



HAL
open science

Contrôle de la voie de l'AMPc vasculaire par les phosphodiesterases en situation physiopathologique.

Milia Belacel Ouari

► **To cite this version:**

Milia Belacel Ouari. Contrôle de la voie de l'AMPc vasculaire par les phosphodiesterases en situation physiopathologique.. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS504 . tel-01453116

HAL Id: tel-01453116

<https://theses.hal.science/tel-01453116>

Submitted on 2 Feb 2017

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.

NNT : 2016SACLS504

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
UNIVERSITE PARIS SUD

ECOLE DOCTORALE N° 569 ITFA
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué.

Spécialité de doctorat : Physiologie physiopathologie

Par

Mme Milia Belacel-Ouari

**Contrôle de la voie de l'AMPC vasculaire par les phosphodiésterases
en situation physiopathologique**

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 8 décembre 2016 :

Composition du Jury :

Mr Christian Poüs	Professeur, Université Paris-Sud	Président
Mme Chantal Gauthier	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
Mme Isabelle Limon	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mr Ralf Jockers	Directeