouville ACL (1996) Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: Role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol* 119: 471-478.
13. Francis GS, Cohn JN (1990) Heart failure: mechanisms of cardiac and vascular dysfunction and the rationale for pharmacologic intervention. *FASEB J* 4: 3068-75.
14. Negrao CE, Hamilton MA, Fonarow GC, Hage A, Moriguchi JD, *et al.* (2000) Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H168-74.
15. Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Saitoh S, Kon H, *et al.* (2001) Blunted peripheral vasodilatory response is a hallmark of progressive deterioration in mild to moderate congestive heart failure. *J Card Fail* 7: 38-44.
16. Schrier RW, Abraham WT (1999) Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med* 341: 577-85.
17. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, *et al.* (1982) Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211 .
18. Bristow MR, Minobe WA, Reynolds MV, Port JD, Rasmussen R, *et al.* (1993) Reduced beta(1) Receptor

Messenger RNA Abundance in the Failing Human Heart. *J Clin Invest* 92: 2737-2745.

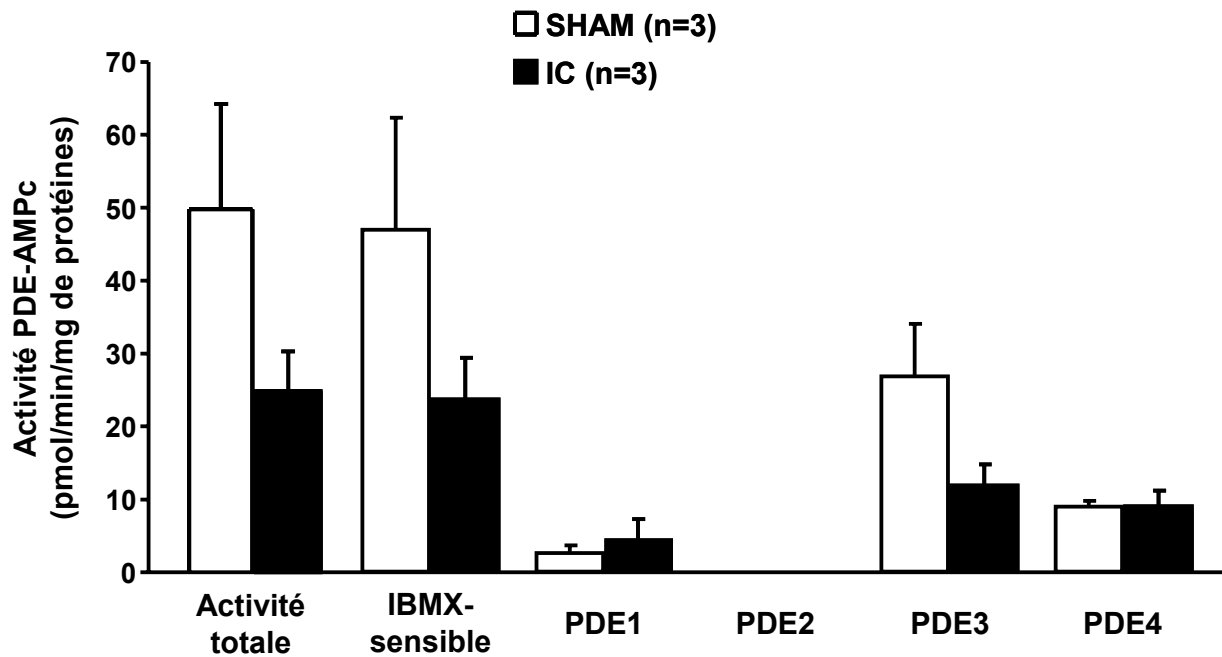
19. Bristow MR, O'Connell JB, Gilbert EM, French WJ, Leatherman G, *et al.* (1994) Dose-response of chronic beta-blocker treatment in heart failure from either idiopathic dilated or ischemic cardiomyopathy. Bucindolol Investigators. *Circulation* 89: 1632-1642.
20. Maurice JP, Shah AS, Kypson AP, Hata JA, White DC, *et al.* (1999) Molecular beta-adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit hearts after infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 45: H1853-H1860.
21. Yanaka N, Kurosawa Y, Minami K, Kawai E, Omori K (2003) cGMP-phosphodiesterase activity is up-regulated in response to pressure overload of rat ventricles. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 973-939.
22. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Matéo P, Varin A, *et al.* (2009) Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on  $\beta$ -adrenergic cAMP signals. *Circ Res* 105: 784-792.
23. Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, *et al.* (2005) Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 111: 2469-2476.
24. Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, *et al.* (2005) Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123: 23-35.
25. Pokreisz P, Vandewijngaert S, Bito V, Van den Bergh A, Lenaerts I, *et al.* (2009) Ventricular Phosphodiesterase-5 Expression Is Increased in Patients With Advanced Heart Failure and Contributes to Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* 119: 408-416.
26. Mathew R, Wang J, Gewitz MH, Hintze TH, Wolin MS (1993) Congestive heart failure alters receptor-dependent cAMP-mediated relaxation of canine pulmonary arteries. *Circulation* 87: 1722-8.
27. Nasa Y, Toyoshima H, Ohaku H, Hashizume Y, Sanbe A, *et al.* (1996) Impairment of cGMP- and cAMP-mediated vasorelaxations in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol* 271: H2228-37.
28. Toyoshima H, Nasa Y, Kohsaka Y, Isayama Y, Yamaguchi F, *et al.* (1998) The effect of chronic treatment with trandolapril on cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent relaxations in aortic segments of rats with chronic heart failure. *Br J Pharmacol* 123: 344-52.
29. McGoldrick RB, Kingsbury M, Turner MA, Sheridan DJ, Hughes AD (2007) Left ventricular hypertrophy induced by aortic banding impairs relaxation of isolated coronary arteries. *Clin Sci (Lond)* 113: 473-8.
30. Kiuchi K, Sato N, Shannon RP, Vatner DE, Morgan K, *et al.* (1993) Depressed beta-Adrenergic Receptor-Mediated and Endothelium-Mediated Vasodilation in Conscious Dogs with Heart Failure. *Circ Res* 73: 1013-1023.
31. Gaballa MA, Eckhart A, Koch WJ, Goldman S (2001) Vascular beta-adrenergic receptor system is dysfunctional after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1129-H1135.
32. Takahashi K, Osanai T, Nakano T, Wakui M, Okumura K (2002) Enhanced activities and gene expression of phosphodiesterase types 3 and 4 in pressure-induced congestive heart failure. *Heart Vessels* 16: 249-56.
33. Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Hornig B, Just H, *et al.* (1992) Endothelial Function in Chronic Congestive Heart Failure. *Am J Cardiol* 69: 1596-1601.
34. Katz SD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeau G, *et al.* (1992) Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 19: 918-25.
35. Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, *et al.* (2005) Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation* 111: 310-4.
36. Bauersachs J, Widder JD (2008) Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep* 60: 119-26.

37. Delannoy E, Courtois A, Freund-Michel V, Leblais V, Marthan R, *et al.* (2010) Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res* 85: 582-92.
38. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164: 894-912.
39. Kaiser L, Spickard RC, Olivier NB (1989) Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *Am J Physiol* 256: H962-7.
40. Katz SD, Schwarz M, Yuen J, LeJemtel TH (1993) Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure. Role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation* 88: 55-61.
41. Colombo PC, Banchs JE, Celaj S, Talreja A, Lachmann J, *et al.* (2005) Endothelial cell activation in patients with decompensated heart failure. *Circulation* 111: 58-62.
42. Miller JD, Peotta VA, Chu Y, Weiss RM, Zimmerman K, *et al.* (2010) MnSOD protects against COX1-mediated endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1600-7.
43. Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, *et al.* (2008) Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 586: 5181-92.
44. Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel JB, Mercadier JJ, *et al.* (2002) Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H346-52.
45. Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, *et al.* (2008) beta-adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent beta2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 77: 202-10.
46. Thompson WJ, Appleman MM (1971) Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *J Biol Chem* 246: 3145-50.
47. Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J, Karpen JW (2001) In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* 118: 63-78.
48. Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, *et al.* (2004) Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47: 1081-92.
49. Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, *et al.* (2000) Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* 59: 347-56.
50. Nakamura S, Nishizuka Y (1994) Lipid mediators and protein kinase C activation for the intracellular signaling network. *J Biochem Tokyo* 115: 1029-1034.
51. Stephenson JA, Summers RJ (1987) Autoradiographic analysis of receptors on vascular endothelium. *Eur J Pharmacol* 134: 35-43.

## **II.B. Altération de la fonction vasculaire dans l'artère mésentérique de rat au cours de l'IC : rôle des PDE-AMPC**

### **II.B.1. Activité PDE-AMPC dans les artères mésentériques de rats SHAM et IC**

L'activité d'hydrolyse de l'AMPC par les PDE a été mesurée dans les lysats d'artères mésentériques intactes isolées de rats SHAM et IC. L'activité totale PDE-AMPC dans les artères mésentériques semble être diminuée de moitié chez les rats IC par rapport aux rats SHAM (n=3, NS ; **Figure 1**). Cependant, cette diminution n'est pas significative (certainement du fait du faible nombre d'expériences) et devra être confirmée par des dosages supplémentaires. La part de l'activité sensible à l'inhibiteur non sélectif des PDE-AMPC (1 mM IBMX) correspond à l'activité PDE-AMPC totale dans les deux groupes d'artères. Pour déterminer la contribution des différentes familles de PDE à cette activité d'hydrolyse de l'AMPC, les expériences ont également été réalisées en présence des différents inhibiteurs sélectifs des PDE-AMPC (**Figure 1**). Dans les artères mésentériques de rats SHAM, l'activité PDE1 (inhibée par 10  $\mu$ M MIMX) est faible et ne représente que 7% de l'activité PDE-AMPC totale, alors qu'aucune activité PDE2 (inhibée par 100 nM BAY) n'est détectée. Les inhibiteurs sélectifs de PDE3 (1  $\mu$ M Cil) et de PDE4 (10  $\mu$ M Ro) révèlent des activités importantes de ces deux familles correspondant, respectivement, à 56% et 21% de l'activité totale. En résumé, l'ordre de classement des familles de PDE contribuant à l'activité globale d'hydrolyse de l'AMPC dans les artères mésentériques de rats SHAM est : PDE3 > PDE4 > PDE1. Dans les artères mésentériques isolées de rats IC, les activités PDE1, PDE3 et PDE4 représentent, respectivement, 18%, 48% et 37% de l'activité PDE-AMPC totale, alors que l'activité PDE2 n'a pas été détectée. Ainsi, le profil d'activité PDE-AMPC dans l'artère mésentérique des rats IC est le suivant : PDE3  $\approx$  PDE4 > PDE1. Comparativement aux artères isolées de rats SHAM, il semblerait que l'activité PDE3 soit réduite de moitié chez les rats IC, mais cette diminution est non significative.



**Figure 1** : Activité PDE-AMPC dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM et IC.

L'activité PDE-AMPC a été mesurée en présence de 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-AMPC dans les lysats d'artères mésentériques de rats SHAM et IC. Le profil d'activité des PDE-AMPC a été déterminé en absence (*activité totale*) ou en présence de l'inhibiteur non sélectif des PDE (1 mM IBMX) ou d'un inhibiteur sélectif d'une famille de PDE (PDE1 : 10  $\mu\text{M}$  MIMX; PDE2 : 100 nM BAY; PDE3 : 1  $\mu\text{M}$  Cil; PDE4 : 10  $\mu\text{M}$  Ro). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de 3 expériences indépendantes.

### II.B.2. Etude de la capacité contractile et de la fonction endothéliale des artères mésentériques de rats SHAM et IC

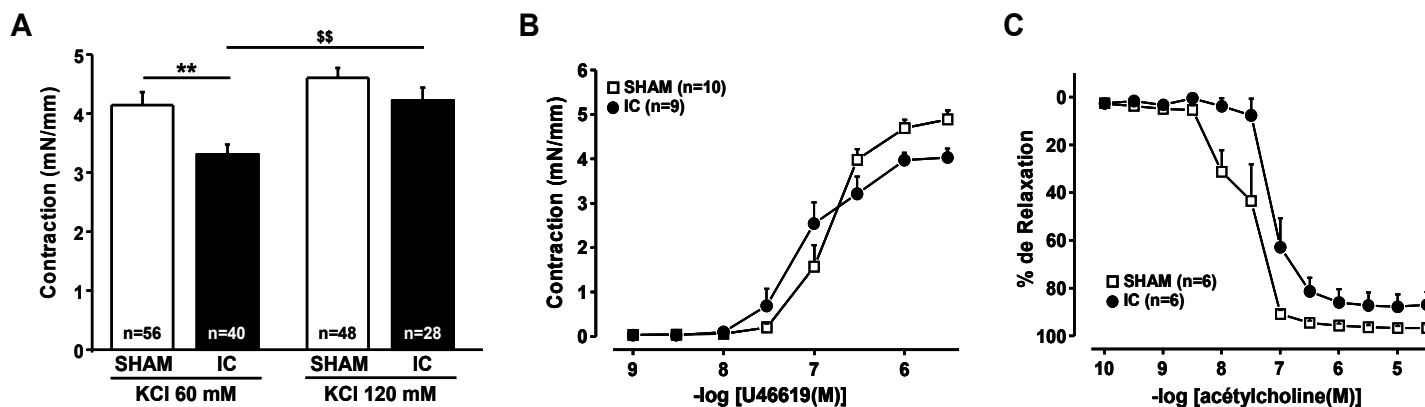
Nous avons ensuite évalué la fonction des artères mésentériques isolées des rats SHAM et IC par des études de réactivité vasculaire. La capacité contractile des artères a été explorée en réponse à deux stimuli différents, soit une solution dépolarisante de KCl (60 mM ou 120 mM), soit un agoniste des récepteurs au  $\text{TXA}_2$ , le U46619. La réponse contractile induite par la solution dépolarisante de KCl 60 mM est significativement plus élevée dans les anneaux d'artères mésentériques des rats SHAM par rapport aux rats IC (différence de 20%,  $n=56-40$ ,  $P<0,01$ ; **Figure 2A**). L'augmentation de la concentration en KCl de 60 à 120 mM entraîne une augmentation de la réponse contractile uniquement significative dans les artères issues des rats IC (augmentation de : 11% dans les artères SHAM,  $n=56-48$ , NS ; 27% dans les

artères IC, n=40-28,  $P<0,01$  ; **Figure 2A**). La réponse contractile induite par la solution dépolarisante de KCl 120 mM n'est pas différente dans les deux groupes de rats (**Figure 2A**).

L'addition de concentrations croissantes cumulatives de U46619 (1 nM à 3  $\mu$ M) induit une réponse contractile dépendante de la concentration, caractérisée par un effet maximal de  $4,9 \pm 0,2$  mN/mm (n=10) et une valeur de  $pD_2$  de  $6,9 \pm 0,1$  dans les artères mésentériques isolées des rats SHAM (**Figure 2B**). Dans les artères issues des rats IC, la réponse maximale à l'U46619 est significativement diminuée par rapport aux rats SHAM (d'environ 16%,  $P<0,01$ ), sans modification de la valeur de  $pD_2$  ( $7,1 \pm 0,2$  pour les IC, n=9) (**Figure 2B**).

La relaxation dépendante de l'endothélium a été estimée en réalisant des courbes concentration-effet avec l'acétylcholine (0,1 nM à 30  $\mu$ M), agoniste des récepteurs muscariniques endothéliaux, sur les artères mésentériques pré-contractées au U46619 (1  $\mu$ M). La courbe concentration-relaxation de l'acétylcholine est significativement déplacée vers la droite chez les rats IC par rapport aux SHAM (valeurs de  $pD_2 = 6,1 \pm 1,0$  chez les IC, n=6 ;  $7,5 \pm 0,2$  chez les SHAM, n=6 ;  $P<0,05$ ), sans modification de l'effet maximal (**Figure 2C**).

Ces résultats mettent en évidence des signes modérés de dysfonction des artères mésentériques isolées de rats IC, avec une hypo-réactivité aux agents contractiles ainsi qu'une légère dysfonction endothéliale.

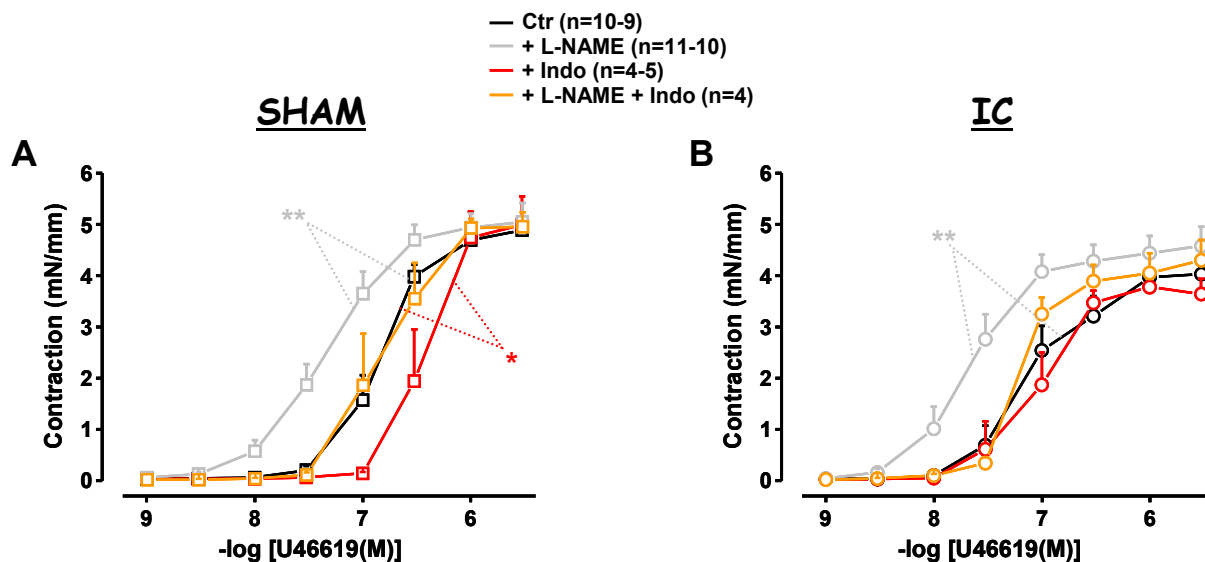


**Figure 2 : Evaluation de la fonction vasculaire des artères mésentériques isolées de rats SHAM et IC.**

**A:** Réponse contractile des anneaux d'artères mésentériques de rats SHAM et IC à des solutions dépolarisantes (KCl 60 et 120 mM). **B:** Courbes concentration-effet au U46619 (1 nM - 3  $\mu$ M) dans des anneaux d'artères mésentériques de rats SHAM et IC. **C:** Courbes concentration-effet à l'acétylcholine (0,1 nM - 30  $\mu$ M) sur des anneaux d'artères mésentériques de rats SHAM et IC pré-contractés avec le U46619 (1 $\mu$ M). L'effet relaxant est exprimé en % de la précontraction. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM.  $**P<0,01$  versus SHAM;  $^{SS}P<0,01$  versus KCl 60 mM (test *t* de Student).

Nous avons poursuivi l'exploration de la fonction endothéliale en analysant la contribution des facteurs endothéliaux dépendants de la NOS et de la COX dans la réponse contractile au U46619. Le prétraitement des artères mésentériques en présence de l'inhibiteur de la NOS (L-NAME, 300  $\mu$ M) provoque un important décalage vers la gauche des courbes concentration-effet au U46619 de manière similaire dans les deux groupes de rats SHAM et IC, sans modification de la contraction maximale (**Figure 3A et B**). Les valeurs de  $pD_2$  augmentent en présence de L-NAME de  $6,9 \pm 0,1$  (n=10) à  $7,4 \pm 0,1$  (n=11) pour le groupe SHAM ( $P < 0,01$ ) et de  $7,1 \pm 0,2$  (n=9) à  $7,7 \pm 0,1$  (n=10) pour le groupe IC ( $P < 0,01$ ). Dans les anneaux d'artères isolés de rats SHAM, l'incubation avec l'inhibiteur de la COX (indométhacine, 10  $\mu$ M) provoque un décalage significatif de la courbe concentration-effet au U46619 vers la droite, avec une réduction de la valeur de  $pD_2$  à  $6,4 \pm 0,1$  ( $P < 0,05$  *versus* Ctr) sans modification de la réponse contractile maximale (**Figure 3A**). Dans les artères de rats IC, le traitement avec l'indométhacine ne modifie pas la réponse contractile au U46619 (**Figure 3B**). Dans les deux groupes d'artères SHAM et IC, l'incubation en présence des deux inhibiteurs de NOS et COX (L-NAME + indométhacine) n'altère pas la courbe concentration-effet au U46619 (**Figure 3A et B**).

Ces données indiquent que l'inhibition de la NOS augmente la sensibilité de la réponse contractile au U46619 de la manière identique dans les artères mésentériques de rats SHAM et de rats IC alors que l'inhibition de la COX diminue la sensibilité au U46619 seulement dans les artères de rats SHAM.



**Figure 3** : Effet du L-NAME et de l'indométhacine sur la réponse contractile induite par le U46619 dans les artères méésentériques isolées de rats SHAM et IC.

Courbes concentration-effet au U46619 (1 nM - 3  $\mu$ M) réalisées sur des artères prétraitées en l'absence (Ctr) ou en présence de l'inhibiteur de la NOS (+ L-NAME, 300  $\mu$ M), de la COX (+ Indo, 10  $\mu$ M) ou de la combinaison des deux inhibiteurs (+ L-NAME + Indo) isolées de rats SHAM (A) et IC (B). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 *versus* Ctr (ANOVA).

### II.B.3. Effet de l'inhibition des PDE-AMPC sur la réponse contractile au U46619 des artères méésentériques de rats SHAM et IC

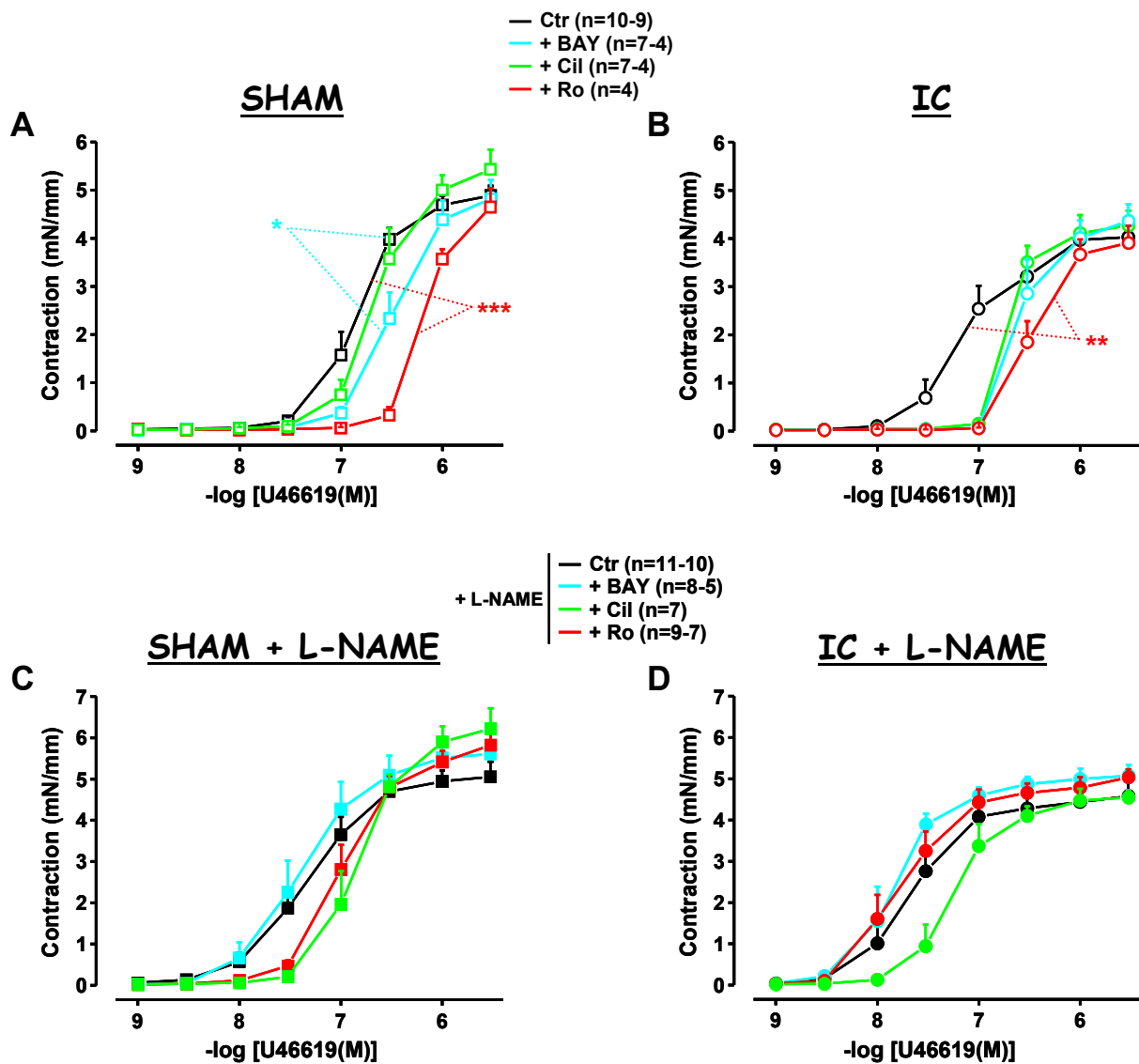
Afin de caractériser le rôle des principales familles de PDE-AMPC dans le contrôle du tonus vasculaire, nous avons incubé les artères méésentériques en présence des inhibiteurs sélectifs de PDE2 (BAY, 100 nM), PDE3 (Cil, 1  $\mu$ M) ou PDE4 (Ro, 10  $\mu$ M) avant de procéder à la réponse contractile au U46619. De plus, l'effet du blocage de la voie du NO par l'inhibiteur de la NOS (L-NAME, 300  $\mu$ M) a été évalué sur ces réponses contractiles au U46619 en présence des inhibiteurs de PDE.

Dans les artères méésentériques isolées de rats SHAM et IC, le prétraitement en présence de l'inhibiteur de PDE2 provoque un décalage des courbes concentration-effet au U46619 vers la droite par rapport à leur contrôle respectif, objectivé par une diminution des valeurs de pD<sub>2</sub> (de  $6,9 \pm 0,1$  à  $6,5 \pm 0,1$  en présence de BAY pour le groupe SHAM, n=10-7, P<0,01 ; et de  $7,1 \pm 0,2$  à  $6,6 \pm 0,1$  en présence de BAY pour le groupe IC, n=9-4, P<0,05), sans modification de la contraction maximale (Figure 4A et B). L'effet inhibiteur du BAY sur la contraction induite par le U46619 est totalement aboli lorsque la NOS est inhibée (+ L-NAME) dans les deux groupes de rats (Figure 4C et D).



L'inhibition de PDE3 ne modifie pas la réponse au U46619 dans les artères de rats SHAM (**Figure 4A**). Dans les artères de rats IC, on observe une tendance à un décalage de la courbe vers la droite en présence de Cil avec une diminution de la valeur de  $pD_2$  de  $7,1 \pm 0,2$  à  $6,7 \pm 0,1$  en présence de Cil (**Figure 4B**). Cependant, cette diminution n'est pas significative ( $n=9-4$ ,  $P=0,07$ ). En présence de L-NAME, un léger effet inhibiteur du Cil sur la contraction induite par le U46619 est révélé dans les artères de rats SHAM alors que celui observé dans les artères IC en condition contrôle est maintenu : ainsi, les valeurs de  $pD_2$  sont diminuées en présence de Cil, passant de  $7,4 \pm 0,1$  à  $6,9 \pm 0,1$  pour le groupe SHAM ( $n=11-7$ ,  $P<0,01$ ) et de  $7,7 \pm 0,1$  à  $7,2 \pm 0,1$  pour le groupe IC ( $n=10-7$ ,  $P<0,05$ ), sans modification de la contraction maximale (**Figure 4C et D**).

Dans les artères mésentériques des deux groupes de rat, le pré-traitement avec l'inhibiteur de PDE4 provoque un décalage des courbes concentration-effet au U46619 vers la droite par rapport à leur contrôle respectif (**Figure 4A et B**). Cet effet est soutenu par la diminution significative des valeurs de  $pD_2$  en présence de Ro, passant de  $6,9 \pm 0,1$  à  $6,1 \pm 0,1$  pour les rats SHAM ( $n=10-4$ ,  $P<0,001$ ) et de  $7,1 \pm 0,2$  à  $6,5 \pm 0,1$  pour les rats IC ( $n=9-4$ ,  $P<0,05$ ), sans modification de la contraction maximale. En présence de L-NAME, cet effet du Ro est aboli dans les artères de rats IC mais seulement atténué dans les artères de rats SHAM avec une diminution de la valeur de  $pD_2$  qui passe de  $7,4 \pm 0,1$  à  $7,0 \pm 0,1$  ( $n=11-9$ ,  $P<0,05$ ) (**Figure 4C et D**).



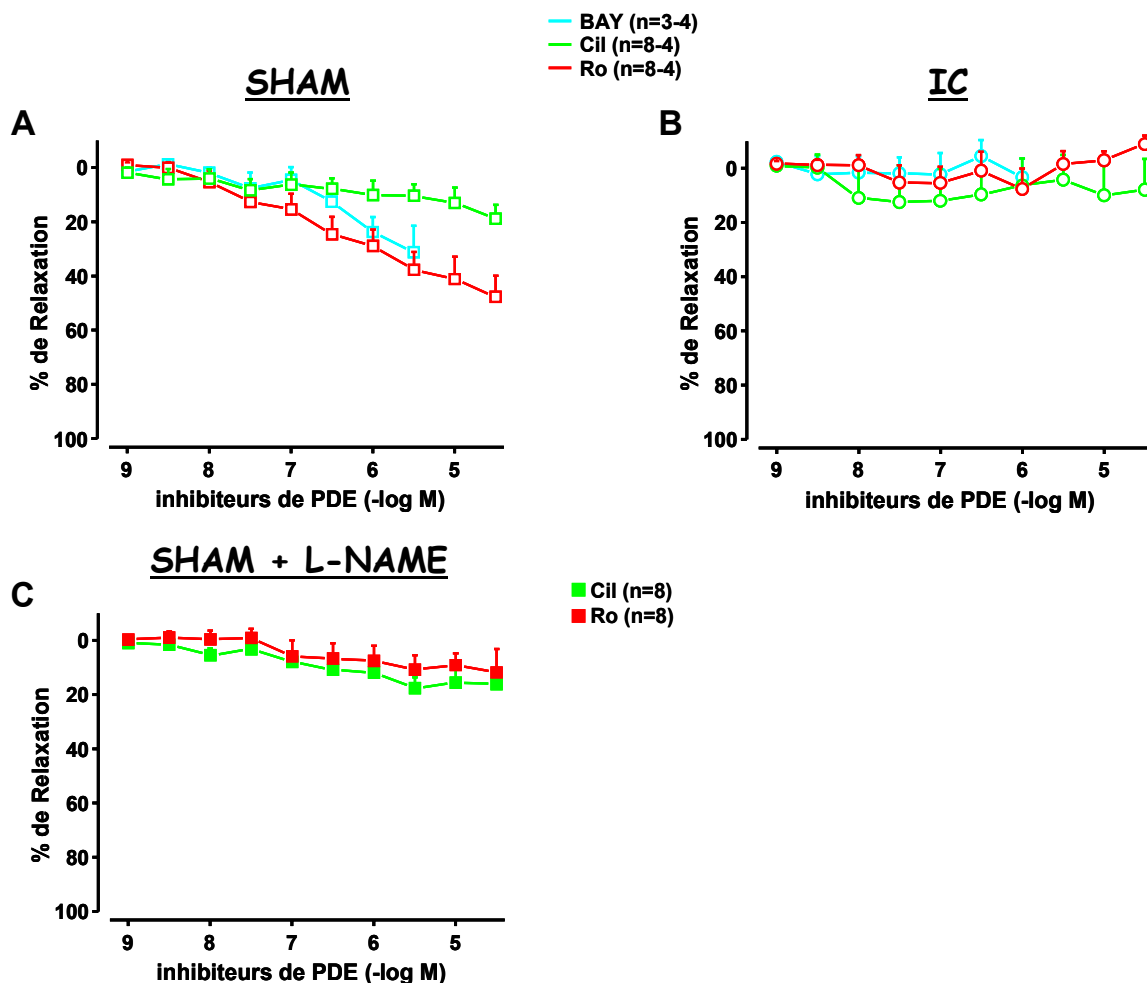
**Figure 4 : Effet de l'inhibition de PDE2, PDE3 et PDE4 sur la réponse contractile induite par le U46619 dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM et IC.**

Courbes concentration-effet au U46619 (1 nM - 3  $\mu$ M) réalisées sur des artères prétraitées en l'absence (Ctr) ou en présence de l'inhibiteur sélectif de PDE2 (+ BAY, 100 nM), PDE3 (+ Cil, 1  $\mu$ M) ou PDE4 (+ Ro, 10  $\mu$ M) isolées de rats SHAM (A et C) et IC (B et D). Les anneaux d'artères mésentérique sont incubés en absence (A et B) ou en présence de l'inhibiteur de NOS (+ L-NAME, 300 $\mu$ M, C et D). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 *versus* Ctr (ANOVA).

#### II.B.4. Effet des inhibiteurs de PDE-AMPC sur les artères mésentériques de rats SHAM et IC précontractées au U46619

Dans cette dernière série d'expériences, des courbes concentration-effet aux inhibiteurs sélectifs de PDE2 (BAY, 1nM - 3 $\mu$ M), PDE3 (Cil, 1 nM - 30  $\mu$ M) et PDE4 (Ro, 1nM - 30  $\mu$ M) ont été réalisées sur les anneaux d'artères mésentériques de rat pré-contractés avec le U46619 à la concentration fixe de 1  $\mu$ M.

Dans les artères isolées de rats SHAM, le BAY induit une relaxation concentration-dépendante avec un effet de  $31,3 \pm 9,7\%$  à la concentration maximale étudiée (**Figure 5A**). Dans ces artères, l'inhibition de PDE3 ne produit aucun effet relaxant, alors que le Ro produit une relaxation dépendante de la concentration (relaxation de  $47,7 \pm 7,8\%$  à la concentration maximale étudiée), qui est abolie en présence de L-NAME (**Figure 5A et C**). Ceci indique que l'effet relaxant induit par l'inhibition de PDE4 est dépendant de la voie du NO. La **Figure 5B** montre que dans les artères mésentériques de rats IC, aucun inhibiteur de PDE n'a la capacité d'induire une relaxation suite à la pré-contraction avec 1  $\mu$ M de U46619. L'absence d'effet relaxant des inhibiteurs de PDE chez les animaux IC pourrait être en partie liée à un tonus contractile trop élevé imposé par le U46619 à la concentration de 1  $\mu$ M.



**Figure 5 : Effet des inhibiteurs de PDE2, PDE3 et PDE4 dans les artères mésentériques de rats SHAM et IC pré-contractionnés avec le U46619.**

**A et B :** Courbes concentration-effet des inhibiteurs sélectifs de PDE2 (BAY, 1nM - 3µM), PDE3 (Cil, 1 nM - 30 µM) et PDE4 (Ro, 1nM - 30 µM) sur les anneaux d'artères mésentériques de rat pré-contractionnés avec le U46619 (1 µM) isolées de rats SHAM (**A**) et IC (**B**). **C :** Courbes concentration-effet des inhibiteurs sélectifs de PDE3 (Cil, 1 nM - 30 µM) et PDE4 (Ro, 1nM - 30 µM) sur les anneaux d'artères mésentériques de rat SHAM pré-contractionnés avec le U46619 (1 µM) en présence de l'inhibiteur de la NOS (+ L-NAME, 300 µM). Les résultats sont exprimés en % de relaxation par rapport au tonus précontractile et en moyenne ± ESM.

### **III. Conclusions**

Les principaux résultats de ces deux études explorant les conséquences d'une surcharge chronique de pression sur la réactivité de deux lits vasculaires différents, l'aorte et l'artère mésentérique, sont les suivants :

(1) Vingt-deux semaines après la sténose aortique, les rats présentent une hypertrophie cardiaque associée à une altération de la fonction cardiaque et à des signes périphériques congestifs marqués, témoignant d'un état d'IC.

(2) Cet état pathologique est associé à des altérations de la réactivité vasculaire : une hyperréactivité aux agents vasoconstricteurs et une dysfonction endothéliale avec diminution de la production basale et stimulée de NO ont été observées dans l'aorte de rat ; dans l'artère mésentérique, les altérations sont faibles avec une légère hyporéactivité aux agents vasoconstricteurs et une faible diminution de la réponse relaxante à l'acétylcholine sans modification de la production basale de NO.

(3) Bien que le profil d'activité des PDE-AMPC soit identique dans les deux lits vasculaires ( $PDE3 > PDE4 > PDE1$ ), l'activité globale PDE-AMPC est cinq fois plus faible dans les artères mésentériques par rapport à l'aorte de rat. Les aortes issues de rats IC présentent un profil d'activité similaire à celui des aortes de rats SHAM, et seule une diminution légère mais significative de l'activité PDE4 a été observée dans les anneaux désendothélialisés. Nos résultats préliminaires réalisés sur les artères mésentériques de rat IC (n=3) semblent indiquer une importante diminution de l'activité PDE-AMPC totale qui pourrait être liée à la réduction de l'activité PDE3 observée chez ces rats malades. Ceci reste à confirmer.

(4) Dans l'aorte de rat, les PDE3 et PDE4 contrôlent les concentrations d'AMPC basales et stimulées par les récepteurs  $\beta$ -AR dans l'aorte de rat. La PDE3 ne nécessite pas d'endothélium fonctionnel, mais le NO endothélial exerce un effet inhibiteur sur son activité. En revanche, la PDE4 nécessite la présence d'un endothélium fonctionnel et sa fonction est sous le contrôle négatif de la PDE3. Dans les aortes de rat IC, la fonction de la PDE3 est préservée et négativement contrôlée par des facteurs endothéliaux dépendants de la NOS et de la COX, alors que la fonction PDE4 est masquée par la PDE3. En l'absence d'endothélium fonctionnel, situation observée dans les artères de rats SHAM pour lesquelles l'endothélium a été mécaniquement lésé et dans les artères de rats IC présentant une dysfonction endothéliale intrinsèque, la relaxation  $\beta$ -AR est supprimée mais restaurée par l'inhibition de la PDE3.

(5) Dans l'artère mésentérique de rat, les activités NOS et COX contrôlent la réponse contractile au U46619. Le contrôle par la NOS est préservé dans notre modèle d'IC, alors que le contrôle par la COX disparaît. Dans ce lit vasculaire, la PDE4 et la PDE2 contrôlent les concentrations d'AMPc basales. L'activité PDE2 nécessite la présence d'une NOS fonctionnelle, alors que l'inhibition de la NOS révèle une activité PDE3. Dans les artères mésentériques de rats IC, la fonction de la PDE2 et de la PDE4 est conservée, et nos données préliminaires semblent indiquer la participation de la PDE3, indépendamment de la présence d'un endothélium fonctionnel.

Cette étude met en évidence de nombreuses différences de l'effet de l'IC entre les artères de conductance (aorte) et de résistance (mésentérique). Tout d'abord la dysfonction vasculaire est différente, cela pouvant s'expliquer par une variation de la contribution des facteurs endothéliaux au tonus vasculaire entre les deux lits vasculaire. De plus nous avons montré des modifications de la fonction des PDE-AMPc dans l'aorte et l'artère mésentérique qui ne sont pas identiques mais qui peuvent, dans les deux cas, participer à la dysfonction vasculaire observée dans l'IC. Toutefois, cette étude nécessite une exploration plus approfondie des processus impliqués dans l'altération de la fonction vasculaire lors de l'IC et notamment la relation avec les modifications de l'activité et de la fonction des PDE-AMPc.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

L'objectif de mon travail de thèse était de mieux comprendre le rôle des différentes familles de PDE dans la régulation de la signalisation dépendante de l'AMPc dans les CMLVs ainsi que leur implication fonctionnelle dans la réactivité vasculaire et son altération dans un modèle physiopathologique, l'IC. Mon travail s'est articulé autour de deux modèles de muscle lisse vasculaire : (1) des CMLVs isolées en culture ayant acquis un phénotype synthétique sur lesquelles une approche d'imagerie en temps réel a été appliquée afin de visualiser *in situ* la dynamique spatiotemporelle des signaux dépendants de l'AMPc ; (2) des anneaux d'artères intactes permettant d'étudier leur fonction contractile et donc la régulation de celle-ci par la voie de l'AMPc.

La culture cellulaire est connue pour induire un changement phénotypique des CMLV associé à des modifications de l'expression et de l'activité des PDEs (Liu *et al.*, 2000; Dunkerley *et al.*, 2002). Nous avons observé que dans notre modèle de CMLVs isolées d'aorte de rat et utilisées aux passages 2 à 6, le profil d'activité PDE-AMPc est le suivant : PDE4 > PDE1, PDE3, la PDE4 représentant environ 40% de l'activité totale de l'hydrolyse de l'AMPc, tandis que les PDE1 et PDE3 représentent chacune 20% de cette activité totale. Ce profil est différent de celui observé dans les artères fraîchement dissociées, l'aorte et l'artère mésentérique des rats SHAM âgés de 25 semaines, qui présentent une activité PDE3 dominante (de l'ordre de 50-60% de l'activité totale) et le profil suivant : PDE3 > PDE4 > PDE1. Ces profils d'activité sont cohérents avec ceux décrits dans la littérature (Polson & Strada, 1996; Rybalkin & Bornfeldt, 1999; Dunkerley *et al.*, 2002; Maurice *et al.*, 2003). L'existence de ces modifications phénotypiques montrent une régulation fine de l'expression des PDEs selon les conditions expérimentales, physiologiques ou physiopathologiques et soulignent l'importance de la caractérisation phénotypique des modèles étudiés.



## Rôle des PDEs dans la compartimentation intracellulaire de l'AMPc dans les CMLV en culture

Dans cette étude, nous avons évalué le rôle de chaque famille de PDE-AMPc dans la régulation de la dynamique spatio-temporelle des signaux AMPc dans les CML d'aortes de rat en culture.

### ✓ Caractérisation du profil d'expression et activité des PDE-AMPc dans les CMLV en culture

L'étude de l'activité hydrolyse PDE-AMPc a été réalisée sur des CML d'aorte de rat en culture sub-confluentes (données de l'article (Zhai *et al.*, 2012)). Comme indiqué précédemment, nous avons confirmé la prédominance de l'activité PDE4 *versus* PDE3 dans ces cellules. Dunkerley *et al* ont décrit que l'inversion du ratio d'activité PDE3/PDE4 dans le phénotype synthétique est la conséquence d'une diminution d'activité de la PDE3 associée à une diminution de l'expression de la PDE3A, sans modification de la PDE3B (Dunkerley *et al.*, 2002). Nos expériences de RT-PCR ont permis de détecter les ARNm codant pour les deux isoformes de PDE3 (3A et 3B) et trois isoformes de PDE4 (4A, 4B et 4D) dans les cellules cultivées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le dosage d'activité, avec une expression de PDE3B supérieure à PDE3A, en accord avec l'étude précédente. Outre les activités PDE3 et PDE4, une activité PDE1 de l'ordre de 20% a été révélée par l'utilisation du MIMX à une concentration de 10  $\mu$ M, concentration à laquelle sa sélectivité pour PDE1 reste partielle (Ahn *et al.*, 1997; Rich *et al.*, 2001). Cependant, cette activité PDE1 est corrélée à l'expression des ARNm codant pour les isoformes PDE1A et 1C. La présence de PDE1A sans expression de PDE1B est classiquement décrite dans les CMLV synthétiques (Rybalkin *et al.*, 1997; Nagel *et al.*, 2006), alors que l'expression de PDE1C dépend des conditions de culture. Seule une étude a mis en évidence l'expression de la PDE1C dans des CMLVs d'aorte de rat cultivées sur une matrice bidimensionnelle de monomère de collagène de type I (Cai *et al.*, 2011). Le modèle cellulaire et les conditions de culture similaires aux nôtres pourraient expliquer le profil d'expression des isoformes de PDE1 comparable entre nos deux études. Enfin, nous avons confirmé l'absence d'expression et d'activité de la PDE2 dans nos conditions, comme indiqué dans de précédents travaux (Rose *et al.*, 1997). Ainsi, les CMLs d'aorte de rat en culture arborent des activités PDE1, PDE3 et PDE4 dont l'ensemble

contribue à 80% de l'activité PDE-AMPC totale, alors que la fraction sensible à l'IBMX représente environ 96% de l'activité totale. Cela suggère que : (1) les concentrations des inhibiteurs de PDE ne sont pas suffisantes pour bloquer totalement les activités de chaque famille de PDE lors du dosage d'activité. Cependant, l'augmentation des concentrations de ces inhibiteurs risquerait de réduire leur sélectivité ; (2) d'autres familles de PDE, PDE7, PDE8, PDE10 et/ou PDE11, participent à l'hydrolyse de l'AMPC. Ainsi, nous avons montré que les CMLVs d'aorte de rat en culture expriment les ARNm codant pour PDE7A, PDE7B et PDE8A. Bien que peu d'études aient évalué l'implication des familles de PDE7 et PDE8 dans le système cardiovasculaire, leurs expressions ont été mises en évidence dans les CMLVs systémiques de rat (Phillips *et al.*, 2005). L'expression de PDE10 et PDE11 mériterait également d'être recherchée. L'étude fonctionnelle de ces familles de PDE décrites plus récemment est limitée par les outils pharmacologiques à notre disposition. En utilisant un inhibiteur de PDE7 récemment décrit (le BRL 50481) (Smith *et al.*, 2004), l'activité PDE-AMPC totale est diminuée de 16%, mais le BRL n'a aucun effet additif à celui induit par l'association des inhibiteurs de PDE1, PDE3 et PDE4. En outre, BRL ne modifie pas le niveau d'AMPC mesuré par FRET dans les cellules vivantes. Ainsi, l'effet propre du BRL observé *in vitro* dans les lysats cellulaires pourrait s'expliquer par une action non sélective sur d'autres PDE que la PDE7, en particulier PDE4, du fait de son profil d'affinité (Smith *et al.*, 2004). Par conséquent, le rôle fonctionnel de PDE7 mais également de PDE8 dans les CMLVs reste à élucider en utilisant des outils plus spécifiques, soit pharmacologiques, soit génétiques (approches de siRNA).

De manière intéressante, nous avons observé que le niveau d'expression des ARNm codant pour les différentes isoformes de PDE variait avec la densité des cellules en culture. Ainsi, on observe une diminution de l'expression de plusieurs ARNm codant pour les isoformes de PDE-AMPC (PDE7B de 5 fois, PDE1A et 3A de 3 fois, PDE4B de 2 fois, PDE3B et PDE4A) dans des cellules isolées par rapport à des cellules sub-confluentes, maintenues en culture pendant des durées identiques. Des études ont montré que le degré de confluence des CMLs en culture modifie leur phénotype (Vallot *et al.*, 2001; Matsushita *et al.*, 2007). Le phénotype synthétique est en corrélation avec le taux de prolifération des CMLs, et le nombre de phases S des CMLs augmente de 3% *in vivo* à 50% en culture primaire. De plus, l'augmentation de la densité cellulaire des CML en culture semble augmenter l'expression de marqueurs du phénotype contractile (Cornwell *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 2007). Par ailleurs, la voie de signalisation du GMPc (Boerth *et al.*, 1997;

Rybalkin & Bornfeldt, 1999) a été montrée comme diminuée lors de la différenciation des CMLs, et la surexpression de la PKG est capable d'induire la re-différenciation de ces cellules vers un phénotype contractile (Brophy *et al.*, 2002; Dey *et al.*, 2005; Lincoln *et al.*, 2006). Suite à ces observations, il est suggéré que la PDE3A, dont l'activité d'hydrolyse de l'AMPc est inhibée par le GMPc, pourrait faire partie de la liste des enzymes GMPc-dépendantes dont l'expression est liée au phénotype (Dunkerley *et al.*, 2002). L'AMPc peut également moduler l'activité et l'expression des PDEs. L'incubation prolongée de CMLVs en culture (phénotype synthétique) ou bien *in vivo* (phénotype contractile) avec des agents élevant le niveau d'AMPc augmente l'expression de différentes isoformes de PDE3 et PDE4 (PDE4D1, PDE4D2 dans les CMLVs en culture et PDE3A, PDE3B, PDE4D3 dans les CMLVs *in vivo*) (Liu *et al.*, 2000; Tilley & Maurice, 2002). Ainsi, une hypothèse serait que nos cellules utilisées en conditions sub-confluentes pourraient avoir initié un processus de re-différenciation, même si leur profil d'activité PDE reste un profil de cellules synthétiques. D'un point de vue fonctionnel, il serait intéressant de corrélérer l'expression des ARNm à l'activité d'hydrolyse PDE-AMPc dans les cellules isolées. Indirectement, nos études de FRET suggèrent que l'activité PDE-AMPc est inférieure dans les CMLVs isolées par rapport aux cellules sub-confluentes, puisque le signal AMPc mesuré à l'aide du même senseur (Epac2-camps) présente une cinétique plus lente dans les CMLV isolées par rapport aux cellules sub-confluentes (Figure 3, page 133), suggérant une participation moindre des PDE dans la dégradation de l'AMPc dans ces cellules isolées. Par ailleurs, nos études d'imagerie de FRET réalisées dans ces deux types de cellules indiquent que les différences d'expression des familles de PDE sont associées à des participations différentes de ces enzymes dans la régulation des signaux AMPc.

✓ **Rôle des familles de PDE-AMPc dans le contrôle des signaux AMPc cytosolique et sous-membranaire dans les CMLVs en culture**

Nous avons évalué la contribution fonctionnelle des familles de PDE-AMPc dans le contrôle du niveau d'AMPc intracellulaire grâce à la technique de FRET, couramment utilisée à cette fin dans d'autres types cellulaires (Leroy *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2012). Les signaux AMPc déclenchés par une stimulation brève des récepteurs  $\beta$ -ARs à l'isoprénaline sont nettement prolongés suite à l'inhibition non-sélective des PDEs par l'IBMX, ce qui démontre que les PDEs jouent un rôle clé dans la modulation des concentrations intracellulaires d'AMPc dans les CMLVs d'aorte de rat. Toutefois, même en présence d'IBMX, le signal

AMPC n'est pas stable dans le temps et diminue lentement. Ce phénomène est similaire dans les deux compartiments intracellulaires étudiés, le compartiment cytosolique et le compartiment membranaire. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène: **(1)** une inhibition incomplète de l'activité PDE par l'IBMX ; **(2)** la participation d'une famille de PDE insensible à l'IBMX, comme la PDE8 dont l'ARNm a été détecté dans nos cellules. Cependant, nous n'avons pas pu caractériser la fonction de PDE8 dans notre modèle car aucun inhibiteur sélectif n'est actuellement commercialisé ; **(3)** la diminution de la concentration d'AMPC en raison de son extrusion hors de la cellule via une protéine transmembranaire, la MRP-4 (Sassi *et al.*, 2008). De plus, une étude récente a souligné que l'inactivation de MRP4 est susceptible de diminuer l'activité PDE ce qui participerait à l'augmentation du niveau d'AMPC intracellulaire provoquée par l'inhibition de l'efflux (Xie *et al.*, 2011). La participation de MRP4 dans le contrôle des signaux AMPC pourrait être évalué par son inactivation grâce à une approche de siRNA ; et **(4)** les propriétés biophysiques des sonde sensibles à l'AMPC Epac1-camps et Epac2-camps (Nikolaev *et al.*, 2004).

La contribution des familles de PDE à la réponse AMPC induite par l'isoprénaline a été analysée par une approche pharmacologique, en utilisant les inhibiteurs sélectifs des familles de PDEs aux concentrations identiques à celles utilisées dans le dosage de leur activité. Dans notre première série d'expériences mesurant l'AMPC cytosolique dans les CMLVs sub-confluentes avec la sonde plasmidique Epac1-camps (données de l'article (Zhai *et al.*, 2012)), nous avons décrit un profil d'activité fonctionnelle des PDE-AMPC en parfaite adéquation avec leur profil d'activité biochimique décrit dans ces mêmes cellules, la PDE4 étant la famille la plus importante. Ainsi, nous avons montré que la PDE4 masque la contribution fonctionnelle de PDE1 et PDE3 qui n'est révélée que suite à l'inhibition de PDE4. Une explication pourrait être que lors de l'inhibition de la PDE de type 4, les activités enzymatiques des PDE1 et PDE3 sont accrues pour atteindre un niveau leur permettant d'hydrolyser l'AMPC dans les cellules vivantes. Il est en effet connu que l'activité de la PDE3 est augmentée par phosphorylation via la PKA (Degerman *et al.*, 1997), et cela pourrait survenir suite à l'augmentation de l'AMPC induite par l'inhibition de PDE4. Cependant, la régulation de l'activité PDE1 par la PKA est opposée car sa phosphorylation entraîne une diminution de son activité (Omori & Kotera, 2007), ce qui suggère que cette hypothèse est peu probable pour la PDE1. Dans les cardiomyocytes, il a été montré que la contribution de la PDE3 à l'hydrolyse de l'AMPC à la membrane et dans le cytosol ne se révèle que suite à l'inhibition de la PDE4. De manière comparable à ce que nous observons dans les CMLVs, il

apparaît que la PDE4 est capable de compenser l'inhibition de la PDE3 dans les cardiomyocytes, notamment dans le cytosol et au voisinage des canaux calciques de type L. Les auteurs suggèrent que cela pourrait être lié à l'intégration de la PDE4 dans des complexes de signalisation par sa liaison aux protéines d'ancrages, les AKAPs, facilitant ainsi l'activation de la PDE4 par la PKA (Leroy *et al.*, 2008).

Nous avons poursuivi nos investigations, en nous focalisant essentiellement sur le rôle fonctionnel de la PDE3 par rapport à la PDE4. Nous avons observé que la participation de la PDE3 dans la régulation de la réponse  $\beta$ -adrénergique était dépendante de la densité des CMLVs étudiées (Table 1 de la partie résultats). En effet, nous avons pu comparer l'effet de l'inhibition de la PDE3 sur la concentration en AMPc cytosolique en réponse à l'isoprénaline, dans les cellules isolées et les cellules sub-confluentes, en utilisant la même sonde FRET, Epac2-camps (ce qui permet de s'affranchir des propriétés intrinsèques du senseur), sonde adénovirale dont l'expression a pu être assurée dans ces deux types de cellules. Comme nous l'avons observé avec la sonde plasmidique Epac1-camps, l'inhibition de PDE3 ne modifie pas la réponse  $\beta$ -adrénergique cytosolique mesurée avec Epac2-camps dans les cellules sub-confluentes (en l'absence ou en présence de lipofectamine, pour mimer les conditions de transfection), alors que dans les cellules isolées, l'inhibition de PDE3 prolonge significativement sa durée (augmentation du  $t_{1/2\text{off}}$ ). L'apparition de l'effet de l'inhibition de PDE3 dans les CMLVs isolées pourrait s'expliquer par une augmentation de l'activité PDE3 par rapport aux cellules sub-confluentes. Curieusement, nous avons observé l'effet opposé sur l'expression génique de PDE3, avec une expression moindre des ARNm codant pour PDE3A et PDE3B dans les cellules isolées. Il serait naturellement nécessaire de vérifier l'incidence de cette modification d'expression génique sur l'expression protéique et fonctionnelle de cette PDE3. Cependant, à ce stade, nous ne pouvons pas expliquer l'apparition du rôle fonctionnel de la PDE3 dans les cellules isolées par une augmentation de son expression, d'autant que l'expression de la PDE3A, décrite comme étant majoritairement cytosolique (Dunkerley *et al.*, 2002), est fortement réduite dans ces conditions. Une autre hypothèse repose sur la diminution de l'expression des ARNm codant pour PDE4A et 4B dans les cellules isolées par rapport aux cellules sub-confluentes. Une expression réduite de PDE4 permettrait à l'AMPc de diffuser vers un compartiment subcellulaire accessible à la PDE3. Dans cette optique, il serait intéressant de comparer d'une part, l'activité PDE4 dans les deux modèles cellulaires et, d'autre part, la participation de PDE4 dans la régulation de la réponse  $\beta$ -adrénergique initiée

dans les cellules isolées et les cellules sub-confluentes, en utilisant la sonde adénovirale cytosolique Epac2-camps.

Le rôle des PDEs dans la compartimentation du signal AMPc afin de limiter sa diffusion a été largement étudié, en particulier dans les cardiomyocytes (Fischmeister *et al.*, 2006). Pour explorer ce phénomène de compartimentation spatiale de l'AMPc intracellulaire dans les CMLVs, nous avons mesuré l'AMPc au niveau de la membrane plasmique. Pour ce faire, nous avons utilisé la sonde FRET Lyn-Epac2-camps adressée à la membrane, à l'aide de la séquence SH4 de la protéine Lyn (Wachten *et al.*, 2010), dans les CMLVs isolées. Nous avons observé que, dans ces conditions, la PDE3 et la PDE4 agissent de façon synergique pour hydrolyser l'AMPc sous-membranaire produit par la stimulation  $\beta$ -adrénergique. Ainsi, dans les cellules isolées, les PDE3 et PDE4 contribuent conjointement à la régulation des signaux AMPc  $\beta$ -adrénergiques sous-membranaire et cytosolique. La participation des différentes isoformes de PDE3 et 4 dans ces réponses mériterait d'être recherchée, afin de vérifier s'il existe une localisation préférentielle de ces différentes isoformes selon les compartiments subcellulaires, comme il l'a été décrit notamment pour les isoformes des PDE4 dans le cardiomyocyte (Richter *et al.*, 2008). Il sera également important de vérifier si la participation de la PDE3 dans le contrôle de l'AMPc sous-membranaire est conservée ou non dans des cellules sub-confluentes.

✓ **Implication des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs dans les signaux AMPc cytosolique et sous-membranaire dans les CMLV en culture**

Nous avons également analysé la contribution des sous-types de récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs dans la réponse à l'isoprénaline des CMLVs, à l'aide d'antagonistes sélectifs de ces deux sous-types de récepteurs. La sélectivité de l'antagoniste  $\beta_1$  (CGP 20712A à la concentration de 100 nM) a été vérifiée par son absence d'effet sur une réponse à un agoniste sélectif du récepteur  $\beta_2$ -AR, le formotérol (0,1 nM). La sélectivité de l'antagoniste  $\beta_2$  (ICI 118551 à la concentration de 5 nM) n'a pas été vérifiée dans nos conditions, en raison de l'absence de signal FRET analysable en réponse à un agoniste sélectif  $\beta_1$ -AR. Cependant, les données de la littérature suggèrent qu'à cette concentration, la liaison de l'ICI 118551 au récepteur  $\beta_1$ -AR est négligeable (Nikolaev *et al.*, 2006). Dans cette étude, nous n'avons pas étudié le sous-type  $\beta_3$ -adrénergique, car son expression vasculaire a été essentiellement décrite dans les cellules endothéliales (Trochu *et al.*, 1999; Dessy *et al.*, 2004; Dessy *et al.*, 2005). Cependant, une modification de son expression lors du processus de différenciation des CMLVs en culture

n'est pas à exclure. Nos données montrent que les deux sous-types de récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs contribuent à la réponse FRET à l'isoprénaline mesurée dans le compartiment cytosolique des CMLVs sub-confluentes (avec la sonde Epac1-camps), le sous-type  $\beta_2$  étant prédominant. Au contraire, seul le sous-type de récepteur  $\beta_2$ -AR est impliqué dans la réponse FRET à l'isoprénaline mesurée dans le compartiment sous-membranaire dans les CMLVs isolées (avec la sonde Lyn-Epac2-camps). Nos données préliminaires obtenues avec la sonde adénovirale Epac2-camps cytosolique exprimée dans des CMLVs isolées montrant une diminution de 29% de l'amplitude de la réponse à l'isoprénaline en présence de CGP 20712A (diminution non significative, certainement en raison d'une variabilité de la réponse contrôle à l'isoprénaline), suggèrent que la participation du récepteur  $\beta_1$ -AR à la réponse à l'isoprénaline ne dépend pas de la confluence des cellules, mais du compartiment sub-cellulaire étudié (Table 1 de la partie résultats). Ceci devra être confirmé d'une part, en augmentant le nombre d'expériences réalisées avec la sonde adénovirale Epac2-camps cytosolique dans des CMLVs isolées, et d'autre part, en vérifiant l'absence d'effet de la densité cellulaire sur la contribution du sous-type  $\beta_1$ -AR dans la réponse mesurée avec la sonde Lyn-Epac2-camps dans le compartiment sous-membranaire. Si ces éléments sont vérifiés, il apparaîtrait ainsi que la contribution des sous-types  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs dans la réponse à l'isoprénaline varie en fonction du compartiment sub-cellulaire étudié. Une première hypothèse pouvant expliquer l'absence de contribution du sous-type  $\beta_1$  dans le compartiment sous-membranaire serait une dégradation rapide de l'AMPc produit par la stimulation de ce récepteur par la présence de PDEs localisées à proximité immédiate de celui-ci. Cependant, nous avons observé que la présence d'un inhibiteur des PDEs (IBMX) ne permet pas de restaurer un effet antagoniste du CGP 20712A sur la réponse FRET sous-membranaire à l'isoprénaline (Figure 2, page 130), suggérant qu'une hyperactivité PDE n'est pas impliquée dans l'absence de réponse  $\beta_1$ -adrénergique sous-membranaire. Une autre hypothèse repose sur une localisation différente des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs dans des structures membranaires spécialisées telles que les radeaux lipidiques (régions membranaires de composition lipidique particulière, enrichies notamment en cholestérol) et les cavéoles (raft lipidiques enrichis en une protéine spécifique, la cavéoline, et formant des invaginations caractéristiques) (Ostrom *et al.*, 2002; Steinberg, 2004; Insel *et al.*, 2005). Dans les CMLVs, les trois isoformes de cavéoline sont présentes. La cavéoline 1 est l'isoforme majoritaire et les cavéolines 1 et 3 assureraient la formation des cavéoles (Bergdahl & Sward, 2004). Le rôle des cavéoles dans la formation de plateformes de signalisation est clairement admis. Ainsi, dans les

cardiomyocytes, il est reconnu que la signalisation du récepteur  $\beta_2$ -AR implique les structures cavéolaires, alors que celle du récepteur  $\beta_1$ -AR est plus diffuse (Rybin *et al.*, 2000; Steinberg, 2004). Une étude récente de Nikolaev *et al.*, utilisant une technique originale de FRET couplée à la topographie cellulaire (SCIM : scanning ion conductance microscopy), a mis en évidence que l'interaction des récepteurs  $\beta_2$ -ARs avec les domaines membranaires enrichis en cholestérol (rafts lipidiques, cavéoles) est importante pour le confinement et la compartimentation du signal AMPc produit par la stimulation de ces récepteurs dans les tubules transverses des cardiomyocytes (Nikolaev *et al.*, 2010).

Dans les CMLVs, l'existence d'une telle compartimentation membranaire des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs est moins claire. Ostrom *et al.* ont montré, par fractionnement membranaire sur gradient de sucrose et détection immunochimique des protéines, que dans les CMLVs d'aorte de rat en culture, le sous-type  $\beta_1$  est principalement exprimé dans les fractions membranaires non-cavéolaires, et le sous-type  $\beta_2$  uniquement détecté dans ces fractions non-cavéolaires. Au contraire, les AC3 et AC5/6 sont détectées dans les deux types de fractions (Ostrom *et al.*, 2002). La limite de cette étude biochimique réside dans l'utilisation d'anticorps dont la sélectivité peut être discutée, et dans l'absence d'évaluation du rôle fonctionnel de ces cavéoles dans la signalisation  $\beta$ -adrénergique.

Par ailleurs, la séquence d'adressage membranaire de la sonde Lyn-Epac2-camps est la séquence SH4 de la protéine Lyn kinase qui a été démontrée comme conférant une localisation cavéolaire aux protéines cibles (Zacharias *et al.*, 2002; Wachten *et al.*, 2010). Cette spécificité d'adressage de notre sonde FRET aux cavéoles devra être vérifiée dans nos conditions expérimentales. Cependant, il est tentant de proposer que la sonde FRET Lyn-Epac2-camps s'exprime spécifiquement dans les cavéoles, à proximité du récepteur  $\beta_2$ -AR, alors que le récepteur  $\beta_1$ -AR est exclu de ces domaines membranaires et que l'AMPc produit par ce récepteur n'est pas détecté par la sonde.

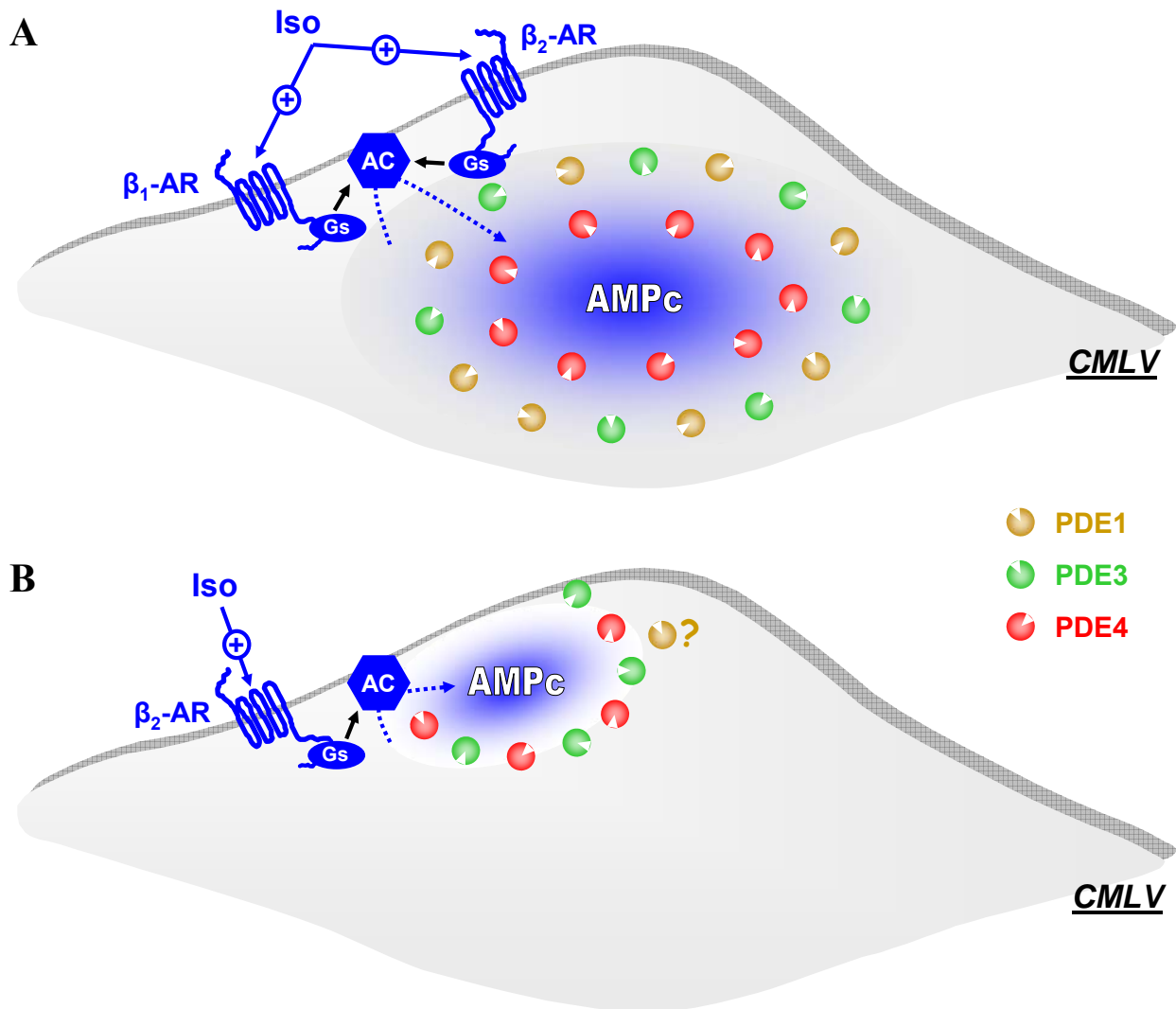
Afin de tester cette hypothèse, il sera nécessaire de caractériser la sonde Lyn-Epac2-camps en terme de localisation membranaire dans notre modèle cellulaire, et de déterminer la distribution subcellulaire des partenaires protéiques impliqués dans la signalisation  $\beta$ -adrénergique. Dans un deuxième temps, une autre sonde FRET membranaire, adressée cette fois-ci aux régions non-radeaux lipidiques de la membrane grâce à l'ajout du motif CAAX (C=cystéine, A=acide aminé aliphatique, X=acide aminé) (Zacharias *et al.*, 2002), sera utilisée afin d'analyser la participation relative des deux sous-types de récepteurs  $\beta$ -ARs à la réponse à l'isoprénaline dans ce compartiment sous-membranaire. Enfin, l'effet de la



destruction des radeaux lipidiques/cavéoles (obtenue chimiquement par un agent chélateur du cholestérol ou génétiquement par délétion de l'expression de la cavéoline) sur la réponse à l'isoprénaline sera évalué.

Si une telle compartimentation des récepteurs  $\beta$ -ARs est confirmée dans notre modèle de CMLV, il sera alors intéressant de rechercher s'il existe une spécificité des isoformes de PDE dans la régulation des signaux AMPc générés par l'un ou l'autre des deux sous-types de récepteurs, comme décrit dans les cardiomyocytes de rat (Christ *et al.*, 2009).

En conclusion, cette étude souligne l'importance des PDEs dans le contrôle spatiotemporel des niveaux d'AMPc intracellulaire dans les CMLVs en culture (**Figure 32**). Cette régulation est principalement réalisée par les familles de PDE3 et 4 qui représentent 60% de l'activité PDE-AMPc totale dans nos cellules. Cependant, la contribution de la PDE3 est dépendante de la densité des CMLVs en culture qui provoque une modification des niveaux d'expression des PDEs. Indépendamment des différences de densité cellulaire, nous avons démontré que le signal AMPc mesuré dans le cytosol en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique est médié par les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs alors que seuls par les récepteurs  $\beta_2$ -ARs participent au signal AMPc mesuré dans le compartiment sous-membranaire. L'absence de réponse  $\beta_1$ -adrénergique dans le compartiment sous-membranaire pourrait s'expliquer par la compartimentation du signal AMPc et la distribution des récepteurs  $\beta_2$ -ARs dans des structures spécialisées (radeaux lipidiques et cavéoles).



**Figure 32** : Schémas récapitulatifs de l'implication des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs et du rôle des PDEs dans la compartimentation intracellulaire de l'AMPc dans les CMLVs en culture.

**A** : Le signal AMPc cytosolique, généré par les deux sous-types  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs suite à une stimulation à l'isoprénaline, est principalement contrôlé par la PDE4 dont l'inhibition démasque une participation de PDE1 et PDE3 à l'hydrolyse de l'AMPc dans les CMLVs sub-confluentes. Cependant, une contribution directe de la PDE3 est révélée lorsque les CMLVs sont isolées. **B** : Le signal AMPc mesuré dans le compartiment sous-membranaire (à l'aide d'une séquence d'adressage membranaire de type SH4 de la protéine Lyn kinase) implique uniquement les récepteurs  $\beta_2$ -ARs dans les CMLVs isolées. Les PDE3 et PDE4 participent conjointement à sa régulation alors que la contribution de la PDE1 n'a pas été évaluée.

## Rôle des PDE-AMPC dans la réactivité vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle fonctionnel des principales familles de PDE-AMPC (PDE2, PDE3 et PDE4) dans le contrôle de la vasomotricité, et à ses altérations potentielles en situation pathologique, l'IC consécutive à une surcharge barométrique. Ce modèle de sténose de l'aorte ascendante permet la transition entre le stade d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques, et reproduit la sténose observée chez les personnes âgées (Hasenfuss, 1998; Houser *et al.*, 2012). Dans ce modèle, des altérations de l'activité des PDE-AMPC cardiaques ont été décrites au stade précoce d'hypertrophie cardiaque (Abi-Gerges *et al.*, 2009). Par ailleurs, étant donnée l'hétérogénéité fonctionnelle des lits vasculaires, notre étude a porté sur deux types d'artères, une artère de conductance, l'aorte thoracique, et une artère de résistance, les artères mésentériques. Il faut noter que l'aorte thoracique, située en aval de la sténose, est soumise à une pression et à un flux réduits, paramètres que nous n'avons pas déterminés dans notre modèle.

### ✓ **Altération de la fonction vasculaire dans les artères de rats IC**

Les artères issues de notre modèle de rat IC présentent une dysfonction vasculaire, dont la nature et l'intensité varient selon le lit vasculaire. L'aorte thoracique se caractérise par une hyper-réactivité aux agents contractants ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  et solution hyperpolarisante de KCl 60 mM) et une dysfonction endothéliale révélée par la diminution de la vasorelaxation muscarinique (NOS-dépendante) et la perte de l'effet potentialisateur de l'endothélium sur la réponse contractile à la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Ces altérations sont classiques des dysfonctions vasculaires décrites dans l'IC (Francis & Cohn, 1990; Negro *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001). Les artères mésentériques présentent au contraire une diminution de la réponse contractile aux solutions hyperpolarisantes de KCl (60 et 120 mM) et à l'analogue du TXA<sub>2</sub>, le U46619, associée à faible diminution de la sensibilité de la réponse relaxante muscarinique.

L'agent contractant récepteuriel utilisé dans l'artère mésentérique est différent de celui utilisé dans l'aorte, car la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ne permettait pas d'obtenir une contraction stable dans ce lit vasculaire. Cependant, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et l'U46619 agissent par l'intermédiaire de récepteurs aux prostanoïdes dont les voies de signalisation sont similaires. De plus, dans les deux lits

vasculaires, les altérations de la réponse contractile sont observées aussi bien avec une solution hyperpolarisante qu'une activation réceptorielle, suggérant que ces altérations sont indépendantes de la nature de l'agent contractant.

Il est reconnu que la dysfonction vasculaire observée lors de l'IC dépend du lit vasculaire étudié et de la nature des facteurs dérivés de l'endothélium contribuant à la régulation de sa fonction (Baggia *et al.*, 1997). Une étude a notamment montré dans un modèle d'IC chez le rat par ligature coronaire, que dans les artères mésentériques, la relaxation muscarinique est faiblement altérée du fait d'une augmentation de la contribution des EDHF compensant une diminution de la contribution du NO dans cet effet relaxant. Cette augmentation de la part EDHF permettrait donc de préserver la fonction endothéliale (Malmsjo *et al.*, 1999). A l'inverse, dans une autre étude sur le même modèle d'IC, il a été montré une augmentation de la contribution du NO à la vasodilatation induite par l'acétylcholine et une diminution de la participation des EDHF dans les artères mésentériques (Xu *et al.*, 2007a). Pour expliquer la contradiction entre ces deux études, les auteurs mettent en avant la différence de durée post-chirurgie (infarctus du myocarde) après laquelle les expériences ont été réalisées : 4 à 8 semaines pour l'étude de Malmsjo *et al.* (Malmsjo *et al.*, 1999) et 9 à 10 semaines pour celle de Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2007a). Malgré leurs résultats contradictoires, ces deux études suggèrent qu'une modification de la nature des médiateurs endothéliaux vasorelaxants apparaîtrait dans l'artère mésentérique lors de la progression de l'IC. Dans notre étude, la nature des facteurs endothéliaux impliqués dans la réponse relaxante muscarinique des artères mésentériques mériterait d'être recherchée.

Dans l'optique d'évaluer le rôle des facteurs dépendants de la NOS et de la COX dans le contrôle du tonus vasculaire de l'artère mésentérique, nous avons comparé les réponses contractiles au U46619 en l'absence et en présence d'inhibiteurs de ces deux enzymes, le L-NAME et/ou l'indométhacine, respectivement. Alors que l'inhibition de la NOS provoque une augmentation de la sensibilité au U46619 similaire dans les artères mésentériques des rats SHAM et IC, l'inhibition de la COX provoque des effets différents dans les deux groupes de rats, à savoir une diminution de la sensibilité au U46619 dans les artères de rats SHAM, mais pas de modification dans les artères de rats IC. Ceci suggérerait que dans les artères mésentériques de rats SHAM, le tonus contractile est doublement régulé par le NO vasodilatateur et un facteur vasoconstricteur dépendant de la COX, dont les effets s'annulent puisqu'en présence de L-NAME et d'indométhacine, la réponse contractile au U46619 est inchangée. Dans les artères mésentériques de rats IC, la régulation par la NOS persiste alors

que celle médiée par la COX disparaît. Cependant l'effet de l'inhibition de la NOS en présence d'indométhacine disparaît, suggérant la persistance d'une régulation du tonus vasculaire par les facteurs dérivés de la COX chez les rats IC. De plus, il a été montré que le NO peut moduler l'activité et l'expression de l'isoforme de COX-2 dans des macrophages (Swierkosz *et al.*, 1995). La contribution de l'endothélium dans la production de ces facteurs dépendants de la NOS et surtout de la COX, pour laquelle l'expression endothéliale et musculaire lisse a été décrite, n'a pas été évaluée ici, en raison de la difficulté d'obtention d'artères mésentériques dénudées de leur endothélium. D'autre part, on ne peut pas exclure un effet direct de l'U46619 sur la production de ces facteurs. Ces résultats préliminaires indiquent cependant que l'activité NOS basale est préservée dans l'artère mésentérique contrairement à l'aorte.

#### ✓ **Altérations fonctionnelles des PDE-AMPC dans les artères de rats en situation d'IC**

Les conséquences de l'état d'IC sur le rôle fonctionnel des PDE-AMPC vasculaires ont été évaluées d'une part, sur l'activité d'hydrolyse de l'AMPC mesurée *in vitro* par dosage biochimique, et d'autre part, sur la participation des PDE-AMPC dans la régulation du tonus contractile. Cette double approche est intéressante, car les données de la littérature rapportent essentiellement des altérations de l'activité enzymatique des PDEs vasculaires en situation pathologique.

Le profil d'activité des PDE-AMPC est similaire dans l'aorte et l'artère mésentérique issues des rats sains (SHAM). L'ordre d'activité est le suivant : PDE3 > PDE4 >> PDE1. Nous n'avons détecté aucune activité PDE2. Ces résultats sont en parfait accord avec les données de la littérature (Lugnier & Schini, 1990; Polson & Strada, 1996; Keravis *et al.*, 2000; Maurice *et al.*, 2003). Bien que le profil d'activité des PDE-AMPC soit identique dans les deux lits vasculaires, les artères mésentériques possèdent une activité totale d'hydrolyse de l'AMPC cinq fois plus faible que celle de l'aorte. Au contraire, une étude menée sur des rats âgés de 12 semaines a précédemment décrit que l'activité PDE-AMPC dans l'artère mésentérique est deux fois plus élevée que dans l'aorte (Tahseldar-Roumieh *et al.*, 2009). Cette différence pourrait s'expliquer d'une part par la souche de rats (Sprague Dawley *versus* Wistar dans notre étude), et d'autre part par l'âge des rats, plus jeunes dans cette étude que dans la nôtre (rats SHAM âgés de 25 semaines). Cependant, cette dernière explication nous

semble peu probable, car nous avons également réalisé des mesures d'activité PDE-AMPC dans les aortes de rats plus jeunes (8 semaines) qui montrent une augmentation de l'activité PDE-AMPC totale par rapport aux aortes de rats SHAM de 25 semaines (résultats non présentés). Il serait intéressant de confirmer la diminution de l'activité PDE-AMPC aortique avec l'âge, sur des artères isolées de rats plus âgés et n'ayant pas subi de chirurgie.

Dans les aortes de rats SHAM, la suppression de l'endothélium n'a pas d'incidence sur les activités d'hydrolyse de l'AMPC par les PDEs, ce qui indiquerait que la contribution endothéliale à l'activité PDE aortique est négligeable par rapport à l'activité musculaire lisse, ou alors que notre méthode de dosage n'est pas suffisamment sensible pour détecter cette activité endothéliale ni mettre en évidence la régulation de l'activité des PDEs par l'endothélium (cf ci-dessous).

Nos travaux montrent par ailleurs que les aortes isolées des rats IC présentent une activité totale et un profil d'activité des PDE-AMPC similaires à ceux des aortes isolées de rats SHAM. En l'absence d'endothélium, seule une légère diminution significative de l'activité PDE4 est observée dans les aortes de rats IC par rapport aux rats SHAM, ce qui pourrait traduire une diminution de l'activité PDE4 musculaire lisse dans l'aorte de rats IC. Il serait opportun de vérifier si cette diminution d'activité est corrélée à une diminution de l'expression protéique. Contrairement aux aortes, les artères mésentériques de rats IC présentent une importante diminution (de moitié) de l'activité PDE-AMPC totale qui pourrait être liée à la réduction de l'activité PDE3 observée dans ces artères pathologiques. Cependant, ces différences entre les artères mésentériques des deux groupes de rats ne sont pas significatives car le nombre d'expérience est faible (n=3) et l'écart entre les valeurs intragroupes est important. Ces résultats devront être complétés par des expériences additionnelles.

A notre connaissance, une seule étude rapporte une modification de l'activité PDE-AMPC vasculaire dans un modèle d'IC, à savoir une augmentation de l'activité PDE3, sans modification de l'activité PDE4, dans l'aorte isolée d'un modèle de rat IC par surcharge volumétrique (rat Dahl traité au sel) (Takahashi *et al.*, 2002). Ainsi, les conséquences de l'IC sur l'activité des PDE-AMPC vasculaires dépendraient du modèle d'IC et du lit vasculaire. On peut noter que Forfia *et al.* ont décrit une augmentation de l'activité PDE5 aortique dans un modèle de chien IC par pacing (Forfia *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous nous sommes limités à la voie de l'AMPC, et nous n'avons donc pas analysé cette PDE5.

Après avoir caractérisé notre modèle de rat pathologique en termes d'activité enzymatique des PDE-AMPC et de fonction vasculaire globale, nous avons analysé la contribution fonctionnelle des familles de PDE-AMPC majoritaires (PDE2, PDE3 et PDE4) dans le contrôle du tonus contractile de l'aorte et de l'artère mésentérique.

Dans les aortes intactes de rat SHAM, nous avons constaté que les inhibiteurs de PDE3 et de PDE4 limitent de manière identique la réponse contractile induite par la  $PGF_{2\alpha}$  alors que l'inhibition de PDE2 est sans effet (résultats non présentés) ce qui est cohérent avec l'absence de détection d'activité PDE2 lors du dosage biochimique. Ces résultats confirment le rôle majeur des familles de PDE3 et PDE4 dans la régulation du tonus contractile vasculaire, décrit dans la littérature (Komas *et al.*, 1991; Eckly & Lugnier, 1994). De manière intéressante, nous avons observé que l'effet de l'inhibition de la PDE4 est aboli dans les aortes de rats IC ou dans les aortes de rats SHAM dépourvues d'endothélium, alors que l'effet de l'inhibition de la PDE3 est préservé dans ces deux situations. Ceci suggère que cette altération de la fonction de la PDE4 dans les aortes de rats IC pourrait être liée à la dysfonction endothéliale présente dans ces artères.

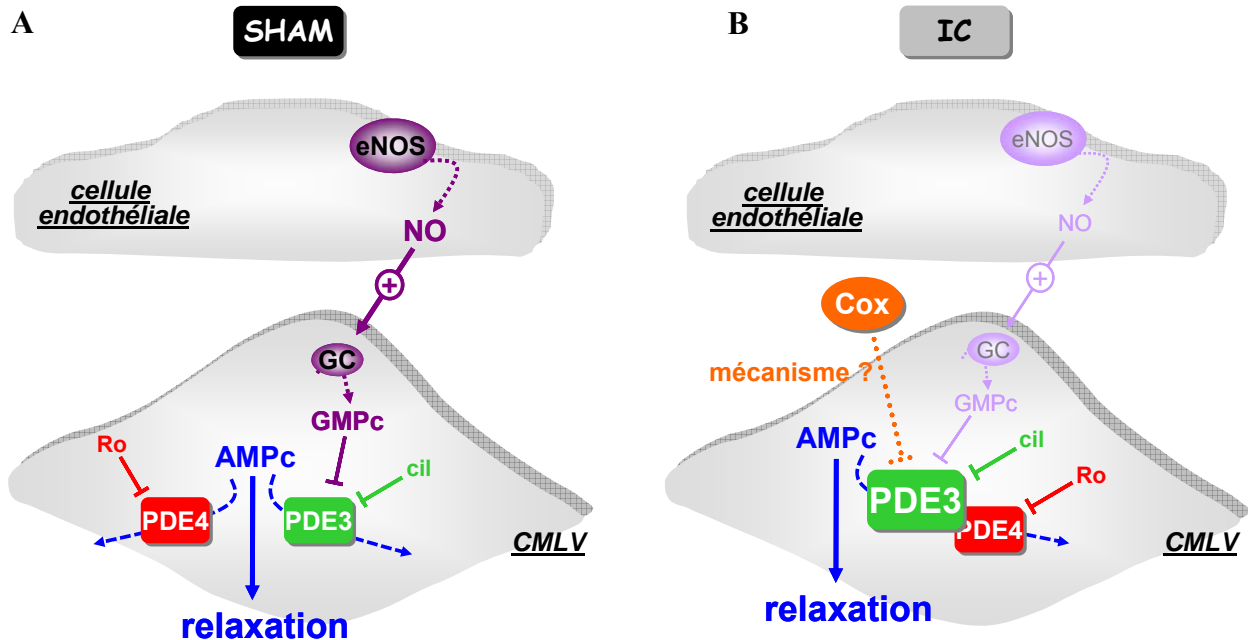
Alors que les activités PDE ne sont pas différentes entre les aortes de rats SHAM en présence ou en absence d'endothélium, la PDE4 participe à la régulation du tonus contractile seulement dans les aortes présentant un endothélium fonctionnel. Dans les aortes de rat IC, la PDE4 n'exerce aucun contrôle sur le tonus vasculaire alors que la PDE3 présente une implication similaire à celle observée chez les rats SHAM. Il a été précédemment montré que l'inhibition de la PDE4 provoque une vasorelaxation dépendante de l'endothélium dans l'aorte de rat (Komas *et al.*, 1991; Eckly & Lugnier, 1994). De plus, les travaux de Komas *et al.* soutiennent l'hypothèse que la relaxation dépendante de l'AMPC, induite notamment par l'inhibition de la PDE4, est potentialisée par le GMPc qui agirait en inhibant l'activité de la PDE3 (Komas *et al.*, 1991). Conformément à cette hypothèse, nous avons observé que l'inhibition préalable de la PDE3 permet de restaurer un effet relaxant de l'inhibiteur de PDE4 dans les aortes de rats SHAM dénudées de leur endothélium, et dans les aortes de rats IC intactes et dénudées de leur endothélium. Nos résultats indiquent donc que la fonction de la PDE4 est sous le contrôle négatif de la PDE3 et que dans les aortes de rats IC, l'activité PDE3 masque la fonction PDE4. Une hypothèse séduisante expliquant ce phénomène serait que la dysfonction endothéliale associée à l'aorte des rats IC serait responsable d'une diminution de la production de NO basal, réduisant ainsi la concentration de GMPc dans la CML et levant ainsi son contrôle inhibiteur sur l'activité PDE. Cette « sur-activation » de la PDE3 dans l'IC

entraînerait une abolition de la relaxation induite par l'inhibition de PDE4. Cependant, deux observations semblent contradictoires avec cette hypothèse : (1) l'effet de l'inhibiteur de la PDE3 sur le tonus contractile des aortes de rats IC n'est pas supérieur à celui observé dans les aortes de rats SHAM ; (2) l'activité PDE3 mesurée par le dosage d'activité biochimique des PDE-AMPC est similaire dans les deux types d'artères. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les phénomènes de régulation de l'activité des PDE par l'endothélium, notamment par la voie du NO/GMPC, soient perdus lors de ce test biochimique *in vitro*. Une autre alternative serait que l'activité PDE mesurée par le test biochimique soit une activité globale, ne reflétant pas l'activité PDE dans les compartiments subcellulaires impliquée directement dans les effets fonctionnels de cette enzyme. Une augmentation locale de l'activité PDE3 à proximité de la PDE4 permettrait de réconcilier ces différentes observations.

Nos données montrent que l'effet de l'inhibition de la PDE3 sur la réponse contractile à la  $PGF_{2\alpha}$  est potentialisé en l'absence d'endothélium fonctionnel, à un degré similaire dans les aortes de rats SHAM et IC, suggérant un contrôle inhibiteur de la PDE3 par des facteurs endothéliaux (**Figure 33**). Cependant, la nature des facteurs endothéliaux exerçant un effet inhibiteur sur le rôle fonctionnel de la PDE3 est différente dans les deux groupes d'artères. Nous avons ainsi exploré la voie de la NOS ainsi que celle des COX, à l'aide de leurs inhibiteurs respectifs, le L-NAME et l'indométhacine. Il apparaît que dans les aortes de rats SHAM, l'effet relaxant de l'inhibiteur de PDE3 est insensible à l'indométhacine, mais potentialisé de manière identique par l'abrasion de l'endothélium et le L-NAME, alors que, dans les aortes de rats IC, l'effet du cilostamide est potentialisé à la fois par le L-NAME et l'indométhacine, mais de manière partielle par rapport à l'abrasion de l'endothélium. De plus, ces effets du L-NAME et de l'indométhacine disparaissent en l'absence d'endothélium fonctionnel. Ceci suggère donc que dans les aortes de rats SHAM, la PDE3 est sous le contrôle exclusif de la NOS endothéliale, alors que dans les aortes de rats IC, la PDE3 est sous le double contrôle de facteurs endothéliaux dépendants de la NOS et de la COX. L'association d'un facteur dépendant de la COX, de type EDCF, à la dysfonction endothéliale a été décrite dans plusieurs modèles d'IC (Kaiser *et al.*, 1989; Katz *et al.*, 1993; Nakamura & Nishizuka, 1994; Miller *et al.*, 2010), et de façon générale dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (pour revue, (Wong & Vanhoutte, 2010)). L'isoforme de COX impliquée dans la production d'EDCF dépend des modèles étudiés. Il a été ainsi montré que lors du vieillissement, aussi bien l'isoforme constitutive COX-1 que la forme inductible COX-2 contribuent à l'augmentation de la contraction dépendante de l'endothélium et à la production



d'EDCF (Heymes *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2008). Dans l'aorte de rats SHR ou l'artère fémorale de rats diabétiques, seule l'isoforme inducible COX-2 est impliquée (Yang *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2007). Dans notre étude, l'isoforme de COX impliquée, la nature du facteur EDCF mis en jeu, ainsi que son mécanisme d'action restent à déterminer.

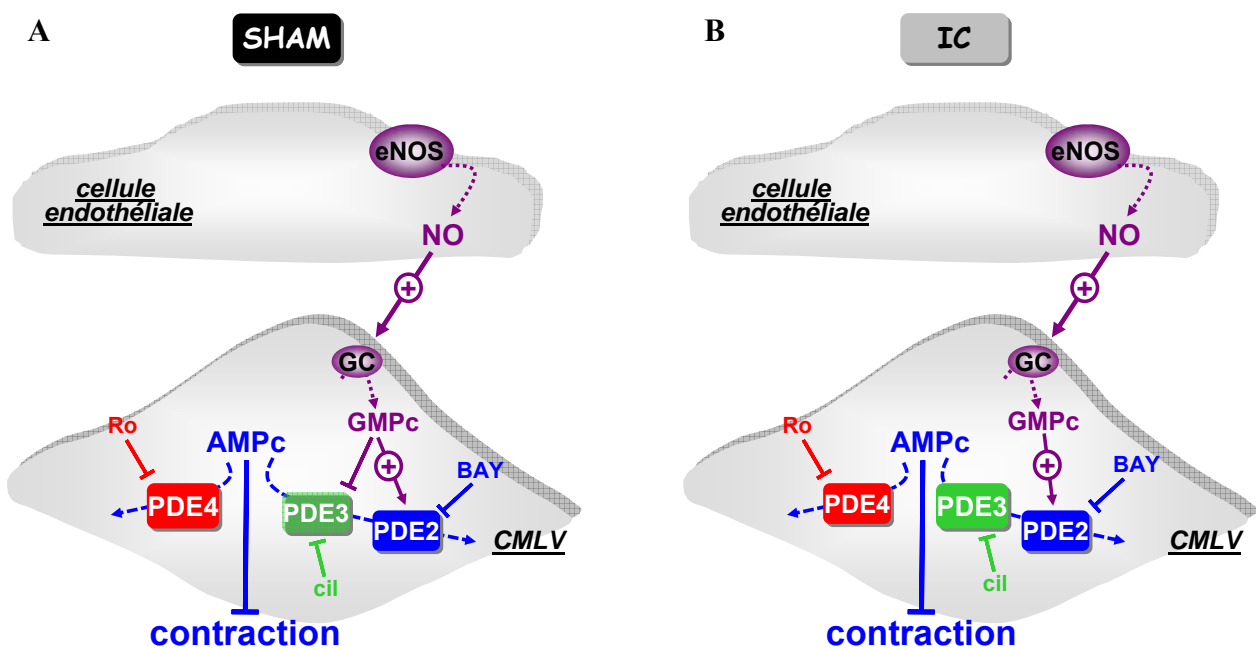


**Figure 33** : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPC dans le contrôle du tonus contractile basal dans les aortes de rats SHAM et IC.

**A** : Dans les aortes de rat SHAM, les PDE3 et PDE4 contrôlent les concentrations d'AMPc basales et leur inhibition entraîne la relaxation. La voie du NO/GMPC exerce un effet inhibiteur de l'activité de la PDE3 qui est nécessaire à la fonction de la PDE4. **B** : Dans les aortes de rat IC, la fonction de la PDE3 est conservée et négativement contrôlée par la voie NO/GMPC et par des facteurs dérivés des COX. La fonction de la PDE4 est masquée par la « suractivation » de la PDE3 qui est consécutive à la dysfonction endothéliale et à l'altération de la voie NO/GMPC associée.

En parallèle, nous avons évalué le rôle fonctionnel des PDE-AMPC dans les artères mésentériques des deux groupes de rats. Nous avons constaté que les inhibiteurs de PDE2 et de PDE4 diminuent la sensibilité à l'agent contractant (U46619), aussi bien dans les artères isolées de rats SHAM que de rats IC (**Figure 34**). Un effet similaire de l'inhibiteur de la PDE3 est observé uniquement dans les artères mésentériques de rats IC. Les contributions fonctionnelles de la PDE2 et de la PDE4 semblent être dépendantes de la voie du NO/GMPC, car elles sont abolies en présence de L-NAME. Les effets relaxants des inhibiteurs de PDE ont également été évalués après pré-contraction avec le U46619 (à la concentration de 1  $\mu$ M).

L'inhibition de PDE2 ou de PDE4, mais pas de PDE3, provoque une vasorelaxation dépendante de la NOS- dans les artères de rat SHAM, en accord avec les résultats précédents. Cependant, dans les artères mésentériques des rats IC, aucun inhibiteur de PDE n'a la capacité d'induire une relaxation. Nous pensons que cette absence d'effet relaxant est due au niveau de pré-contraction imposé par le U46619, correspondant à une amplitude de contraction pour laquelle les inhibiteurs n'exercent pas d'effet, conformément à leurs effets sur la courbe concentration-réponse au U46619. Ceci sera vérifié sur des anneaux mésentériques précontractés avec des concentrations sub-maximales d'U46619, conditions expérimentales qui ont été utilisées dans notre étude sur l'aorte thoracique.



**Figure 34 :** Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPC dans le contrôle du tonus contractile des artères mésentériques de rats SHAM et IC.

**A :** Dans les artères mésentériques de rat SHAM, les PDE2 et PDE4 contrôlent les concentrations d'AMPc basales et leur inhibition diminue la sensibilité à l'agent contractant (U46619). La fonction de la PDE2 nécessite la présence de la voie du NO/GMPc qui exerce un effet activateur sur son activité alors que l'inhibition de la NOS révèle une activité de la PDE3. **B :** Dans les artères mésentériques de rat IC, les fonctions de la PDE2 et de la PDE4 sont conservées et sont dépendantes de la voie du NO. La contribution fonctionnelle de la PDE3 est révélée dans les artères IC intactes et préservée en l'absence d'un endothélium fonctionnel. La localisation endothéliale ou musculaire lisse de la PDE2 reste à définir.

Nos résultats obtenus sur l'artère mésentérique peuvent être corrélés, seulement en partie, avec ceux obtenus dans l'aorte. De façon similaire, la PDE4 contribue au contrôle du

tonus contractile seulement lorsque la voie NO/GMPc est fonctionnelle. A la différence de l'aorte, nous avons montré précédemment que la voie NOS endothéliale est préservée dans l'artère mésentérique des rats IC ce qui expliquerait la persistance de l'effet de l'inhibiteur de PDE4 dans ces artères.

De manière surprenante, l'effet fonctionnel de la PDE3 semble être masqué par la voie NO/GMPc dans les artères de rats SHAM, mais révélé dans les artères de rats IC. Ces effets fonctionnels de la PDE3 sont en désaccord avec la tendance à la diminution d'activité PDE3 quantifiée par dosage biochimique dans les artères mésentériques IC par rapport aux artères SHAM. Si cette tendance est confirmée par des expériences futures, ces résultats mettraient en évidence une discordance entre activité enzymatique et rôle fonctionnel de la PDE3, ce qui pourrait étayer le phénomène de compartimentation de la signalisation dans les CLMVs. On pourrait ainsi envisager une réorganisation de la localisation subcellulaire de la PDE3 dans les artères mésentériques de rats IC, limitant le contrôle inhibiteur de celle-ci par le GMPc.

Dans l'artère mésentérique, un effet fonctionnel de l'inhibiteur de la PDE2 est observé alors qu'aucune activité PDE2 n'a été détectée lors du dosage biochimique. Un manque de sélectivité de l'inhibiteur de PDE2 utilisé, le BAY à 100 nM, pourrait être invoqué ici. Cependant, à cette concentration, aucun effet du BAY n'a été observé dans les dosages biochimiques et dans les études fonctionnelles sur l'aorte, suggérant que cet inhibiteur n'altère pas l'activité et/ou la fonction des PDE1, PDE3 et PDE4. Par ailleurs, les données de la littérature sur son affinité pour les autres PDE-AMPc suggèrent qu'à cette concentration, le BAY est sélectif pour la PDE2 (Boess *et al.*, 2004). Une autre explication est basée sur les propriétés intrinsèques de la PDE2, dont l'activité est régulée par le GMPc. La fixation du GMPc (1 à 5  $\mu$ M) sur le domaine GAF-B stimule par 6 fois l'activité d'hydrolyse de l'AMPc par la PDE2 dans des conditions physiologiques (Martins *et al.*, 1982; Pandit *et al.*, 2009). Pour ces raisons, la PDE2 joue un rôle de rétrocontrôle négatif crucial en restaurant le niveau basal de nucléotides cycliques en réponse à une élévation du GMPc notamment lors de la production de NO (Bender & Beavo, 2006). Dans l'artère mésentérique, la participation fonctionnelle de la PDE2 nécessiterait la présence de GMPc pour l'activer. Or notre dosage d'activité enzymatique a été réalisé en l'absence de GMPc, ce qui pourrait expliquer l'absence de détection de son activité. Il sera donc nécessaire de reproduire ce dosage en présence de GMPc. Dans une expérience préliminaire, nous avons réalisé un tel dosage dans l'aorte de rat, qui n'a pas révélé d'activité PDE2 dans ce lit vasculaire (résultats non présentés). De plus, l'activité PDE2 dans l'artère mésentérique pourra être confirmée par la recherche de

l'expression de l'ARNm et/ou de la protéine. La localisation endothéliale ou musculaire lisse de cette PDE2 sera également recherchée. S'il s'avère que la PDE2 est présente dans les artères mésentériques, elle serait donc capable d'établir une interaction entre les voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc (Lugnier, 2006) et pourrait participer au contrôle du tonus vasculaire comme nous l'observons dans nos expériences.

#### ✓ **Altération de la réponse vasorelaxante $\beta$ -adrénergique dans les aortes de rats IC**

Nos résultats expérimentaux indiquent que dans l'aorte de rat SHAM, la relaxation  $\beta$ -adrénergique nécessite un endothélium et une NOS fonctionnels et qu'elle est négativement contrôlée par un facteur dérivé des COX. De nombreuses études ont montré que la suppression de l'endothélium réduisait, soit totalement, soit partiellement, la relaxation induite par l'isoprénaline dans l'aorte de rat (Grace *et al.*, 1988; Kamata *et al.*, 1989; Gray & Marshall, 1992; Delpy *et al.*, 1996; Trochu *et al.*, 1999; Ferro *et al.*, 1999; Brawley *et al.*, 2000a; Brawley *et al.*, 2000b). Cependant, dans d'autres études, la suppression de l'endothélium ou l'inhibition de la NOS n'avait aucune influence sur la relaxation à l'isoprénaline dans l'aorte thoracique de rat (Konishi & Su, 1983; Moncada *et al.*, 1991; Eckly *et al.*, 1994; Satake *et al.*, 1996). Ces différences d'influence de l'endothélium peuvent être liées aux conditions expérimentales, telles que la nature de l'agent pharmacologique utilisé afin de pré-contracter les vaisseaux (la phényléphrine, agoniste sélectif des récepteurs  $\alpha$ -AR, ou la NA qui active également les récepteurs  $\beta$ -AR), le degré de pré-contraction mais également l'âge de l'animal. En effet, une étude a montré que la contribution de l'endothélium à la vasorelaxation  $\beta$ -adrénergique aortique augmente avec l'âge des rats (54 semaines *versus* 8 semaines) (van der Zyppe *et al.*, 2000). De plus, ces auteurs proposent que la diminution de la réponse relaxante  $\beta$ -adrénergique observée avec l'âge est liée à une augmentation de l'expression des COX, ce qui augmenterait la production de prostanoïdes vasoactifs (Kang *et al.*, 2007). Ces données concordent avec la contribution des facteurs NOS et COX que nous avons observée dans les aortes de nos rats SHAM qui présentent un âge avancé (25 semaines). La nature de ce facteur COX est actuellement inconnue. Indépendamment de la nature de ces facteurs, nos résultats suggèrent que la relaxation  $\beta$ -adrénergique impliquerait des récepteurs endothéliaux, couplés à la voie NO/GMPc.

Or nous avons montré, qu'en l'absence d'endothélium fonctionnel, la relaxation  $\beta$ -adrénergique aortique peut être restaurée par l'inhibition de la PDE3, démontrant la localisation musculaire lisse des récepteurs  $\beta$ -AR, et le rôle régulateur prépondérant de la

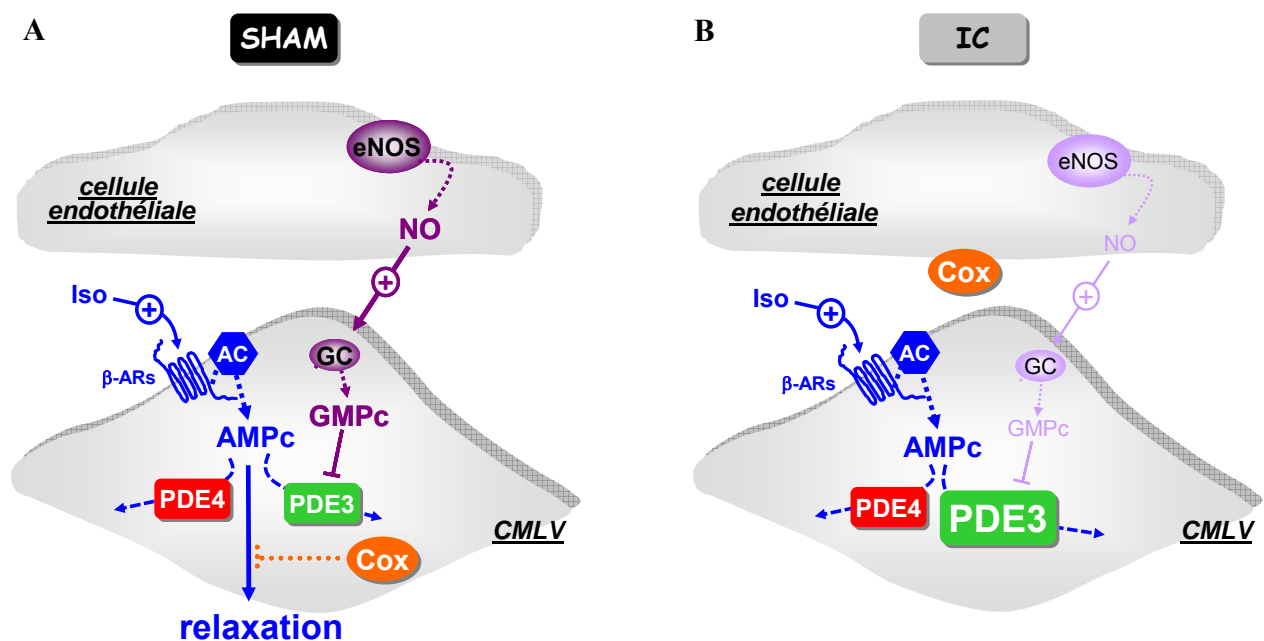
PDE3 physiologiquement inhibée par la voie NO/GMPc endothéliale. Ceci est en accord avec les travaux de Delpy *et al.* décrivant un effet potentialisateur du GMPc sur la réponse relaxante à l'isoprénaline par augmentation des concentrations d'AMPc (Delpy *et al.*, 1996). Ces travaux avaient également dévoilé un rôle central de la PDE3 dans ce phénomène.

Au final, la relaxation  $\beta$ -adrénergique dans l'aorte de rat SHAM implique des récepteurs musculaires lisses et est négativement contrôlée par l'activité de la PDE3, de la PDE4, et de facteurs dépendants de la COX. L'activité PDE3, négativement régulée par le NO dérivé de l'endothélium, joue un rôle majeur dans le contrôle de la concentration d'AMPc vasorelaxant produit suite à la stimulation  $\beta$ -adrénergique. Ces résultats remettent en cause les conclusions des études décrivant la présence de récepteurs  $\beta$ -AR endothéliaux, en se basant uniquement sur l'observation d'une disparition de l'effet vasorelaxant  $\beta$ -adrénergique en l'absence d'une voie NOS endothéliale fonctionnelle.

Dans les aortes isolées de rats IC, nous avons observé que la relaxation  $\beta$ -adrénergique est abolie, ce qui pourrait logiquement s'expliquer par la dysfonction endothéliale de ces aortes (**Figure 35**). Quelques études ont décrit une diminution de la densité des récepteurs  $\beta$ -AR vasculaires et de la vasorelaxation dépendante de la voie AMPc dans l'IC (Kiuchi *et al.*, 1993; Gaballa *et al.*, 2001). Dans notre modèle d'IC, l'absence de relaxation  $\beta$ -adrénergique est démasquée par l'inhibition de la PDE3 et dans une moindre mesure par l'inhibition de PDE4 seulement en présence d'endothélium fonctionnel. Ce résultat suggère que notre hypothèse de « sur-activation » de la PDE3 dans les aortes des rats IC pourrait masquer la réponse relaxante  $\beta$ -adrénergique. De plus, nous mettons en évidence un effet de l'inhibition de la PDE4 sur la relaxation  $\beta$ -adrénergique, alors que l'inhibition de la PDE4 est inefficace par elle-même pour induire un effet relaxant. L'observation de cet effet fonctionnel de la PDE4 pourrait être liée à l'augmentation des concentrations d'AMPc suite à la stimulation à l'isoprénaline. En effet, il a été suggéré qu'une augmentation d'AMPc est nécessaire à la fonction de la PDE4 (Lugnier & Komasa, 1993) car cette enzyme est caractérisée par des valeurs de  $K_m$  (2  $\mu$ M) et de  $V_{max}$  (95 nM min/mg) pour l'AMPc, respectivement supérieure et inférieure à celles de la PDE3 (0,2  $\mu$ M et 6  $\mu$ M min/mg, respectivement) (Beavo, 1988). De plus, l'AMPc peut augmenter l'activité de la PDE4 via sa phosphorylation par la PKA, ce qui constitue une boucle de rétrocontrôle négatif (Richter & Conti, 2004). Ainsi, lorsque la concentration d'AMPc est augmentée, les inhibiteurs de PDE4 acquièrent la capacité d'induire une vasorelaxation (Maurice *et al.*, 1991; Komasa *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1993;

Eckly & Lugnier, 1994). Selon cette théorie, la PDE4 ne participerait à l'hydrolyse de l'AMPc que lorsque la concentration d'AMPc est suffisante. Ainsi, dans les aortes de rats IC, la « sur-activation » de la PDE3 serait responsable d'une diminution de la concentration basale en AMPc, concentration insuffisante pour permettre une activité basale de la PDE4. L'augmentation de la concentration en AMPc induite par l'activation  $\beta$ -adrénergique permettrait de révéler un effet de la PDE4. Cette hypothèse devra être vérifiée en réalisant des dosages d'AMPc dans ces différentes conditions.

Les inhibiteurs de PDE3 ou PDE4 ont des effets potentialisateurs additifs avec l'inhibiteur de COX sur la relaxation  $\beta$ -adrénergique dans les aortes de rats SHAM et IC présentant un endothélium fonctionnel, suggérant que le facteur vasoconstricteur dérivé de la COX agit sur une voie de signalisation distincte de celle des PDEs. Cette régulation par la COX persiste en IC, cependant il n'est pas à exclure que l'origine de ces facteurs soit différente.



**Figure 35 :** Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPc dans le contrôle de la réponse relaxante  $\beta$ -adrénergique dans les aortes de rats SHAM et IC.

**A :** Dans les aortes de rat SHAM, la relaxation induite par une stimulation des récepteurs  $\beta$ -ARs est contrôlée par les PDE3 et PDE4, mais également par un (des) facteur(s) dérivé(s) des COX ainsi que par la voie du NO/GMPc qui exerce un effet inhibiteur de l'activité de la PDE3. **B :** Dans les aortes de rat IC, la relaxation  $\beta$ -adrénergique est abolie du fait d'un contrôle négatif par la PDE3, mais également dans une moindre mesure par la PDE4. Un (des) facteur(s) dérivé(s) des COX inhibe(nt) aussi l'effet relaxant de la stimulation  $\beta$ -adrénergique par un mécanisme inconnu qui semble indépendant des PDEs.

En conclusion, nous avons montré que les familles de PDE-AMPC contribuent de façon différente au contrôle du tonus vasculaire dans l'aorte thoracique (PDE3 = PDE4 sans participation de la PDE2) et l'artère mésentérique (PDE4 > PDE2 sans participation de la PDE3), l'endothélium exerçant un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de ces PDE musculaires lisses, notamment par le biais de la production de NO. Nous avons également mis en évidence des altérations de la réactivité vasculaire, et notamment de son contrôle par la voie de l'AMPC/PDE, dans notre modèle de rat en IC par surcharge barométrique. Ces altérations diffèrent selon le lit vasculaire étudié. Dans l'aorte, la dysfonction endothéliale liée à l'altération de la voie du NO est à l'origine d'une augmentation de l'activité PDE3 masquant l'activité PDE4 et l'effet relaxant  $\beta$ -adrénergique. Dans l'artère mésentérique, les PDE2, 3 et 4 sont fonctionnelles. La contribution de facteurs dépendants de la COX à ces altérations est proposée. D'une manière générale, nous avons observé des discordances entre les activités PDE mesurées par dosage biochimique *in vitro*, et le rôle fonctionnel des PDE dans la régulation du tonus contractile, suggérant que l'activité enzymatique globale ne reflète pas l'activité enzymatique de la PDE associée à la régulation de la concentration locale d'AMPC *in situ*, dans la cellule. Ces observations seraient en accord avec l'existence de microdomaines subcellulaires de signalisation dans les CMLVs assurant une compartimentation des signaux AMPC impliquant notamment les PDEs.

# **CONCLUSIONS**



L'ensemble de nos résultats, obtenus par deux approches expérimentales complémentaires d'imagerie de FRET sur CMLVs vivantes et de réactivité vasculaire, confirme le rôle différentiel des familles de PDE-AMPC dans la régulation de la signalisation AMPC vasculaire.

Nos travaux montrent que l'activité et la fonction de ces différentes familles de PDE-AMPC sont modulées par de nombreux paramètres: (1) Le phénotype des CMLVs (contractile *versus* synthétique); (2) Les conditions de culture cellulaire (densité cellulaire); (3) Le lit vasculaire (aorte *versus* artère mésentérique); (4) La situation pathologique (Insuffisance cardiaque).

Nos études de réactivité vasculaire soulignent le rôle majeur de la voie du NO/GMPC dans la régulation de la fonction des PDE-AMPC renforçant l'existence d'une interaction entre les voies des nucléotides cycliques. Ainsi, toute altération de la voie du NO/GMPC, notamment associée à la dysfonction endothéliale, sera susceptible d'engendrer des modifications de la signalisation dépendante de l'AMPC, en modulant l'activité et le rôle fonctionnel des PDE-AMPC.

Il s'avère que les dosages biochimiques d'activité globale des PDE-AMPC réalisés sur des lysats cellulaires, ne reflètent pas systématiquement les réponses fonctionnelles liées à l'inhibition des PDEs. Cela suggère l'existence de microdomaines sub-cellulaires qui génèreraient une compartimentation de la voie de signalisation de l'AMPC impliquant, notamment, les PDEs.

Les perspectives thérapeutiques actuelles dans le domaine des PDEs tendent vers le développement de médicaments ciblant une isoforme particulière de PDE. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes responsables de la compartimentation subcellulaire de l'AMPC dans les CMLVs, et notamment l'identification des isoformes de PDEs spécifiquement impliquées dans ce phénomène, est indispensable. Ceci permettrait d'appréhender les conséquences fonctionnelles de ces médicaments sur le système vasculaire, non seulement en termes d'effet thérapeutique recherché, mais également en termes d'effets indésirables.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abassi ZA, Gurbanov K, Mulrone SE, Potlog C, Opgenorth TJ, Hoffman A, Haramati A and Winaver J (1997). Impaired nitric oxide-mediated renal vasodilation in rats with experimental heart failure: role of angiotensin II. *Circulation* **96**, 3655-64.
- Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Matéo P, Varin A, Heymes C, Samuel J-L, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on  $\beta$ -adrenergic cAMP signals. *Circ Res* **105**, 784-792.
- Adamson RH, Ly JC, Sarai RK, Lenz JF, Altangerel A, Drenckhahn D and Curry FE (2008). Epac/Rap1 pathway regulates microvascular hyperpermeability induced by PAF in rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H1188-96.
- AHLQUIST RP (1948). Comparative effects of sympathomimetic amines on the vasomotor resistance of the kidney, mesentery and leg. *Fed Proc* **7**, 202.
- Ahn HS, Bercovici A, Boykow G, Bronnenkant A, Chackalamannil S, Chow J, Cleven R, Cook J, Czarniecki M, Domalski C, Fawzi A, Green M, Gundes A, Ho G, Laudicina M, Lindo N, Ma K, Manna M, McKittrick B, Mirzai B, Nechuta T, Neustadt B, Puchalski C, Pula K, Zhang H and et al. (1997). Potent tetracyclic guanine inhibitors of PDE1 and PDE5 cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterases with oral antihypertensive activity. *J Med Chem* **40**, 2196-2210.
- Aikawa M, Sakomura Y, Ueda M, Kimura K, Manabe I, Ishiwata S, Komiyama N, Yamaguchi H, Yazaki Y and Nagai R (1997). Redifferentiation of smooth muscle cells after coronary angioplasty determined via myosin heavy chain expression. *Circulation* **96**, 82-90.
- Aird WC (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* **100**, 174-90.
- Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615.
- Amberg GC, Bonev AD, Rossow CF, Nelson MT and Santana LF (2003). Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca(2+) activated K(+) channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest* **112**, 717-24.
- Anderson PG, Boerth NJ, Liu M, McNamara DB, Cornwell TL and Lincoln TM (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase expression in coronary arterial smooth muscle in response to balloon catheter injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2192-7.
- Andrew PJ and Mayer B (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **43**, 521-531.
- Angus JA and Wright CE (2000). Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods* **44**, 395-407.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H and Nakanishi S (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**, 730-2.
- Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Ide T, Tsutsui H, Shimokawa H and Takeshita A (2001). Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H68-75.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S and Murad F (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3203-7.
- ASANO T, KATADA T, GILMAN AG and ROSS EM (1984). Activation of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase, Gi, by B-adrenergic receptors in reconstituted phospholipid vesicles. *J Biol Chem*

259:9351-9354.

Ashikaga T, Strada SJ and Thompson WJ (1997). Altered expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes during culture of aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **54**, 1071-9.

Babu GJ, Warsaw DM and Periasamy M (2000). Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microsc Res Tech* **50**, 532-40.

Baggia S, Perkins K and Greenberg B (1997). Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* **29**, 389-96.

Bagnall AJ, Kelland NF, Gulliver-Sloan F, Davenport AP, Gray GA, Yanagisawa M, Webb DJ and Kotelevtsev YV (2006). Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension* **48**, 286-93.

Baillie GS, MacKenzie SJ, McPhee I and Houslay MD (2000). Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol* **131**, 811-819.

Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ and Houslay MD (2003).  $\beta$ -Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates  $\beta$ -adrenoceptor switching from  $G_s$  to  $G_i$ . *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 941-945.

Bakalyar HA and Reed RR (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* **250**, 1403-6.

Baker H, Cummings DM, Munger SD, Margolis JW, Franzen L, Reed RR and Margolis FL (1999). Targeted deletion of a cyclic nucleotide-gated channel subunit (OCNC1): biochemical and morphological consequences in adult mice. *J Neurosci* **19**, 9313-21.

Baloglu E, Kiziltepe O and Gurdal H (2007). The role of Gi proteins in reduced vasorelaxation response to beta-adrenoceptor agonists in rat aorta during maturation. *Eur J Pharmacol* **564**, 167-73.

Banquet S, Delannoy E, Agouni A, Dessy C, Lacomme S, Hubert F, Richard V, Muller B and Leblais V (2011). Role of G(i/o)-Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in beta-adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. *Cell Signal* **23**, 1136-43.

Bar H, Wende P, Watson L, Denger S, van Eys G, Kreuzer J and Jahn L (2002). Smoothelin is an indicator of reversible phenotype modulation of smooth muscle cells in balloon-injured rat carotid arteries. *Basic Res Cardiol* **97**, 9-16.

Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R and Ertl G (1999). Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* **100**, 292-8.

Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D, Hildemann SK, Ertl G, Wehling M and Christ M (2002). Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Am Coll Cardiol* **39**, 351-8.

Bauersachs J and Widder JD (2008). Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep* **60**, 119-26.

Beamish JA, Geyer LC, Haq-Siddiqi NA, Kottke-Marchant K and Marchant RE (2009). The effects of heparin releasing hydrogels on vascular smooth muscle cell phenotype. *Biomaterials* **30**, 6286-94.

Beavo JA (1988). Multiple isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Sec Mess and Phosphoprot Res* **22**, 1-38.

- Beavo JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**, 725-748.
- Beavo JA, Francis SH and Houslay MD (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease. *CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA* pp. 1-713.
- Beavo JA, Hardmann JG and Sutherland EW (1971). Stimulation of adenosine 3',5' monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5' monophosphate. *J Biol Chem* **246**, 3841-3846.
- Begonha R, Moura D and Guimaraes S (1995). Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J Pharm Pharmacol* **47**, 510-3 .
- Begum N, Hockman S and Manganiello VC (2011). Phosphodiesterase 3A (PDE3A) deletion suppresses proliferation of cultured murine vascular smooth muscle cells (VSMCs) via inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling and alterations in critical cell cycle regulatory proteins. *J Biol Chem* **286**, 26238-49.
- Bell D and McDermott BJ (1996). Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol Rev* **48**, 253-88.
- Bender AT and Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: from molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**, 488-520.
- Bergdahl A and Sward K (2004). Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* **82**, 289-99.
- Bezprozvanny I, Watras J and Ehrlich BE (1991). Bell-Shaped Calcium-Response Curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Gated and Calcium-Gated Channels from Endoplasmic Reticulum of Cerebellum. *Nature*, 351 (6329) p751-754
- Biel M, Zong XG and Hofmann F (1999). Cyclic nucleotide gated channels. *Adv Sec Mess Phosphoprot Res - Ion Channel Regulation* **33**, 231-250.
- Bingley JA, Hayward IP, Campbell JH and Campbell GR (1998). Arterial heparan sulfate proteoglycans inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and phenotype change in vitro and neointimal formation in vivo. *J Vasc Surg* **28**, 308-18.
- Birukov KG, Bardy N, Lehoux S, Merval R, Shirinsky VP and Tedgui A (1998). Intraluminal pressure is essential for the maintenance of smooth muscle caldesmon and filamin content in aortic organ culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 922-7 .
- Birukov KG, Shirinsky VP, Stepanova OV, Tkachuk VA, Hahn AW, Resink TJ and Smirnov VN (1995). Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* **144**, 131-9.
- BLACK JW, CROWTHER AF, SHANKS RG, SMITH LH and DORNHORST AC (1964). A NEW ADRENERGIC BETA RECEPTOR ANTAGONIST. *Lancet* **1**, 1080-1.
- Blease K, Burke-Gaffney A and Hellewell PG (1998). Modulation of cell adhesion molecule expression and function on human lung microvascular endothelial cells by inhibition of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol* **124**, 229-37.
- Boerth NJ, Dey NB, Cornwell TL and Lincoln TM (1997). Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype. *J Vasc Res* **34**, 245-59.
- Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W, de Vente J, Prickaerts J, Blokland A and Koenig G (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* **47**, 1081-1092.
- Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM and Verin AD (2005). Arachidonic acid cascade in endothelial

pathobiology. *Microvasc Res* **69**, 107-27.

Bohm F, Ahlborg G, Johansson BL, Hansson LO and Pernow J (2002). Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 674-9.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ and Cohen RA (1994). Nitric Oxide Directly Activates Calcium-Dependent Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Nature* **368**, 850-853.

Bolton TB (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* **59**, 606-718.

Bonev AD, Jaggar JH, Rubart M and Nelson MT (1997). Activators of protein kinase C decrease Ca<sup>2+</sup> spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* **273**, C2090-5.

Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP and Versteeg HH (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1187-205.

Bradley JE, Anderson UA, Woolsey SM, Thornbury KD, McHale NG and Hollywood MA (2004). Characterization of T-type calcium current and its contribution to electrical activity in rabbit urethra. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C1078-88.

Brahmadevara N, Shaw AM and MacDonald A (2003). Evidence against beta 3-adrenoceptors or low affinity state of beta 1-adrenoceptors mediating relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* **138**, 99-106.

Brawley L, Shaw AM and MacDonald A (2000a). Beta 1-, beta 2- and atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* **129**, 637-44.

Brawley L, Shaw AM and MacDonald A (2000b). Role of endothelium/nitric oxide in atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol* **398**, 285-96.

Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT and Aldrich RW (2000). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **407**, 870-876.

Brette F, Leroy J, Le Guennec JY and Sallé L (2006). Ca<sup>2+</sup> currents in cardiac myocytes: Old story, new insights. *Prog Biophys Mol Biol* **91**, 1-82.

Briones AM, Daly CJ, Jimenez-Altayo F, Martinez-Revelles S, Gonzalez JM, McGrath JC and Vila E (2005). Direct demonstration of beta1- and evidence against beta2- and beta3-adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* **146**, 679-91.

Bristol JA, Sircar I, Moos WH, Evans DB and Weishaar RE (1984). Cardiotonic agents. 1. 4,5-Dihydro-6-[4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]-3 (2H)-pyridazinones: novel positive inotropic agents for the treatment of congestive heart failure. *J Med Chem* **27**, 1099-101.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC and Stinson EB (1982). Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* **307**, 205-211.

Bristow MR, Minobe WA, Reynolds MV, Port JD, Rasmussen R, Ray PE and Feldman AM (1993). Reduced beta(1) Receptor Messenger RNA Abundance in the Failing Human Heart. *J Clin Invest* **92**, 2737-2745.

Bristow MR, O'Connell JB, Gilbert EM, French WJ, Leatherman G, Kantrowitz NE, Orie J, Smucker ML, Marshall G, Kelly P and et al (1994). Dose-response of chronic beta-blocker treatment in heart failure from either idiopathic dilated or ischemic cardiomyopathy. Bucindolol Investigators. *Circulation* **89**, 1632-1642.

Brophy CM, Whitney EG, Lamb S and Beall A (1997). Cellular mechanisms of cyclic nucleotide-induced vasorelaxation. *J Vasc Surg* **25**, 390-7.

- Brophy CM, Woodrum DA, Pollock J, Dickinson M, Komalavilas P, Cornwell TL and Lincoln TM (2002). cGMP-dependent protein kinase expression restores contractile function in cultured vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* **39**, 95-103.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ and Levin LR (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 79-84.
- Bulick AS, Munoz-Pinto DJ, Qu X, Mani M, Cristancho D, Urban M and Hahn MS (2009). Impact of endothelial cells and mechanical conditioning on smooth muscle cell extracellular matrix production and differentiation. *Tissue Eng Part A* **15**, 815-25.
- Burdyga TV, Taggart MJ and Wray S (1995). Major difference between rat and guinea-pig ureter in the ability of agonists and caffeine to release Ca<sup>2+</sup> and influence force. *J Physiol* **489 ( Pt 2)**, 327-35.
- Burke JE and Dennis EA (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S237-42.
- Burnstock G (2009). Purinergic regulation of vascular tone and remodelling. *Auton Autacoid Pharmacol* **29**, 63-72.
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM and Weston AH (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 374-80.
- Butcher RW and Sutherland EW (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* **237**, 1244-1250.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR and Trendelenburg U (1994). International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* **46**, 121-136.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR and Hamm HE (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**, 765-81.
- Cai H and Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**, 840-4.
- Cai Y, Miller CL, Nagel DJ, Jeon KI, Lim S, Gao P, Knight PA and Yan C (2011). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 regulates lysosome-dependent type I collagen protein degradation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 616-23.
- Cali JJ, Parekh RS and Krupinski J (1996). Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *J Biol Chem* **271**, 1089-1095.
- Camacho M, Lopez-Belmonte J and Vila L (1998). Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res* **83**, 353-65.
- Campbell JH, Campbell GR, Kocher O and Gabbiani G (1987). Cell biology of smooth muscle in culture: implications for atherogenesis. *Int Angiol* **6**, 73-9.
- Campbell WB and Falck JR (2007). Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* **49**, 590-6.
- Campos-Toimil M, Keravis T, Orallo F, Takeda K and Lugnier C (2008). Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca<sup>2+</sup> responses in endothelial cells. *Br J Pharmacol* **154**, 82-92.
- Cappadona C, Redmond EM, Theodorakis NG, McKillop IH, Hendrickson R, Chhabra A, Sitzmann JV and

- Cahill PA (1999). Phenotype dictates the growth response of vascular smooth muscle cells to pulse pressure in vitro. *Exp Cell Res* **250**, 174-86.
- Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Ann Rev Cell Dev Biol* **16**, 521-555.
- Chamley-Campbell J, Campbell GR and Ross R (1979). The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* **59**, 1-61.
- Chan HY, Yao X, Tsang SY, Bourreau JP, Chan FL and Huang Y (2002). Isoproterenol amplifies 17 beta-estradiol-mediated vasorelaxation: role of endothelium/nitric oxide and cyclic AMP. *Cardiovasc Res* **53**, 627-33.
- Chapman GB, Durante W, Hellums JD and Schafer AI (2000). Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H748-54.
- Chen FC, Ogut O, Rhee AY, Hoit BD and Brozovich FV (2006). Captopril prevents myosin light chain phosphatase isoform switching to preserve normal cGMP-mediated vasodilatation. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 488-95.
- Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR and Buck J (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**, 625-8.
- Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, RodriguezCrespo I, Witters LA, Power DA, deMontellano PRO and Kemp BE (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* **443**, 285-289.
- Choi EJ, Wong ST, Hinds TR and Storm DR (1992). Calcium and Muscarinic Agonist Stimulation of Type-I Adenylyl cyclase in Whole Cells. *J Biol Chem* **267**, 12440-12442.
- Christ T, Galindo-Tovar A, Thoms M, Ravens U and Kaumann AJ (2009). Inotropy and L-type  $Ca^{2+}$  current, activated by  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors, are differently controlled by phosphodiesterases 3 and 4 in rat heart. *Br J Pharmacol* **156**, 62-83.
- Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, Rensen S, Redard M, van Eys G and Gabbiani G (1999). Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation. *Circ Res* **85**, 99-107.
- Christen T, Verin V, Bochaton-Piallat M, Popowski Y, Ramaekers F, Debruyne P, Camenzind E, van Eys G and Gabbiani G (2001). Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery. *Circulation* **103**, 882-8.
- Christensen SB, Guider A, Forster CJ, Gleason JG, Bender PE, Karpinski JM, DeWolf WE Jr, Barnette MS, Underwood DC, Griswold DE, Cieslinski LB, Burman M, Bochnowicz S, Osborn RR, Manning CD, Grous M, Hillegas LM, Bartus JO, Ryan MD, Eggleston DS, Haltiwanger RC and Torphy TJ (1998). 1,4-Cyclohexanecarboxylates: potent and selective inhibitors of phosphodiesterase 4 for the treatment of asthma. *J Med Chem* **41**, 821-35.
- Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK and Hein L (2001). Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* **60**, 955-962.
- Church JE and Fulton D (2006). Differences in eNOS activity because of subcellular localization are dictated by phosphorylation state rather than the local calcium environment. *J Biol Chem* **281**, 1477-88.
- Ciccarelli M, Cipolletta E, Santulli G, Campanile A, Pumiglia K, Cervero P, Pastore L, Astone D, Trimarco B and Iaccarino G (2007). Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of Gi and SRC. *Cell Signal* **19**, 1949-55.
- Cintorino M, Bellizzi de Marco E, Leoncini P, Tripodi SA, Xu LJ, Sappino AP, Schmitt-Graff A and Gabbiani G



- (1991). Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes. *Int J Cancer* **47**, 843-6.
- Colombo PC, Banchs JE, Celaj S, Talreja A, Lachmann J, Malla S, DuBois NB, Ashton AW, Latif F, Jorde UP, Ware JA and LeJemtel TH (2005). Endothelial cell activation in patients with decompensated heart failure. *Circulation* **111**, 58-62.
- Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, Ceconi C, Curello S and Ferrari R (1996). Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 2241-8.
- Conti M and Beavo JA (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components in cyclic nucleotide signaling. *Ann Rev Biochem* **76**, 481-511.
- Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY and Jin C (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem* **278**, 5493-5496.
- Cooper DM (2003). Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. *Biochem Soc Trans* **31**, 912-915.
- Cornwell TL, Soff GA, Traynor AE and Lincoln TM (1994). Regulation of the expression of cyclic GMP-dependent protein kinase by cell density in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* **31**, 330-7.
- Cotecchia S, Exum S, Caron MG and Lefkowitz RJ (1990). Regions of the Alpha-1-Adrenergic Receptor Involved in Coupling to Phosphatidylinositol Hydrolysis and Enhanced Sensitivity of Biological Function. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Crossthwaite AJ, Seebacher T, Masada N, Ciruela A, Dufraux K, Schultz JE and Cooper DM (2005). The cytosolic domains of Ca<sup>2+</sup>-sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts. *J Biol Chem* **280**, 6380-91.
- Cruickshank JM (1993). Phosphodiesterase III inhibitors: long-term risks and short-term benefits. *Cardiovasc Drugs Ther* **7**, 655-60.
- Cullere X, Shaw SK, Andersson L, Hirahashi J, Lusinskas FW and Mayadas TN (2005). Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* **105**, 1950-1955.
- Curtis BM and Catterall WA (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* **23**, 2113-2118.
- Daaka Y, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (1997). Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.
- Dabrowska R, Hinssen H, Galazkiewicz B and Nowak E (1996). Modulation of gelsolin-induced actin-filament severing by caldesmon and tropomyosin and the effect of these proteins on the actin activation of myosin Mg(2+)-ATPase activity. *Biochem J* **315 ( Pt 3)**, 753-9.
- Darby I, Skalli O and Gabbiani G (1990). Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* **63**, 21-9.
- Daum G, Hedin U, Wang Y, Wang T and Clowes AW (1997). Diverse effects of heparin on mitogen-activated protein kinase-dependent signal transduction in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **81**, 17-23.
- Davies PF, Olesen SP, Clapham DE, Morrel EM and Schoen FJ (1988). Endothelial communication. State of the art lecture. *Hypertension* **11**, 563-72.
- Davis MJ, Donovan JA and Hood JD (1992). Stretch-Activated Single-Channel and Whole Cell Currents in Vascular Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol* **262**, C1083-C1088.

Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA and Meininger GA (2001). Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1427-33.

Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Bohm M, Warzok R, Kerb R, Brinkmann U, Schaeffeler E, Schwab M, Cascorbi I, Jedlitschky G and Kroemer HK (2003). Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol* **163**, 1567-77.

de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A and Bos JL (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* **275**, 20829-20836.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A and Bos JL (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.

De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, Mayoux E, Hoerter J, Bigard X, Serrurier B and Ventura-Clapier R (1999). Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res* **85**, 68-76.

Degerman E, Belfrage P and Manganiello VC (1997). Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* **272**, 6823-6826.

Deguchi J, Namba T, Hamada H, Nakaoka T, Abe J, Sato O, Miyata T, Makuuchi M, Kurokawa K and Takuwa Y (1999). Targeting endogenous platelet-derived growth factor B-chain by adenovirus-mediated gene transfer potently inhibits in vivo smooth muscle proliferation after arterial injury. *Gene Ther* **6**, 956-65.

Delannoy E, Courtois A, Freund-Michel V, Leblais V, Marthan R and Muller B (2010). Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res* **85**, 582-92.

Delpy E, Coste H and Degouville ACL (1996). Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: Role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol* **119**, 471-478.

Deng JT, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M and Walsh MP (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J* **367**, 517-24.

Dessauer CW (2009). Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol* **76**, 935-41.

Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P and Balligand JL (2004). Endothelial  $\beta_3$ -adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation* **110**, 948-954.

Dessy C, Saliez J, Ghisdal P, Daneau G, Lobysheva II, Frerart F, Belge C, Jnaoui K, Noirhomme P, Feron O and Balligand JL (2005). Endothelial  $\beta_3$ -adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation  $\beta$ -blocker nebivolol. *Circulation* **112**, 1198-205.

Dey NB, Foley KF, Lincoln TM and Dostmann WR (2005). Inhibition of cGMP-dependent protein kinase reverses phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **45**, 404-413.

Diebold I, Djordjevic T, Petry A, Hatzelmann A, Tenor H, Hess J and Grolach A (2009). Phosphodiesterase 2 mediates redox-sensitive endothelial cell proliferation and angiogenesis by thrombin via Rac1 and NADPH oxidase 2. *Circ Res* **104**, 1169-77.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605.

Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC and Yan

- C (2005). Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* **111**, 2469-2476.
- Dixon RAF, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz J and Strader CD (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian B-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**, 75-79.
- Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK and Scott JD (2001). mA<sub>2</sub>KAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* **20**, 1921-1930.
- Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS and Scott JD (2005). The protein kinase A anchoring protein mA<sub>2</sub>KAP co-ordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**, 574-578.
- Dollery CM and Libby P (2006). Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* **69**, 625-35.
- Donoso MV, Aedo F and Huidobro-Toro JP (2006). The role of adenosine A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub> receptors on the differential modulation of norepinephrine and neuropeptide Y release from peripheral sympathetic nerve terminals. *J Neurochem* **96**, 1680-95.
- Dora KA, Gallagher NT, McNeish A and Garland CJ (2008). Modulation of endothelial cell K<sub>Ca</sub>3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circ Res* **102**, 1247-55.
- Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Hornig B, Just H, Brunner HR and Zelis R (1992). Endothelial Function in Chronic Congestive Heart Failure. *Am J Cardiol* **69**, 1596-1601.
- Drexler H and Lu W (1992). Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. *Am J Physiol* **262**, H1640-5.
- Duncker DJ and Bache RJ (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* **88**, 1009-86.
- Dunkerley HA, Tilley DG, Palmer D, Liu H, Jimmo SL and Maurice DH (2002). Reduced phosphodiesterase 3 activity and phosphodiesterase 3A level in synthetic vascular smooth muscle cells: implications for use of phosphodiesterase 3 inhibitors in cardiovascular tissues. *Mol Pharmacol* **61**, 1033-40.
- Dunlay SM, Shah ND, Shi Q, Morlan B, VanHouten H, Long KH and Roger VL (2011). Lifetime costs of medical care after heart failure diagnosis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* **4**, 68-75.
- Dzau VJ (2001). Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* **37**, 1047-52.
- Eckly AE and Lugnier C (1994). Role of phosphodiesterases III and IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/cyclic GMP pathway. *Br J Pharmacol* **113**, 445-450.
- Eckly AE, Stoclet JC and Lugnier C (1994). Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* **271**, 237-40.
- Eckly-Michel A, Martin V and Lugnier C (1997). Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *British J Pharmacol* **122**, 158-164.
- Eddinger TJ and Meer DP (1997). Myosin isoform heterogeneity in single smooth muscle cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **117**, 29-38.
- Eddinger TJ and Murphy RA (1991). Developmental changes in actin and myosin heavy chain isoform expression in smooth muscle. *Arch Biochem Biophys* **284**, 232-7.

Edmondson SD, Mastracchio A, He J, Chung CC, Forrest MJ, Hofsess S, MacIntyre E, Metzger J, O'Connor N, Patel K, Tong X, Tota MR, Van der Ploeg LH, Varnerin JP, Fisher MH, Wyvratt MJ, Weber AE and Parmee ER (2003). Benzyl vinyllogous amide substituted aryldihydropyridazinones and aryldimethylpyrazolones as potent and selective PDE3B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 3983-7.

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delaunier-Klutchko C and Strosberg D (1989). Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science* **245**, 1118-1121.

Enserink JM, Price LS, Methi T, Mahic M, Sonnenberg A, Bos JL and Tasken K (2004). The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the  $\alpha_3\beta_1$  integrin but not the  $\alpha_6\beta_4$  integrin. *J Biol Chem* **279**, 44889-44896.

Eto M, Kitazawa T, Yazawa M, Mukai H, Ono Y and Brautigan DL (2001). Histamine-induced vasoconstriction involves phosphorylation of a specific inhibitor protein for myosin phosphatase by protein kinase C  $\alpha$  and  $\delta$  isoforms. *J Biol Chem* **276**, 29072-8.

Fang ZY and Marwick TH (2002). Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? *Am Heart J* **143**, 383-90.

Fantozzi DA, Harootunian AT, Wen W, Taylor SS, Feramisco JR, Tsien RY and Meinkoth JL (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem* **269**, 2676-86.

Fatigati V and Murphy RA (1984). Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem* **259**, 14383-8.

Favot L, Keravis T, Holl V, Le Bec A and Lugnier C (2003). VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. *Thromb Haemost* **90**, 334-43.

Favot L, Keravis T and Lugnier C (2004). Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost* **92**, 634-45.

Feinstein PG, Schrader KA, Bakalyar HA, Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG and Reed RR (1991). Molecular cloning and characterization of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10173-7.

Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE and Lorell BH (1993). Selective Changes in Cardiac Gene Expression During Compensated Hypertrophy and the Transition to Cardiac Decompensation in Rats with Chronic Aortic Banding. *Circ Res* **73**, 184-192.

Feletou M, Huang Y and Vanhoutte PM (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* **164**, 894-912.

Feletou M and Vanhoutte PM (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H985-1002.

Feletou M and Vanhoutte PM (2007). Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. *Ann Med* **39**, 495-516.

Feletou M, Verbeuren TJ and Vanhoutte PM (2009). Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol* **156**, 563-74.

Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y and Queen L (2004). Nitric oxide-dependent  $\beta_2$ -adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br J Pharmacol* **143**, 397-403.

Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L and Ward JP (1999). Activation of nitric oxide synthase by  $\beta_2$ -adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol* **126**, 1872-80.

- Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, Roberts JD, Fay WP, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Sabeh F, Allen ED and Weiss SJ (2005). MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* **202**, 663-71.
- Fillinger MF, Sampson LN, Cronenwett JL, Powell RJ and Wagner RJ (1997). Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models. *J Surg Res* **67**, 169-78.
- Fimia GM and Sassone-Corsi P (2001). Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci* **114**, 1971-1972.
- Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B and Drexler H (2005). Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J* **26**, 65-9.
- Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J and Vandecasteele G (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* **99**, 816-828.
- Fleming I and Busse R (1999). Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* **43**, 532-541.
- Fleming I and Busse R (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**, R1-12.
- FLOCKERZI V, OEKEN H-J and HOFMANN F (1986). Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem* **161**:217-224.
- Forfia PR, Lee M, Tunin RS, Mahmud M, Champion HC and Kass DA (2007). Acute phosphodiesterase 5 inhibition mimics hemodynamic effects of B-type natriuretic peptide and potentiates B-type natriuretic peptide effects in failing but not normal canine heart. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1079-88.
- Francis GS and Cohn JN (1990). Heart failure: mechanisms of cardiac and vascular dysfunction and the rationale for pharmacologic intervention. *FASEB J* **4**, 3068-75.
- Francis GS, Goldsmith SR, Levine TB, Olivari MT and Cohn JN (1984). The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern Med* **101**, 370-7.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD and Sibley D (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* **62**, 525-63.
- Freedman NJ and Lefkowitz RJ (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* **51**, 319-51; discussion 352-3.
- Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ and Kobilka BK (1987). Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7920-4.
- Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K and Mochizuki N (2005). Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **25**, 136-146.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A and Sessa WC (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601.
- Furchgott RF (1967). The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. *Ann N Y Acad Sci* **139**, 553-70.
- Furchgott RF and Vanhoutte PM (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* **3**, 2007-18.

- Furchgott RF and Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-6.
- Gaballa MA, Eckhart A, Koch WJ and Goldman S (2001). Vascular beta-adrenergic receptor system is dysfunctional after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1129-H1135.
- Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhashtonay C, Vandekerckhove J, Weber K and Franke WW (1981). Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 298-302.
- Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R and Corson MA (1999). Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem* **274**, 30101-8.
- Gao BN and Gilman AG (1991). Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10178-10182.
- Garavito RM and DeWitt DL (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* **1441**, 278-87.
- Gauthier C, Langin D and Balligand JL (2000).  $\beta_3$ -Adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 426-431.
- Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D and Lemarec H (1996). Functional  $\beta_3$ -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* **98**, 556-562.
- Giachini FR, Lima VV, Carneiro FS, Tostes RC and Webb RC (2011). Decreased cGMP level contributes to increased contraction in arteries from hypertensive rats: role of phosphodiesterase 1. *Hypertension* **57**, 655-63.
- Gimona M, Djinovic-Carugo K, Kranewitter WJ and Winder SJ (2002). Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett* **513**, 98-106.
- Gloerich M and Bos JL (2010). Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 355-75.
- Gluais P, Edwards G, Weston AH, Falck JR, Vanhoutte PM and Feletou M (2005a). Role of SK(Ca) and IK(Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. *Br J Pharmacol* **144**, 477-85.
- Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM and Feletou M (2005b). Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* **146**, 834-45.
- Goncalves RL, Lugnier C, Keravis T, Lopes MJ, Fantini FA, Schmitt M, Cortes SF and Lemos VS (2009). The flavonoid diocleins is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. *Eur J Pharmacol* **620**, 78-83.
- Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH and Benovic JL (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-50.
- Goyal RK (1989). Muscarinic receptor subtypes. Physiology and clinical implications. *N Engl J Med* **321**, 1022-9.
- Grace GC, Macdonald PS and Dusting GJ (1988). Cyclic nucleotide interactions involved in endothelium-dependent dilatation in rat aortic rings. *Eur J Pharmacol* **148**, 17-24.

- Graves J and Poston L (1993). beta-Adrenoceptor Agonist Mediated Relaxation of Rat Isolated Resistance Arteries - A Role for the Endothelium and Nitric Oxide. *Br J Pharmacol* **108**, 631-637.
- Gray DW and Marshall I (1992). Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* **107**, 684-90.
- Greif DM, Kou R and Michel T (2002). Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry* **41**, 15845-53.
- Griffith TM and Taylor HJ (1999). Cyclic AMP mediates EDHF-type relaxations of rabbit jugular vein. *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 52-7.
- Gros R, Ding Q, Chorazyczewski J, Pickering JG, Limbird LE and Feldman RD (2006). Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization. *Circ Res* **99**, 845-52.
- Gross NJ, Giembycz MA and Rennard SI (2010). Treatment of chronic obstructive pulmonary disease with roflumilast, a new phosphodiesterase 4 inhibitor. *COPD* **7**, 141-53 .
- Gryglewski RJ, Palmer RM and Moncada S (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**, 454-6.
- Gschwend S, Henning RH, Pinto YM, de Zeeuw D, van Gilst WH and Buikema H (2003). Myogenic constriction is increased in mesenteric resistance arteries from rats with chronic heart failure: instantaneous counteraction by acute AT1 receptor blockade. *Br J Pharmacol* **139**, 1317-25.
- Gueguen M, Keuylian Z, Mateo V, Mougnot N, Lompre AM, Michel JB, Meilhac O, Lipskaia L and Limon I (2010). Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling. *J Pathol* **221**, 331-42.
- Guimaraes S (1975). Further study of the adrenoceptors of the saphenous vein of the dog: influence of factors which interfere with the concentrations of agonists at the receptor level. *Eur J Pharmacol* **34**, 9-19.
- Guimaraes S, Mota A and Begonha R (1993). The effectiveness of beta-adrenoceptor stimulation and the contribution of beta 1-adrenoceptors increase from the proximal to the distal part of the canine saphenous vein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **347**, 596-600.
- Guimaraes S and Moura D (2001). Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacol Rev* **53**, 319-356.
- Habib F, Dutka D, Crossman D, Oakley CM and Cleland JG (1994). Enhanced basal nitric oxide production in heart failure: another failed counter-regulatory vasodilator mechanism? *Lancet* **344**, 371-3.
- Hai CM and Murphy RA (1988). Cross-bridge phosphorylation and regulation of latch state in smooth muscle. *Am J Physiol* **254**, C99-106.
- Hai CM and Murphy RA (1989). Cross-bridge dephosphorylation and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* **256**, C282-7.
- Hamet P, Pang SC and Tremblay J (1989). Atrial natriuretic factor-induced egression of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Biol Chem* **264**, 12364-9.
- Hanafy KA, Krumenacker JS and Murad F (2001). NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* **7**, 801-19.
- Hanoune J and Defer N (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-174.
- Hao H, Gabbiani G and Bochaton-Piallat ML (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for

- atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1510-20.
- Hao H, Ropraz P, Verin V, Camenzind E, Geinoz A, Pepper MS, Gabbiani G and Bochaton-Piallat ML (2002). Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1093-9.
- Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmuller P, Eddahibi S, Lompre AM, Humbert M and Hulot JS (2011). Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *J Clin Invest* **121**, 2888-97.
- Harrison DG (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* **100**, 2153-7.
- Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M and Searles C (2006). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med* **259**, 351-63.
- Hartshorne DJ, Ito M and Erdodi F (2004). Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem* **279**, 37211-4.
- Hasenfuss G (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* **39**, 60-76.
- Hatzelmann A and Schudt C (2001). Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 267-79.
- Hautmann MB, Madsen CS and Owens GK (1997). A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CARG elements. *J Biol Chem* **272**, 10948-56.
- Hayashi K, Saga H, Chimori Y, Kimura K, Yamanaka Y and Sobue K (1998). Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **273**, 28860-7.
- Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Taniyama Y, Nakamura T, Aoki M, Yamamoto K, Higaki J and Ogihara T (2000). Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension* **35**, 237-43.
- Haynes J, Killilea DW, Peterson PD and Thompson WJ (1996). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic-3',5'-guanosine monophosphate-stimulated phosphodiesterase to reverse hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perfused rat lung. *J Pharmacol Exp Ther* **276**, 752-757.
- Hayward IP, Bridle KR, Campbell GR, Underwood PA and Campbell JH (1995). Effect of extracellular matrix proteins on vascular smooth muscle cell phenotype. *Cell Biol Int* **19**, 727-34.
- Haywood GA, Tsao PS, Vonderleyen HE, Mann MJ, Kelling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ and Fowler MB (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* **93**, 1087-1094.
- He R, Komasa N, Ekholm D, Murata T, Taira M, Hockman S, Degerman E and Manganiello VC (1998). Expression and characterization of deletion recombinants of two cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE-3). *Cell Biochem Biophys* **29**, 89-111.
- Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S and Thyberg J (1988). Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* **107**, 307-19.
- Hedin U and Thyberg J (1987). Plasma fibronectin promotes modulation of arterial smooth-muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation* **33**, 239-46.
- Heerkens EH, Izzard AS and Heagerty AM (2007). Integrins, vascular remodeling, and hypertension.



*Hypertension* **49**, 1-4.

Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A and Betsholtz C (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126**, 3047-55.

Heydarkhan-Hagvall S, Helenius G, Johansson BR, Li JY, Mattsson E and Risberg B (2003). Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors. *J Cell Biochem* **89**, 1250-9.

Heymes C, Habib A, Yang D, Mathieu E, Marotte F, Samuel J and Boulanger CM (2000). Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *Br J Pharmacol* **131**, 804-10.

Hidaka H, Hayashi H, Kohri H, Kimura Y, Hosokawa T, Igawa T and Saitoh Y (1979). Selective inhibitor of platelet cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase, cilostamide, inhibits platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* **211**, 26-30.

Hill CE, Rummery N, Hickey H and Sandow SL (2002). Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: implications for function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 620-5.

Himpens B, Kitazawa T and Somlyo AP (1990). Agonist-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflügers Arch* **417**, 21-28.

Hirano K (2007). Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* **104**, 109-15.

Hirano K, Hirano M and Kanaide H (2004). Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res* **40**, 219-36.

Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, Takeshima H and Iino M (1999). Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca<sup>2+</sup> mobilization patterns. *Science* **284**, 1527-30.

Hocevar BA and Howe PH (2000). Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components. *Methods Mol Biol* **142**, 55-65.

Hodges GJ, Jackson DN, Mattar L, Johnson JM and Shoemaker JK (2009). Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R546-55.

Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ and Klotz KN (2004). Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 151-9.

Horiuchi KY, Miyata H and Chacko S (1986). Modulation of smooth muscle actomyosin ATPase by thin filament associated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **136**, 962-8.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R and Morgan KG (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* **76**, 967-1003.

Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkenstein JD, Sussman MA and Koch WJ (2012). Animal Models of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res* **111**, 131-150.

Houslay MD and Adams DR (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* **370**, 1-18.

Houslay MD, Baillie GS and Maurice DH (2007). cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: A molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* **100**, 950-966.

- Huang QQ, Fisher SA and Brozovich FV (2004). Unzipping the role of myosin light chain phosphatase in smooth muscle cell relaxation. *J Biol Chem* **279**, 597-603.
- Humphrey MB, Herrera-Sosa H, Gonzalez G, Lee R and Bryan J (1992). Cloning of cDNAs encoding human caldesmons. *Gene* **112**, 197-204.
- Ignarro LJ, Adams JB, Horwitz PM and Wood KS (1986). Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem* **261**, 4997-5002.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS and Chaudhuri G (1988). Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 181-9.
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS and Kadowitz PJ (1986). Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* **237**, 893-900.
- Iida S, Chu Y, Francis J, Weiss RM, Gunnett CA, Faraci FM and Heistad DD (2005). Gene transfer of extracellular superoxide dismutase improves endothelial function in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H525-32.
- Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, Grieco D, Cavuto L, Stingone AM, Ciullo I, Condorelli G and Chiariello M (1997). Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med* **3**, 775-9.
- Ingber D (1991). Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 841-8.
- Inoue Y, Toga K, Sudo T, Tachibana K, Tochizawa S, Kimura Y, Yoshida Y and Hidaka H (2000). Suppression of arterial intimal hyperplasia by cilostamide, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 inhibitor, in a rat balloon double-injury model. *Br J Pharmacol* **130**, 231-41.
- Inscho EW, Cook AK, Mui V and Imig JD (1998). Calcium mobilization contributes to pressure-mediated afferent arteriolar vasoconstriction. *Hypertension* **31**, 421-8.
- Insel PA, Head BP, Patel HH, Roth DM, Bunday RA and Swaney JS (2005). Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem Soc Trans* **33**, 1131-1134.
- Iranami H, Hatano Y, Tsukiyama Y, Maeda H and Mizumoto K (1996). A beta-adrenoceptor agonist evokes a nitric oxide-cGMP relaxation mechanism modulated by adenylyl cyclase in rat aorta. Halothane does not inhibit this mechanism. *Anesthesiology* **85**, 1129-38.
- Isakson BE, Ramos SI and Duling BR (2007). Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction. *Circ Res* **100**, 246-54.
- Ishikawa Y and Homcy CJ (1997). The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* **80**, 297-304.
- Ishikawa Y, Katsushika S, Chen L, Halnon NJ, Kawabe J and Homcy CJ (1992). Isolation and Characterization of a Novel Cardiac Adenylylcyclase cDNA. *J Biol Chem* **267**, 13553-13557.
- Janakidevi K, Fisher MA, Del Vecchio PJ, Tirupathi C, Figge J and Malik AB (1992). Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* **263**, C1295-301.
- Jang EK, Davidson M, Crankshaw D and Haslam RJ (1993). Synergistic inhibitory effects of atriopeptin II and isoproterenol on contraction of rat aortic smooth muscle: roles of cGMP and cAMP. *Eur J Pharmacol* **250**, 477-481.

- Janiak R, Wilson SM, Montague S and Hume JR (2001). Heterogeneity of calcium stores and elementary release events in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C22-33.
- Jessup M and Brozena S (2003). Heart failure. *N Engl J Med* **348**, 2007-18.
- Jin JP, Walsh MP, Resek ME and McMartin GA (1996). Expression and epitopic conservation of calponin in different smooth muscles and during development. *Biochem Cell Biol* **74**, 187-96.
- Jin L, Ying Z and Webb RC (2004). Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H1495-500.
- Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD and Berk BC (2003). Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* **93**, 354-63.
- Johnson RA, Yeung SMH, Stubner D, Bushfield M and Shoshani I (1989). Cation and Structural Requirements for P-Site-Mediated Inhibition of Adenylate Cyclase. *Mol Pharmacol*, *V35, N5, P681-688*
- Joki N, Kaname S, Hirakata M, Hori Y, Yamaguchi T, Fujita T, Katoh T and Kurokawa K (2000). Tyrosine-kinase dependent TGF-beta and extracellular matrix expression by mechanical stretch in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* **23**, 91-9.
- Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R and Veksler V (2008). Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* **586**, 5181-92.
- Jurevicius J and Fischmeister R (1996). cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by  $\beta$ -adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 295-299.
- Kaiser L, Spickard RC and Olivier NB (1989). Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *Am J Physiol* **256**, H962-7.
- Kamata K, Miyata N and Kasuya Y (1989). Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* **249**, 890-4.
- Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J and Steegborn C (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* **362**, 623-39.
- Kang KB, Rajanayagam MA, van der Zyppe A and Majewski H (2007). A role for cyclooxygenase in aging-related changes of beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat aortas. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **375**, 273-81.
- Karim SM, Rhee AY, Given AM, Faulx MD, Hoit BD and Brozovich FV (2004). Vascular reactivity in heart failure: role of myosin light chain phosphatase. *Circ Res* **95**, 612-8.
- Katsushika S, Chen L, Kawabe J, Nilakantan R, Halnon NJ, Homcy CJ and Ishikawa Y (1992). Cloning and characterization of a sixth adenylyl cyclase isoform: types V and VI constitute a subgroup within the mammalian adenylyl cyclase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8774-8.
- Katusic ZS, Shepherd JT and Vanhoutte PM (1988). Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries. *Stroke* **19**, 476-9.
- Katz SD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeau G, Galvao M, Solomon S, Nikolic SD, Forman R and LeJemtel TH (1992). Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* **19**, 918-25.
- Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A and Yasskiy A (2005). Vascular

- endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation* **111**, 310-4.
- Katz SD, Schwarz M, Yuen J and LeJemtel TH (1993). Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure. Role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation* **88**, 55-61.
- Kawada T, Toyosato A, Islam MO, Yoshida Y and Imai S (1997). cGMP-kinase mediates cGMP- and cAMP-induced Ca<sup>2+</sup> desensitization of skinned rat artery. *Eur J Pharmacol* **323**, 75-82.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE and Graybiel AM (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.
- Kawasaki H, Takasaki K, Saito A and Goto K (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature* **335**, 164-7.
- Kazi M, Lundmark K, Religa P, Gouda I, Larm O, Ray A, Swedenborg J and Hedin U (2002). Inhibition of rat smooth muscle cell adhesion and proliferation by non-anticoagulant heparins. *J Cell Physiol* **193**, 365-72.
- Kenagy RD and Clowes AW (1995). Regulation of baboon arterial smooth muscle cell plasminogen activators by heparin and growth factors. *Thromb Res* **77**, 55-61.
- Keravis T, Komasa N and Lugnier C (2000). Cyclic nucleotide hydrolysis in bovine aortic endothelial cells in culture: differential regulation in cobblestone and spindle phenotypes. *J Vasc Res* **37**, 235-49.
- Kiermayer S, Biondi RM, Imig J, Plotz G, Haupenthal J, Zeuzem S and Piiper A (2005). Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol Biol Cell* **16**, 5639-48.
- Kim BS, Nikolovski J, Bonadio J and Mooney DJ (1999). Cyclic mechanical strain regulates the development of engineered smooth muscle tissue. *Nat Biotechnol* **17**, 979-83.
- Kim D, Rybalkin SD, Pi X, Wang Y, Zhang C, Munzel T, Beavo JA, Berk BC and Yan C (2001). Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation* **104**, 2338-43.
- Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP and Khaleqzaman M (2003). Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca<sup>2+</sup> sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol* **546**, 879-89.
- Kiuchi K, Sato N, Shannon RP, Vatner DE, Morgan K and Vatner SF (1993). Depressed beta-Adrenergic Receptor-Mediated and Endothelium-Mediated Vasodilation in Conscious Dogs with Heart Failure. *Circ Res* **73**, 1013-1023.
- Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G, Reidy MA, Cokay MS, Peters H and Huttner I (1991). Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. Biochemical and morphologic studies. *Lab Invest* **65**, 459-70.
- Kohout TA and Lefkowitz RJ (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**, 9-18.
- Komasa N, Lugnier C, Andriantsitohaina R and Stoclet JC (1991). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* **208**, 85-87.
- Komasa N, Lugnier C, Le Bec A, Serradeil-Le Gal C, Barthelemy G and Stoclet JC (1989). Differential sensitivity to cardiotonic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. *J Cardiovasc Pharmacol* **14**, 213-220.
- Komasa N, Lugnier C and Stoclet JC (1991). Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* **104**, 495-503.

- Komori K, Lorenz RR and Vanhoutte PM (1988). Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am J Physiol* **255**, H207-12.
- Kondo K, Umemura K, Miyaji M and Nakashima M (1999). Milrinone, a phosphodiesterase inhibitor, suppresses intimal thickening after photochemically induced endothelial injury in the mouse femoral artery. *Atherosclerosis* **142**, 133-8.
- Konishi M and Su C (1983). Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* **5**, 881-6.
- Konkar AA, Zhu Z and Granneman JG (2000). Aryloxypropanolamine and catecholamine ligand interactions with the beta(1)-adrenergic receptor: evidence for interaction with distinct conformations of beta(1)-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 923-32.
- Kooistra MR, Corada M, Dejana E and Bos JL (2005). Epc1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett* **579**, 4966-4972.
- Kopperud R, Krakstad C, Selheim F and Doskeland SO (2003). cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett* **546**, 121-126.
- Korenbaum E and Rivero F (2002). Calponin homology domains at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3543-5.
- Kotani M, Fukuda N, Ando H, Hu WY, Kunimoto S, Saito S and Kanmatsuse K (2003). Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting PDGF A-chain mRNA specifically inhibits neointima formation in rat carotid artery after balloon injury. *Cardiovasc Res* **57**, 265-76.
- Kou R, Greif D and Michel T (2002). Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem* **277**, 29669-73.
- Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S and Nishizawa Y (2001). Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol* **186**, 1-10.
- Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne DJ and Nakano T (2000). Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett* **475**, 197-200.
- Kozłowska H, Szymbaska U, Schlicker E and Malinowska B (2003). Atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors and probably from the low-affinity state of beta 1-adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **140**, 3-12.
- Kronemann N, Nockher WA, Busse R and Schini-Kerth VB (1999). Growth-inhibitory effect of cyclic GMP- and cyclic AMP-dependent vasodilators on rat vascular smooth muscle cells: effect on cell cycle and cyclin expression. *Br J Pharmacol* **126**, 349-57.
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR and Gilman AG (1989). Adenylyl Cyclase Amino Acid Sequence - Possible Channel-Like or Transporter-Like Structure. *Science* **244**, 1558-1564.
- Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC and Watson PA (1992). Molecular diversity in the adenylylcyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI. *J Biol Chem* **267**, 24858-24862.
- Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Raij L, Kraemer MD, Tadros P, Beardslee M and Garr MD (1994). Lack of contribution of nitric oxide to basal vasomotor tone in heart failure. *Am J Cardiol* **74**, 1133-6.
- Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE and Heifetz SM (1991). Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* **84**, 1589-96.

- Kume H, Hall IP, Washabau RJ, Takagi K and Kotlikoff MI (1994). beta-Adrenergic Agonists Regulate K-Ca Channels in Airway Smooth Muscle by cAMP-Dependent and -Independent Mechanisms. *J Clin Invest* **93**, 371-379.
- Lafontan M (1994). Differential recruitment and differential regulation by physiological amines of fat cell beta-1, beta-2 and beta-3 adrenergic receptors expressed in native fat cells and in transfected cell lines. *Cell Signaling* **6**, 363-392.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P and Michel T (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6348-52.
- Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B and Drexler H (2002). Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**, 3073-8.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP and Brown TG Jr (1967a). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* **214**, 597-8.
- Lands AM, Luduena FP and Buzzo HJ (1967b). Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci* **6**, 2241-9.
- Langer SZ (1974). Selective metabolic pathways for noradrenaline in the peripheral and in the central nervous system. *Med Biol* **52**, 372-83.
- Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, Banquet S, Allieres C, Leroux L, Desgranges C, Gadeau A and Muller B (2008).  $\beta$ -adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent  $\beta_2$  component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* **77**, 202-10.
- Lee YH, Gallant C, Guo H, Li Y, Wang CA and Morgan KG (2000). Regulation of vascular smooth muscle tone by N-terminal region of caldesmon. Possible role of tethering actin to myosin. *J Biol Chem* **275**, 3213-20.
- Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SLC, Conti M and Marks A (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* **123**, 23-35.
- Lehti K, Rose NF, Valavaara S, Weiss SJ and Keski-Oja J (2009). MT1-MMP promotes vascular smooth muscle dedifferentiation through LRP1 processing. *J Cell Sci* **122**, 126-35.
- Leinweber B, Parissenti AM, Gallant C, Gangopadhyay SS, Kirwan-Rhude A, Leavis PC and Morgan KG (2000). Regulation of protein kinase C by the cytoskeletal protein calponin. *J Biol Chem* **275**, 40329-36.
- Leinweber BD, Leavis PC, Grabarek Z, Wang CL and Morgan KG (1999). Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem J* **344 Pt 1**, 117-23.
- Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechêne P, Mazet J-L, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2008). Spatiotemporal dynamics of  $\beta$ -adrenergic cAMP signals and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation in adult rat ventricular myocytes: Role of phosphodiesterases. *Circ Res* **102**, 1091-1100.
- Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LR, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Mateo P, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel complex regulates  $\text{Ca}^{2+}$  current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest* **121**, 2651-61.
- Lesh RE, Somlyo AP, Owens GK and Somlyo AV (1995). Reversible permeabilization - A novel technique for the intracellular introduction of antisense oligodeoxynucleotides into intact smooth muscle. *Circ Res* **77**, 220-230.

- Li PF, Dietz R and von Harsdorf R (1997a). Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett* **404**, 249-52.
- Li PF, Dietz R and von Harsdorf R (1997b). Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* **96**, 3602-9.
- Li PL and Campbell WB (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circ Res* **80**, 877-84.
- Li X, Van Putten V, Zarinetchi F, Nicks ME, Thaler S, Heasley LE and Nemenoff RA (1997). Suppression of smooth-muscle alpha-actin expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells involves Ras and cytosolic phospholipase A2. *Biochem J* **327** ( Pt 3), 709-16.
- Lincoln TM, Dey N and Sellak H (2001). Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* **91**, 1421-30.
- Lincoln TM, Wu X, Sellak H, Dey N and Choi CS (2006). Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Front Biosci* **11**, 356-67.
- Lindner V, Olson NE, Clowes AW and Reidy MA (1992). Inhibition of smooth muscle cell proliferation in injured rat arteries. Interaction of heparin with basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest* **90**, 2044-9.
- Lipworth BJ (2005). Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* **365**, 167-75.
- Liu H and Maurice DH (1998). Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissues: differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP. *Br J Pharmacol* **125**, 1501-10.
- Liu H, Palmer D, Jimmo SL, Tilley DG, Dunkerley HA, Pang SC and Maurice DH (2000). Expression of phosphodiesterase 4D (PDE4D) is regulated by both the cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and expression in cells. *J Biol Chem* **275**, 26615-24.
- Liu HG and Maurice DH (1999). Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases - A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J Biol Chem* **274**, 10557-10565.
- Liu S, Laliberte F, Bobechko B, Bartlett A, Lario P, Gorseth E, Van Hamme J, Gresser MJ and Huang Z (2001a). Dissecting the cofactor-dependent and independent bindings of PDE4 inhibitors. *Biochemistry* **40**, 10179-86.
- Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M and Kambayashi Ji J (2001b). Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovasc Drug Rev* **19**, 369-86.
- Lohn M, Furstenu M, Sagach V, Elger M, Schulze W, Luft FC, Haller H and Gollasch M (2000). Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ Res* **87**, 1034-1039.
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG and Lefkowitz RJ (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* **267**, 8558-64.
- Lohse MJ, Engelhardt S and Eschenhagen T (2003). What is the role of  $\beta$ -adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* **93**, 896-906.
- Loukianov E, Loukianova T and Periasamy M (1997). Myosin heavy chain isoforms in smooth muscle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **117**, 13-8.

- Lubomirov LT, Reimann K, Metzler D, Hasse V, Stehle R, Ito M, Hartshorne DJ, Gagov H, Pfitzer G and Schubert R (2006). Urocortin-induced decrease in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of contraction in mouse tail arteries is attributable to cAMP-dependent dephosphorylation of MYPT1 and activation of myosin light chain phosphatase. *Circ Res* **98**, 1159-67.
- Lugnier C (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* **109**, 366-398.
- Lugnier C and Komasa N (1993). Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J* **14 Suppl I**, 141-8.
- Lugnier C and Schini VB (1990). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **39**, 75-84.
- Lugnier C, Schoeffter P, Le Bec A, Strouthou E and Stoclet JC (1986). Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol* **35**, 1743-1751.
- Lugnier CA, Stierle A, Beretz P, Schoeffter A, Lebec CG, Wermuth JC and Stoclet JC (1983). Tissue and substrate specificity of inhibition by Alkoxy-aryl-lactams of platelet and arterial smooth muscle cyclic nucleotide phosphodiesterases relationship to pharmacological activity. *Biochem Biophys Res Comm* **113**, 954-959.
- Luksha L, Agewall S and Kublickiene K (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **202**, 330-44.
- MacDonald JA, Eto M, Borman MA, Brautigan DL and Haystead TA (2001). Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett* **493**, 91-4.
- Maeng M, Mertz H, Nielsen S, van Eys GJ, Rasmussen K and Espersen GT (2003). Adventitial myofibroblasts play no major role in neointima formation after angioplasty. *Scand Cardiovasc J* **37**, 34-42.
- Maggi CA and Meli A (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* **19**, 1-43.
- Mak DO, McBride S and Foskett JK (1998). Inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15821-5.
- Malek M (1999). Health economics of heart failure. *Heart* **82 Suppl 4**, IV11-3.
- Malmjsjo M, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L and Erlinge D (1999). Enhanced acetylcholine and P2Y-receptor stimulated vascular EDHF-dilatation in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* **43**, 200-9.
- Manganiello VC and Degerman E (1999). Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. *Thromb Haemost* **82**, 407-11.
- Marrelli SP, Eckmann MS and Hunte MS (2003). Role of endothelial intermediate conductance K<sub>Ca</sub> channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1590-9.
- Marston SB and Redwood CS (1992). Inhibition of actin-tropomyosin activation of myosin MgATPase activity by the smooth muscle regulatory protein caldesmon. *J Biol Chem* **267**, 16796-800.
- Martinez SE (2007). PDE2 structure and functions. In: *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease*, Eds. J.A. Beavo, S. Francis and M. Houslay. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA pp. 55-77.
- Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG and Beavo JA (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13260-13265.



- Martins TJ, Mimby MC and Beavo JA (1982). Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem* **257**, 1973-1979.
- Mathew R, Wang J, Gewitz MH, Hintze TH and Wolin MS (1993). Congestive heart failure alters receptor-dependent cAMP-mediated relaxation of canine pulmonary arteries. *Circulation* **87**, 1722-8.
- Matsushita T, Rama A, Charolidi N, Dupont E and Severs NJ (2007). Relationship of connexin43 expression to phenotypic modulation in cultured human aortic smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* **86**, 617-28.
- Maurice DH, Crankshaw D and Haslam RJ (1991). Synergistic actions of nitrovasodilators and isoprenaline on rat aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **192**, 235-42.
- Maurice DH and Haslam RJ (1990). Nitroprusside enhances isoprenaline-induced increases in cAMP in rat aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **191**, 471-475.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS and Jimmo SL (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* **64**, 533-546.
- Maurice JP, Shah AS, Kypson AP, Hata JA, White DC, Glower DD and Koch WJ (1999). Molecular beta-adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit hearts after infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **45**, H1853-H1860.
- McDaniel NL, Rembold CM and Murphy RA (1994). Cyclic nucleotide dependent relaxation in vascular smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* **72**, 1380-5.
- McGoldrick RB, Kingsbury M, Turner MA, Sheridan DJ and Hughes AD (2007). Left ventricular hypertrophy induced by aortic banding impairs relaxation of isolated coronary arteries. *Clin Sci (Lond)* **113**, 473-8.
- McKinnon W, Aaronson PI, Knock G, Graves J and Poston L (1996). Mechanism of lactate-induced relaxation of isolated rat mesenteric resistance arteries. *J Physiol* **490 ( Pt 3)**, 783-92.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG and Foord SM (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**, 333-9.
- McNeish AJ, Dora KA and Garland CJ (2005). Possible role for K<sup>+</sup> in endothelium-derived hyperpolarizing factor-linked dilatation in rat middle cerebral artery. *Stroke* **36**, 1526-32.
- Meacci E, Taira M, Moos M, Smith CJ, Movsesian MA, Degerman E, Belfrage P and Manganiello V (1992). Molecular Cloning and Expression of Human Myocardial cGMP-Inhibited cAMP Phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3721-3725.
- Michell BJ, Chen ZP, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT and Kemp BE (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276**, 17625-17628.
- Mika D, Leroy J, Vandecasteele G and Fischmeister R (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 323-9.
- Miller JD, Peotta VA, Chu Y, Weiss RM, Zimmerman K, Brooks RM and Heistad DD (2010). MnSOD protects against COX1-mediated endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H1600-7.
- Miller VM and Vanhoutte PM (1985). Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol* **248**, H432-7.
- Mitani A, Nakahara T, Sakamoto K and Ishii K (2003). Expression of multidrug resistance protein 4 and 5 in the porcine coronary and pulmonary arteries. *Eur J Pharmacol* **466**, 223-4.

- Miyauchi T and Masaki T (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Ann Rev Physiol* **61**, 391-415.
- Moffett S, Mouillac B, Bonin H and Bouvier M (1993). Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J* **12**, 349-56.
- Mohri M, Egashira K, Tagawa T, Kuga T, Tagawa H, Harasawa Y, Shimokawa H and Takeshita A (1997). Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure. *Hypertension* **30**, 50-6.
- Moiseeva EP (2001). Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* **52**, 372-86.
- Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M, Scheitrum C, Lee IO, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, Llach A, Hove-Madsen L, Conti M, Vandecasteele G and Fischmeister R (2012). Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* **59**, 2182-90.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S and Vane JR (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**, 663-5.
- Moncada S, Rees DD, Schulz R and Palmer RM (1991). Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 2166-70.
- Moncada S and Vane JR (1979). The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc* **38**, 66-71.
- Moos WH, Humblet CC, Sircar I, Rithner C, Weishaar RE, Bristol JA and McPhail AT (1987). Cardiotonic agents. 8. Selective inhibitors of adenosine 3',5'-cyclic phosphate phosphodiesterase III. Elaboration of a five-point model for positive inotropic activity. *J Med Chem* **30**, 1963-72.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré A-M, Vandecasteele G and Lezoualc'h F (2005). The cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **97**, 1296-1304.
- Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ and Verde I (2012). Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* **69**, 247-66.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A and Heldin CH (2002). Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* **82**, 85-91.
- Movsesian MA (2002). PDE3 cyclic nucleotide phosphodiesterases and the compartmentation of cyclic nucleotide-mediated signalling in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* **97 Suppl 1**, I83-I90.
- Murthy KS and Makhlof GM (1995). Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **37**, C171-C180.
- Méry P-F, Pavoine C, Pecker F and Fischmeister R (1995). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* **48**, 121-130.
- Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E and Lezoualc'h F (2008). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates  $\beta$ -adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **102**, 959-65.
- Nagaoka T, Shirakawa T, Balon TW, Russell JC and Fujita-Yamaguchi Y (1998). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 expression in vivo: evidence for tissue-specific expression of phosphodiesterase 3A or 3B mRNA and activity in the aorta and adipose tissue of atherosclerosis-prone insulin-resistant rats. *Diabetes* **47**, 1135-44.

- Nagel DJ, Aizawa T, Jeon KI, Liu W, Mohan A, Wei H, Miano JM, Florio VA, Gao P, Korshunov VA, Berk BC and Yan C (2006). Role of nuclear  $Ca^{2+}$ /calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival. *Circ Res* **98**, 777-84.
- Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Saitoh S, Kon H and Hiramori K (2001). Blunted peripheral vasodilatory response is a hallmark of progressive deterioration in mild to moderate congestive heart failure. *J Card Fail* **7**, 38-44.
- Nakamura S and Nishizuka Y (1994). Lipid mediators and protein kinase C activation for the intracellular signaling network. *J Biochem Tokyo* **115**, 1029-1034.
- Nasa Y, Toyoshima H, Ohaku H, Hashizume Y, Sanbe A and Takeo S (1996). Impairment of cGMP- and cAMP-mediated vasorelaxations in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol* **271**, H2228-37.
- Negrao CE, Hamilton MA, Fonarow GC, Hage A, Moriguchi JD and Middlekauff HR (2000). Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H168-74.
- Neidhold S, Eichhorn B, Kasper M, Ravens U and Kaumann AJ (2007). The function of alpha- and beta-adrenoceptors of the saphenous artery in caveolin-1 knockout and wild-type mice. *Br J Pharmacol* **150**, 261-70.
- Nelson CP, Rainbow RD, Brignell JL, Perry MD, Willets JM, Davies NW, Standen NB and Challiss RA (2011). Principal role of adenylyl cyclase 6 in  $K^{+}$  channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **91**, 694-702.
- Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ and Lederer WJ (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**, 633-637.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF and Standen NB (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* **259**, C3-18.
- Netherton SJ, Jimmo SL, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Raymond DR, Russell JC, Absher PM, Sage EH, Vernon RB and Maurice DH (2002). Altered phosphodiesterase 3-mediated cAMP hydrolysis contributes to a hypermotile phenotype in obese JCR:LA-cp rat aortic vascular smooth muscle cells: implications for diabetes-associated cardiovascular disease. *Diabetes* **51**, 1194-200.
- Niessen P, Clement S, Fontao L, Chaponnier C, Teunissen B, Rensen S, van Eys G and Gabbiani G (2004). Biochemical evidence for interaction between smoothelin and filamentous actin. *Exp Cell Res* **292**, 170-8.
- Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A and Lohse MJ (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215-37218.
- Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ and Engelhardt S (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching  $\beta_1$ -adrenergic but locally confined  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* **99**, 1084-1091.
- Nikolaev VO, Gambaryan S, Engelhardt S, Walter U and Lohse MJ (2005). Real-time monitoring of live cell's PDE2 activity: Hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem* **280**, 1716-1719.
- Nikolaev VO and Lohse MJ (2006). Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology (Bethesda)* **21**, 86-92.
- Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE and Gorelik J (2010).  $\beta_2$ -Adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* (in press).
- Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC and Liao JK (2001). Activation of  $\alpha_s$  mediates

induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem* **276**, 15983-9.

Numaguchi Y, Harada M, Osanai H, Hayashi K, Toki Y, Okumura K, Ito T and Hayakawa T (1999). Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **41**, 682-8.

O'Donnell SR and Wanstall JC (1984a). Beta-1 and beta-2 adrenoceptor-mediated responses in preparations of pulmonary artery and aorta from young and aged rats. *J Pharmacol Exp Ther* **228**, 733-8.

O'Donnell SR and Wanstall JC (1984b). The classification of beta-adrenoceptors in isolated ring preparations of canine coronary arteries. *Br J Pharmacol* **81**, 637-44.

Ogoh S and Ainslie PN (2009). Cerebral blood flow during exercise: mechanisms of regulation. *J Appl Physiol* **107**, 1370-80.

Omori K and Kotera J (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* **100**, 309-27.

Oriowo MA (1994). Atypical beta-adrenoceptors in the rat isolated common carotid artery. *Br J Pharmacol* **113**, 699-702.

Oriowo MA (1995). Different atypical beta-adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci* **56**, PL269-75.

Orlandi A, Ropraz P and Gabbiani G (1994). Proliferative activity and alpha-smooth muscle actin expression in cultured rat aortic smooth muscle cells are differently modulated by transforming growth factor-beta 1 and heparin. *Exp Cell Res* **214**, 528-36.

Osinski MT, Rauch BH and Schror K (2001). Antimitogenic actions of organic nitrates are potentiated by sildenafil and mediated via activation of protein kinase A. *Mol Pharmacol* **59**, 1044-50.

Osinski MT and Schror K (2000). Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis by phosphodiesterase 3 inhibitors: role of protein kinase A in vascular smooth muscle cell mitogenesis. *Biochem Pharmacol* **60**, 381-7.

Ospina JA, Brevig HN, Krause DN and Duckles SP (2004). Estrogen suppresses IL-1beta-mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H2010-9.

Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW and Insel PA (2001). Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **276**, 42063-42069.

Ostrom RS and Insel PA (2004). The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* **143**, 235-45.

Ostrom RS, Liu X, Head BP, Gregorian C, Seasholtz TM and Insel PA (2002). Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol Pharmacol* **62**, 983-992.

Ostrom RS, Violin JD, Coleman S and Insel PA (2000). Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: Colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* **57**, 1075-1079.

Owens GK (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* **75**, 487-517.

Owens GK, Kumar MS and Wamhoff BR (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**, 767-801.

Owens GK and Thompson MM (1986). Developmental changes in isoactin expression in rat aortic smooth

- muscle cells in vivo. Relationship between growth and cytodifferentiation. *J Biol Chem* **261**, 13373-80.
- Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y and Seino S (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **2**, 805-11.
- Palmer D, Jimmo SL, Raymond DR, Wilson LS, Carter RL and Maurice DH (2007). Protein kinase A phosphorylation of human phosphodiesterase 3B promotes 14-3-3 protein binding and inhibits phosphatase-catalyzed inactivation. *J Biol Chem* **282**, 9411-9.
- Palmer D, Tsoi K and Maurice DH (1998). Synergistic inhibition of vascular smooth muscle cell migration by phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 inhibitors. *Circ Res* **82**, 852-61.
- Palmer RMJ, Ferrige AG and Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Pan X, Arauz E, Krzanowski JJ, Fitzpatrick DF and Polson JB (1994). Synergistic interactions between selective pharmacological inhibitors of phosphodiesterase isozyme families PDE III and PDE IV to attenuate proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **48**, 827-35.
- Pandit J, Forman MD, Fennell KF, Dillman KS and Menniti FS (2009). Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18225-30.
- Park SY, Lee MY, Keum EM, Myung SC and Kim SC (2004). Ionic currents in single smooth muscle cells of the human vas deferens. *J Urol* **172**, 628-33.
- Parkington HC, Coleman HA and Tare M (2004). Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res* **49**, 509-14.
- Patel RC, Handy I and Patel CV (2002). Contribution of double-stranded RNA-activated protein kinase toward antiproliferative actions of heparin on vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1439-44.
- Patel TB, Du ZY, Pierre S, Cartin L and Scholich K (2001). Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* **269**, 13-25.
- Paterson JM, Smith SM, Harmar AJ and Antoni FA (1995). Control of a novel adenylyl cyclase by calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 1000-8.
- Pavan B, Biondi C and Dalpiaz A (2009). Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov Today* **14**, 982-91.
- Pelletier S, Julien C, Popoff MR, Lamarche-Vane N and Meloche S (2005). Cyclic AMP induces morphological changes of vascular smooth muscle cells by inhibiting a Rac-dependent signaling pathway. *J Cell Physiol* **204**, 412-22.
- Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD and Lefkowitz RJ (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to  $\beta_2$ -adrenergic receptors by  $\beta$ -arrestins. *Science* **298**, 834-6.
- Pesic A, Madden JA, Pesic M and Rusch NJ (2004). High blood pressure upregulates arterial L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels: is membrane depolarization the signal? *Circ Res* **94**, e97-104.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P and Hofmann F (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 105-49.
- Pfizer G (2001). Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* **91**, 497-503.

- Phillips PG, Long L, Wilkins MR and Morrell NW (2005). cAMP phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogs in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L103-115.
- Pierce KL, Premont RT and Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650.
- Podzuweit T, Nennstiel P and Muller A (1995). Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cell Signal* **7**, 733-738.
- Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Bito V, Van den Bergh A, Lenaerts I, Busch C, Marsboom G, Gheysens O, Vermeersch P, Biesmans L, Liu X, Gillijns H, Pellens M, Van Lommel A, Buys E, Schoonjans L, Vanhaecke J, Verbeke E, Sipido K, Herijgers P, Bloch KD and Janssens SP (2009). Ventricular Phosphodiesterase-5 Expression Is Increased in Patients With Advanced Heart Failure and Contributes to Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* **119**, 408-416.
- Polson JB and Strada SJ (1996). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 403-427.
- Porter VA, Bonev AD, Knot HJ, Heppner TJ, Stevenson AS, Kleppisch T, Lederer WJ and Nelson MT (1998). Frequency modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol Cell Physiol* **43**, C1346-C1355 .
- Poulos TL (2006). Soluble guanylate cyclase. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 736-43.
- POWELL CE and SLATER IH (1958). Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analog of isoproterenol. *J Pharmacol Exp Ther* **122**, 480-8.
- Premont RT, Chen JQ, Ma HW, Ponnappalli M and Iyengar R (1992). 2 Members of a Widely Expressed Subfamily of Hormone- Stimulated Adenylyl Cyclases. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9809-9813.
- Presta A, Liu J, Sessa WC and Stuehr DJ (1997). Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity. *Nitric Oxide* **1**, 74-87.
- Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel JB, Mercadier JJ and Escoubet B (2002). Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H346-52.
- Pugsley MK and Tabrizchi R (2000). The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods* **44** , 333-40.
- Pukac L, Huangpu J and Karnovsky MJ (1998). Platelet-derived growth factor-BB, insulin-like growth factor-I, and phorbol ester activate different signaling pathways for stimulation of vascular smooth muscle cell migration. *Exp Cell Res* **242**, 548-60.
- Pukac LA, Carter JE, Ottlinger ME and Karnovsky MJ (1997). Mechanisms of inhibition by heparin of PDGF stimulated MAP kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **172**, 69-78.
- Purves GI, Kamishima T, Davies LM, Quayle JM and Dart C (2009). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol* **587**, 3639-50.
- Qu MJ, Liu B, Qi YX and Jiang ZL (2008). Role of Rac and Rho-GDI alpha in the frequency-dependent expression of h1-calponin in vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *Ann Biomed Eng* **36**, 1481-8.
- Qu MJ, Liu B, Wang HQ, Yan ZQ, Shen BR and Jiang ZL (2007). Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *J Vasc Res* **44**, 345-53.

- Queen LR, Ji Y, Xu B, Young L, Yao K, Wyatt AW, Rowlands DJ, Siow RC, Mann GE and Ferro A (2006). Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol* **576**, 585-94.
- Rall TW and Sutherland EW (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* **232**, 1065-1076.
- Rampersad SN, Ovens JD, Houston E, Umana MB, Wilson LS, Netherton SJ, Lynch MJ, Baillie GS, Houslay MD and Maurice DH (2010). Cyclic AMP phosphodiesterase 4D (PDE4D) tethers EPAC1 in a VE-cadherin (VECAD)-based signaling complex and controls cAMP-mediated vascular permeability. *J Biol Chem*
- Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, De Rooij J, Price LS, Schwede F and Bos JL (2003). Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Cell Biol*
- Rascado RR and Bendhack LM (2005). Activation of alpha2-adrenoceptors is necessary to induce nitric oxide release in isoprenaline-induced relaxation. *Vascul Pharmacol* **42**, 63-8.
- Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G and Clowes AW (2004). Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **94**, 340-5.
- Rautureau Y, Toumaniantz G, Serpillon S, Jourdon P, Trochu JN and Gauthier C (2002). Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br J Pharmacol* **137**, 153-161.
- Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC and Bondy CA (1995). Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* **95**, 1528-38.
- Rensen SS, Doevendans PA and van Eys GJ (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* **15**, 100-8.
- Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E and Ives HE (1996). Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **79**, 1046-53.
- Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DMF and Karpen JW (2000). Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol* **116**, 147-161.
- Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J and Karpen JW (2001). In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* **118**, 63-77.
- Richter W and Conti M (2004). The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases. *J Biol Chem* **279**, 30338-48.
- Richter W, Day P, Agraval R, Bruss MD, Granier S, Wang YL, Rasmussen SGF, Horner K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka BK and Conti M (2008). Signaling from  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *Embo J* **27**, 384-393.
- Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DMF, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2006). A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different  $G_s$ -coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* **98**, 1081-1088.
- Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L, Cooper DMF and Fischmeister R (2004). Negative feedback exerted by PKA and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes. An *in vivo* study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* **279**, 52095-52105.
- Rodman DM, Reese K, Harral J, Fouty B, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Li KX, Cool C, Fagan K and

- Cribbs L (2005). Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res* **96**, 864-72.
- Rokolya A and Singer HA (2000). Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C537-45.
- Rondinone CM, Carvalho E, Rahn T, Manganiello VC, Degerman E and Smith UP (2000). Phosphorylation of PDE3B by phosphatidylinositol 3-kinase associated with the insulin receptor. *J Biol Chem* **275**, 10093-8.
- Roscioni SS, Dekkers BG, Prins AG, Menzen MH, Meurs H, Schmidt M and Maarsingh H (2011). cAMP inhibits modulation of airway smooth muscle phenotype via the exchange protein activated by cAMP (Epac) and protein kinase A. *Br J Pharmacol* **162**, 193-209.
- Rose RJ, Liu H, Palmer D and Maurice DH (1997). Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* **122**, 233-240.
- Rose SL and Babensee JE (2007). Complimentary endothelial cell/smooth muscle cell co-culture systems with alternate smooth muscle cell phenotypes. *Ann Biomed Eng* **35**, 1382-90.
- Ross RS (2004). Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res* **63**, 381-90.
- Rovner AS, Murphy RA and Owens GK (1986). Expression of smooth muscle and nonmuscle myosin heavy chains in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **261**, 14740-5.
- Rozec B, Serpillon S, Toumaniantz G, Seze C, Rautureau Y, Baron O, Noireaud J and Gauthier C (2005). Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management. *J Am Coll Cardiol* **46**, 351-9.
- Rybalkin SD and Bornfeldt KE (1999). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and human arterial smooth muscle cell proliferation. *Thromb Haemost* **82**, 424-34.
- Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Sonnenburg WK, Rybalkina IG, Kwak KS, Hanson K, Krebs EG and Beavo JA (1997). Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. *J Clin Invest* **100**, 2611-2621.
- Rybalkin SD, Rybalkina I, Beavo JA and Bornfeldt KE (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* **90**, 151-7.
- Rybin VO, Xu X, Lisanti MP and Steinberg SF (2000). Differential targeting of  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae: a mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem* **275**, 41447-41457.
- Sadhu K, Hensley K, Florio VA and Wolda SL (1999). Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem* **47**, 895-906.
- Saeki T and Saito I (1993). Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes from pig aorta. *Biochem Pharmacol* **46**, 833-9.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K and Masaki T (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**, 732-5.
- Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH and Schuetz JD (2002). Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* **4**, E14.
- Sampson LJ, Hayabuchi Y, Standen NB and Dart C (2004). Caveolae localize protein kinase A signaling to arterial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* **95**, 1012-1018.



- Sanders KM (2001). Signal transduction in smooth muscle - Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Applied Physiol* **91**, 1438-1449.
- Sandow SL, Neylon CB, Chen MX and Garland CJ (2006). Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function? *J Anat* **209**, 689-98.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL and Doetschman T (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**, 2659-70.
- Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, Nikolaev VO, Hatem SN, Cohen Aubart F, Russel FG, Mougnot N, Vrignaud C, Lechat P, Lompre AM and Hulot JS (2008). Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest* **118**, 2747-2757.
- Satake N, Shibata M and Shibata S (1996). The inhibitory effects of iberiotoxin and 4-aminopyridine on the relaxation induced by beta 1- and beta 2-adrenoceptor activation in rat aortic rings. *Br J Pharmacol* **119**, 505-10.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P and Loirand G (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **275**, 21722-21729.
- Savage JM, Gilotti AC, Granzow CA, Molina F and Lowe-Krentz LJ (2001). Antibodies against a putative heparin receptor slow cell proliferation and decrease MAPK activation in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **187**, 283-93.
- Schattemann GC, Loushin C, Li T and Hart CE (1996). PDGF-A is required for normal murine cardiovascular development. *Dev Biol* **176**, 133-42.
- Schmitt CA, Heiss EH, Aristei Y, Severin T and Dirsch VM (2009). Norfuranol dephosphorylates eNOS at threonine 495 and enhances eNOS activity in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* **81**, 750-7.
- Schrier RW and Abraham WT (1999). Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med* **341**, 577-85.
- Schulz E, Anter E, Zou MH and Keaney JF Jr (2005). Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation* **111**, 3473-80.
- Schulze PC, de Keulenaer GW, Kassik KA, Takahashi T, Chen Z, Simon DI and Lee RT (2003). Biomechanically induced gene iex-1 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *Circ Res* **93**, 1210-7.
- Schwabe U, Miyake M, Ohga Y and Daly JW (1976). 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Mol Pharmacol* **12**, 900-10.
- Scornik FS, Codina J, Birnbaumer L and Toro L (1993). Modulation of Coronary Smooth Muscle K(Ca) Channels by G(S)alpha-Independent of Phosphorylation by Protein Kinase-A - Rapid Communication. *Am J Physiol* **265**, H1460-H1465.
- Scott JD and Santana LF (2010). A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation* **121**, 1264-71.
- Sehrawat S, Cullere X, Patel S, Italiano J Jr and Mayadas TN (2008). Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function. *Mol Biol Cell* **19**, 1261-70.
- Shaul PW (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, location, location. *Ann Rev Physiol*

64, 749-774.

Shi Y, Feletou M, Ku DD, Man RY and Vanhoutte PM (2007). The calcium ionophore A23187 induces endothelium-dependent contractions in femoral arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol* **150**, 624-32.

Shi Y, Man RY and Vanhoutte PM (2008). Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. *Acta Pharmacol Sin* **29**, 185-92.

Shirinsky VP, Biryukov KG, Hettasch JM and Sellers JR (1992). Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin. *J Biol Chem* **267**, 15886-92.

Shmigel AV, Eisner DA and Wray S (1998). Properties of voltage-activated. *J Physiol* **511 ( Pt 3)**, 803-11.

Shmygol A and Wray S (2004). Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. *Cell Calcium* **35**, 501-8.

Skalhegg BS and Tasken K (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* **5**, D678-93.

Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, Xu XB, Kobari Y, Pritchard K, Sessa WC and Hintze TH (1996). Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res* **78**, 58-64.

Smith SJ, Cieslinski LB, Newton R, Donnelly LE, Fenwick PS, Nicholson AG, Barnes PJ, Barnette MS and Giembycz MA (2004). Discovery of BRL 50481. *Mol Pharmacol* **66**, 1679-89.

Snyder GD, Krishna UM, Falck JR and Spector AA (2002). Evidence for a membrane site of action for 14,15-EET on expression of aromatase in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1936-42.

Snyder PB, Esselstyn JM, Loughney K, Wolda SL and Florio VA (2005). The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of adipocyte lipolysis. *J Lipid Res* **46**, 494-503.

Sobue K, Muramoto Y, Fujita M and Kakiuchi S (1981). Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5652-5.

Sokoya EM, Burns AR, Setiawan CT, Coleman HA, Parkington HC and Tare M (2006). Evidence for the involvement of myoendothelial gap junctions in EDHF-mediated relaxation in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H385-93.

Somlyo AP and Somlyo AV (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-236.

Sooch S and Marshall I (1997). Atypical beta-adrenoceptors in the rat vasculature. *Ann N Y Acad Sci* **812**, 211-2.

Souness JE, Hassall GA and Parrott DP (1992). Inhibition of pig aortic smooth muscle cell DNA synthesis by selective type III and type IV cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol* **44**, 857-66.

Standley PR, Obards TJ and Martina CL (1999). Cyclic stretch regulates autocrine IGF-I in vascular smooth muscle cells: implications in vascular hyperplasia. *Am J Physiol* **276**, E697-705.

Stegemann JP, Hong H and Nerem RM (2005). Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J Appl Physiol* **98**, 2321-7.

Steinberg SF (2004).  $\beta_2$ -Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 407-415.

Steinberg SF and Brunton LL (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 751-773.

- Steinberg SF, Jaffe EA and Bilezikian JP (1984). Endothelial cells contain beta adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **325**, 310-3.
- Stoclet JC, Boulanger-Saunier C, Lassegue B and Lugnier C (1988). Cyclic nucleotides and calcium regulation in heart and smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* **522**, 106-15.
- Stoffel RH, Pitcher JA and Lefkowitz RJ (1997). Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. *J Memb Biol* **157**, 01-8.
- Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, Kimura Y and Hidaka H (2000). Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* **59**, 347-56.
- Sui GP, Wu C and Fry CH (2003). A description of Ca<sup>2+</sup> channels in human detrusor smooth muscle. *BJU Int* **92**, 476-82.
- Sunahara RK, Dessauer CW and Gilman AG (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461-480.
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM and Mendelsohn ME (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I alpha. *Science* **286**, 1583-1587.
- Surprenant A, Horstman DA, Akbarali H and Limbird LE (1992). A Point Mutation of the alpha2-Adrenoceptor That Blocks Coupling to Potassium But Not Calcium Currents. *Science* **257**, 977-980.
- Suttorp N, Weber U, Welsch T and Schudt C (1993). Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest* **91**, 1421-1428.
- Swierkosz TA, Mitchell JA, Warner TD, Botting RM and Vane JR (1995). Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol* **114**, 1335-42.
- Tahseldar-Roumieh R, Keravis T, Maarouf S, Justiniano H, Sabra R and Lugnier C (2009). PDEs1-5 activity and expression in tissues of cirrhotic rats reveal a role for aortic PDE3 in NO desensitization. *Int J Exp Pathol* **90**, 605-14.
- Takahashi K, Hiwada K and Kokubu T (1988). Vascular smooth muscle calponin. A novel troponin T-like protein. *Hypertension* **11**, 620-6.
- Takahashi K, Osanai T, Nakano T, Wakui M and Okumura K (2002). Enhanced activities and gene expression of phosphodiesterase types 3 and 4 in pressure-induced congestive heart failure. *Heart Vessels* **16**, 249-56.
- Takahashi S and Mendelsohn ME (2003). Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* **278**, 30821-7.
- Takahashi S, Oida K, Fujiwara R, Maeda H, Hayashi S, Takai H, Tamai T, Nakai T and Miyabo S (1992). Effect of cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* **20**, 900-6.
- Tamura K, Chen YE, Lopez-Illasaca M, Daviet L, Tamura N, Ishigami T, Akishita M, Takasaki I, Tokita Y, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ and Umemura S (2000). Molecular mechanism of fibronectin gene activation by cyclic stretch in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **275**, 34619-27.
- Tanaka T, Ishikawa T, Hagiwara M, Onoda K, Itoh H and Hidaka H (1988). Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology* **36**, 313-20.
- Tang EH, Leung FP, Huang Y, Feletou M, So KF, Man RY and Vanhoutte PM (2007). Calcium and reactive

oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *Br J Pharmacol* **151**, 15-23.

Tang EH and Vanhoutte PM (2008). Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics* **32**, 409-18.

Tang EH and Vanhoutte PM (2009). Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther* **122**, 140-9.

Tang WJ and Gilman AG (1991). Type-Specific Regulation of Adenylyl Cyclase by G-Protein  $\beta$ gamma-Subunits. *Science*, *254* (5037) p1500-1503

Tang WJ, Krupinski J and Gilman AG (1991). Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylylcyclase. *J Biol Chem* **266**, 8595-603.

Tasken K and Aandahl EM (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* **84**, 137-167.

Taylor SG and Weston AH (1988). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* **9**, 272-4.

Taylor SS, Buechler JA and Yonemoto W (1990). cAMP-Dependent Protein Kinase - Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes. *Ann Rev Biochem* **59**, 971-1005.

Thomae KR, Nakayama DK, Billiar TR, Simmons RL, Pitt BR and Davies P (1995). The effect of nitric oxide on fetal pulmonary artery smooth muscle growth. *J Surg Res* **59**, 337-43.

Thompson WJ and Appleman MM (1971). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* **10**, 311-316.

Thorneloe KS and Nelson MT (2005). Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol* **83**, 215-42.

Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L and Bottger BA (1990). Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* **10**, 966-90.

Thyberg J and Hultgardh-Nilsson A (1994). Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res* **276**, 263-71.

Tilley DG and Maurice DH (2002). Vascular smooth muscle cell phosphodiesterase (PDE) 3 and PDE4 activities and levels are regulated by cyclic AMP in vivo. *Mol Pharmacol* **62**, 497-506.

Tilley DG and Maurice DH (2005). Vascular smooth muscle cell phenotype-dependent phosphodiesterase 4D short form expression: role of differential histone acetylation on cAMP-regulated function. *Mol Pharmacol* **68**, 596-605.

Tock J, Van Putten V, Stenmark KR and Nemenoff RA (2003). Induction of SM-alpha-actin expression by mechanical strain in adult vascular smooth muscle cells is mediated through activation of JNK and p38 MAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 1116-21.

Todorov LD, Mihaylova-Todorova ST, Bjur RA and Westfall DP (1999). Differential cotransmission in sympathetic nerves: role of frequency of stimulation and prejunctional autoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 241-6.

Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M, Sakuma I, Kitabatake A and Kanno M (1999). Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of

processes mediating precontractions. *J Vasc Res* **36**, 311-20.

Toyoshima H, Nasa Y, Kohsaka Y, Isayama Y, Yamaguchi F, Sanbe A and Takeo S (1998). The effect of chronic treatment with trandolapril on cyclic AMP-and cyclic GMP-dependent relaxations in aortic segments of rats with chronic heart failure. *Br J Pharmacol* **123**, 344-52.

Tresguerres M, Levin LR and Buck J (2011). Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int* **79**, 1277-88.

Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, Berdeaux A and Gauthier C (1999). Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* **128**, 69-76.

Vadiveloo PK, Filonzi EL, Stanton HR and Hamilton JA (1997). G1 phase arrest of human smooth muscle cells by heparin, IL-4 and cAMP is linked to repression of cyclin D1 and cdk2. *Atherosclerosis* **133**, 61-9.

Vallot O, Combettes L, Jourdon P, Inamo J, Marty I, Claret M and Lompre AM (2000). Intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1225-35.

Vallot O, Combettes L and Lompre AM (2001). Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem J* **357**, 363-71.

van Breemen C and Saida K (1989). Cellular mechanisms regulating. *Annu Rev Physiol* **51**, 315-29.

van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC and van Eys GJ (1996). Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol* **134**, 401-11.

van der Zyppe A, Kang KB and Majewski H (2000). Age-related involvement of the endothelium in beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat aorta. *Eur J Pharmacol* **397**, 129-38.

Vanhoutte PM (1997). Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* **18 Suppl E**, E19-29.

Vanhoutte PM and De Mey J (1983). Control of vascular smooth muscle function by the endothelial cells. *Gen Pharmacol* **14**, 39-41.

Vanhoutte PM, Feletou M and Taddei S (2005). Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* **144**, 449-58.

Vanhoutte PM and Shimokawa H (1989). Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation* **80**, 1-9.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH and Feletou M (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* **196**, 193-222.

Vanhoutte PM and Tang EH (2008). Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J Physiol* **586**, 5295-304.

Vegesna RV and Diamond J (1984). Effects of isoproterenol and forskolin on tension, cyclic AMP levels, and cyclic AMP dependent protein kinase activity in bovine coronary artery. *Can J Physiol Pharmacol* **62**, 1116-23.

Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ and Webb DJ (1998). Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* **97**, 752-6.

Wachten S, Masada N, Ayling LJ, Ciruela A, Nikolaev VO, Lohse MJ and Cooper DM (2010). Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci* **123**, 95-106.

Waitkus-Edwards KR, Martinez-Lemus LA, Wu X, Trzeciakowski JP, Davis MJ, Davis GE and Meininger GA (2002).  $\alpha(4)\beta(1)$  integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. *Circ Res* **90**, 473-480.

Wang X, Hu G, Betts C, Harmon EY, Keller RS, Van De Water L and Zhou J (2011). Transforming growth factor- $\beta$ 1-induced transcript 1 protein, a novel marker for smooth muscle contractile phenotype, is regulated by serum response factor/myocardin protein. *J Biol Chem* **286**, 41589-99.

Wang Z, Yang ZQ and Chacko S (1997). Functional and structural relationship between the calmodulin-binding, actin-binding, and actomyosin-ATPase inhibitory domains on the C terminus of smooth muscle caldesmon. *J Biol Chem* **272**, 16896-903.

Wayman GA, Impey S and Storm DR (1995).  $Ca^{2+}$  inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. *J Biol Chem* **270**, 21480-6.

Webb JG, Yates PW, Yang Q, Mukhin YV and Lanier SM (2001). Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1545-H1552.

Wechsler J, Choi YH, Krall J, Ahmad F, Manganiello VC and Movsesian MA (2002). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **277**, 38072-38078.

Wei J, Wayman G and Storm DR (1996). Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *J Biol Chem* **271**, 24231-5.

Wei J, Zhao AZ, Chan GC, Baker LP, Impey S, Beavo JA and Storm DR (1998). Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* **21**, 495-504.

Wells JN, Baird CE, Hardman YJ and Wu JG (1975). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activities of pig coronary arteries. *Biochim Biophys Acta* **384**, 430-42.

Welsler JV, Lange N, Singer CA, Elorza M, Scowen P, Keef KD, Gerthoffer WT and Burkin DJ (2007). Loss of the  $\alpha 7$  integrin promotes extracellular signal-regulated kinase activation and altered vascular remodeling. *Circ Res* **101**, 672-81.

Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF and Durner J (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**, 177-83.

White R, Bottrill FE, Siau D and Hiley CR (2001). Protein kinase A-dependent and -independent effects of isoproterenol in rat isolated mesenteric artery: interactions with levcromakalim. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 917-24.

Williams B (1998). Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J Hypertens* **16**, 1921-9.

Williams C and Wick TM (2005). Endothelial cell-smooth muscle cell co-culture in a perfusion bioreactor system. *Ann Biomed Eng* **33**, 920-8.

Wilson E (2007).  $\alpha 7 \beta 1$  integrin: putting the brakes on smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* **101**, 651-3.

Wilson E, Mai Q, Sudhir K, Weiss RH and Ives HE (1993). Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol* **123**, 741-7.

Wilson LS, Baillie GS, Pritchard LM, Umana B, Terrin A, Zaccolo M, Houslay MD and Maurice DH (2011). A Phosphodiesterase 3B-based Signaling Complex Integrates Exchange Protein Activated by cAMP 1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signals in Human Arterial Endothelial Cells. *J Biol Chem* **286**, 16285-96.

Winder SJ and Walsh MP (1990). Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation

by phosphorylation. *J Biol Chem* **265**, 10148-55.

Winder SJ and Walsh MP (1993). Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. *Cell Signal* **5**, 677-86.

Wise A, Watson-Koken MA, Rees S, Lee M and Milligan G (1997). Interactions of the alpha<sub>2A</sub>-adrenoceptor with multiple Gi-family G-proteins: studies with pertussis toxin-resistant G-protein mutants. *Biochem J* **321** ( Pt **3**), 721-8.

Wolin MS, Gupte SA, Neo BH, Gao Q and Ahmad M (2010). Oxidant-redox regulation of pulmonary vascular responses to hypoxia and nitric oxide-cGMP signaling. *Cardiol Rev* **18**, 89-93.

Wong MS and Vanhoutte PM ( 2010). COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta Pharmacol Sin* **31**, 1095-102.

Wong PY, Lai PS and Falck JR (2000). Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **62**, 321-33.

Wong PY, Lai PS, Shen SY, Belosludtsev YY and Falck JR (1997). Post-receptor signal transduction and regulation of 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in U-937 cells. *J Lipid Mediat Cell Signal* **16**, 155-69.

Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O, Jackson B and Gabbiani G (1988). Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* **39**, 161-6.

Woodrum DA and Brophy CM ( 2001). The paradox of smooth muscle physiology. *Mol Cell Endocrinol* **177**, 135-43.

Woodsome TP, Eto M, Everett A, Brautigan DL and Kitazawa T (2001). Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca<sup>2+</sup> sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol* **535**, 553-64.

Wooldridge AA, MacDonald JA, Erdodi F, Ma C, Borman MA, Hartshorne DJ and Haystead TA (2004). Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* **279**, 34496-504.

Wu X and Davis MJ (2001). Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1751-61.

Wu X, Haystead TA, Nakamoto RK, Somlyo AV and Somlyo AP (1998a). Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J Biol Chem* **273**, 11362-9.

Wu X, Mogford JE, Platts SH, Davis GE, Meininger GA and Davis MJ (1998b). Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> and alpha<sub>5</sub>beta<sub>1</sub> integrin ligands. *J Cell Biol* **143**, 241-52.

Xiang YK (2011). Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. *Circ Res* **109**, 231-44.

Xiao RP, Ji X and Lakatta EG (1995). Functional coupling of the beta<sub>2</sub>-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* **47**, 322-9.

Xie M, Rich TC, Scheitrum C, Conti M and Richter W (2011). Inactivation of Multidrug Resistance Proteins (MRPs) Disrupts Both Cellular Extrusion and Intracellular Degradation of cAMP. *Mol Pharmacol* **80**, 281-93.

Xu HL, Gavriluk V, Wolde HM, Baughman VL and Pelligrino DA (2004). Regulation of rat pial arteriolar smooth muscle relaxation in vivo through multidrug resistance protein 5-mediated cGMP efflux. *Am J Physiol*

*Heart Circ Physiol* **286**, H2020-7.

Xu Y, Henning RH, Lipsic E, van Buiten A, van Gilst WH and Buikema H (2007a). Acetylcholine stimulated dilatation and stretch induced myogenic constriction in mesenteric artery of rats with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* **9**, 144-51.

Xu Y, Henning RH, van der Want JJ, van Buiten A, van Gilst WH and Buikema H (2007b). Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO- as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life Sci* **80**, 1678-85.

Yamakita Y, Oosawa F, Yamashiro S and Matsumura F (2003). Caldesmon inhibits Arp2/3-mediated actin nucleation. *J Biol Chem* **278**, 17937-44.

Yamashiro S, Yamakita Y, Hosoya H and Matsumura F (1991). Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis. *Nature* **349**, 169-72.

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K and MASAKI T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**(6163):411-415.

Yanaka N, Kurosawa Y, Minami K, Kawai E and Omori K (2003). cGMP-phosphodiesterase activity is up-regulated in response to pressure overload of rat ventricles. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 973-939.

Yang D, Feletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN and Vanhoutte PM (2002). Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **136**, 104-10.

Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN and Vanhoutte PM (2003). A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension* **41**, 143-8.

Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Jin M, Otsu K, Ulucan C, Wang X, Baljinnayam E, Takaoka M, Sata M and Ishikawa Y (2008). Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1547-55.

Yoshida H, Nakamura M, Makita S and Hiramori K (1996). Paracrine effect of human vascular endothelial cells on human vascular smooth muscle cell proliferation: transmembrane co-culture method. *Heart Vessels* **11**, 229-33.

Yoshimura M, Ikeda H and Tabakoff B (1996). mu-Opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **50**, 43-51.

Zaccolo M and Movsesian MA (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* **100**, 1569-78.

Zacharias DA, Violin JD, Newton AC and Tsien RY (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-6.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR and Griendling KK (1998). Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* **32**, 488-95.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Minieri CA, Akers M, Lassegue B and Griendling KK (1999). Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* **1**, 167-79.

Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2)-Adrenergic receptor regulates its coupling to G(S) and G(I) - Demonstration in a reconstituted



system. *J Biol Chem* **277**, 31249-31256.

Zang WJ, Zacharia J, Lamont C and Wier WG (2006). Sympathetically evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in arterial smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin* **27**, 1515-25.

Zelis R and Flaim SF (1982). Alterations in vasomotor tone in congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* **24**, 437-59.

Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R and Leblais V (2012). beta-Adrenergic cAMP Signals Are Predominantly Regulated by Phosphodiesterase Type 4 in Cultured Adult Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *PLoS One* **7**, e47826.

Zhang J, Xia SL, Block ER and Patel JM (2002). NO upregulation of a cyclic nucleotide-gated channel contributes to calcium elevation in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1080-9.

Zhao H, Quilley J, Montrose DC, Rajagopalan S, Guan Q and Smith CJ (2007). Differential effects of phosphodiesterase PDE-3/PDE-4-specific inhibitors on vasoconstriction and cAMP-dependent vasorelaxation following balloon angioplasty. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H2973-81.

Zhao Y, Xiao W and Templeton DM (2003). Suppression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) by heparin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **66**, 769-76.

Zieba BJ, Artamonov MV, Jin L, Momotani K, Ho R, Franke AS, Neppl RL, Stevenson AS, Khromov AS, Chrzanowska-Wodnicka M and Somlyo AV (2011). The cAMP-responsive Rap1 Guanine Nucleotide Exchange Factor, Epac, Induces Smooth Muscle Relaxation by Down-regulation of RhoA Activity. *J Biol Chem* **286**, 16681-92.

### ◆ **Résumé de la thèse :**

L'AMPC est un second messager intracellulaire ubiquitaire qui, dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), se comporte comme un facteur anti-prolifératif et vasorelaxant majeur. De nombreuses observations obtenues dans différents types cellulaires et plus particulièrement dans les cellules cardiaques étayent l'hypothèse d'une compartimentation subcellulaire de l'AMPC. Ce concept repose sur une organisation très complexe des multiples composants de la voie AMPC qui permet de limiter la diffusion de ce second messager au niveau de structures intracellulaires spécifiques. Lors de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à un aspect essentiel de la régulation de la concentration intracellulaire d'AMPC et de sa compartimentation spatio-temporelle, dans les CMLVs, à savoir, les phosphodiésterases (PDEs) qui sont les seules enzymes capables d'hydrolyser et dégrader ce second messager afin de limiter sa diffusion et de créer des microdomaines dynamiques de l'AMPC. Plusieurs études ont montré que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques (IC) sont associées à une désorganisation de la signalisation dépendante de l'AMPC dans le système cardiovasculaire, causée en partie par une altération de la fonction des PDEs au niveau cardiaque.

L'objectif de mon travail de thèse était de mieux comprendre le rôle des différentes familles de PDEs dans la régulation de la signalisation dépendante de l'AMPC (PDE-AMPC) dans les CMLVs ainsi que leur implication fonctionnelle dans la réactivité vasculaire et d'évaluer leur altération potentielle dans un modèle physiopathologique, l'IC. Mon travail s'est articulé autour de deux modèles de muscle lisse vasculaire :

(1) des CMLV isolées en culture ayant acquis un phénotype synthétique sur lesquelles une approche d'imagerie en temps réel (FRET : Transfert d'Énergie de Fluorescence par Résonance) a été appliquée afin de visualiser *in situ* la dynamique spatiotemporelle des signaux dépendants de l'AMPC. Nos résultats indiquent que, dans ces cellules, l'augmentation des niveaux d'AMPC provoquée par la stimulation  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -AR) implique différents récepteurs suivant le compartiment intracellulaire considéré ( $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs dans le cytosol et seulement  $\beta_2$ -ARs dans le compartiment sous-membranaire). Nous avons par ailleurs observé que l'expression des ARNm des différentes isoformes de PDE-AMPC et la contribution fonctionnelle de ces enzymes dans la régulation des signaux AMPC intracellulaires étaient dépendantes de la densité des CMLVs en culture.

(2) des anneaux d'artères intactes issues de deux lits vasculaires différents (aorte et artère mésentérique) isolées à partir de rats sains et IC, permettant d'étudier leur fonction contractile et donc la régulation de celle-ci par la voie de l'AMPC. Nous avons montré que les familles de PDE-AMPC contribuent de façon différente au contrôle du tonus vasculaire dans l'aorte thoracique (PDE3 = PDE4 sans participation de la PDE2) et dans l'artère mésentérique (PDE4 > PDE2 sans participation de la PDE3), l'endothélium exerçant un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de ces PDEs musculaires lisses, notamment par le biais de la production de NO. Nous avons également mis en évidence des altérations de la réactivité vasculaire, et notamment de son contrôle par la voie de l'AMPC/PDE, dans notre modèle de rat IC. Dans l'aorte, la dysfonction endothéliale liée à l'altération de la voie du NO est à l'origine d'une augmentation de l'activité PDE3 masquant l'activité PDE4 et la relaxation  $\beta$ -adrénergique. Dans l'artère mésentérique, dont la fonction endothéliale apparaît préservée, les PDE2, 3 et 4 sont fonctionnelles.

L'ensemble de nos travaux souligne le rôle essentiel des PDEs dans la régulation de la signalisation AMPC vasculaire, et montre que l'activité et la fonction des différentes familles de PDE-AMPC sont finement modulées par de nombreux paramètres (phénotype et densité cellulaire des CMLVs) ou situations physio-pathologiques (nature du lit vasculaire, présence de l'endothélium, situation d'IC).

---

◆ **Mots clés** : Phosphodiésterases, AMPC, muscle lisse vasculaire, insuffisance cardiaque

---

### ◆ **Laboratoire de recherche :**

Signalisation et physiopathologie cardiaque, INSERM UMR-S 769, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

---

UNIVERSITÉ PARIS-SUD  
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY»  
5, rue Jean Baptiste Clément  
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex, FRANCE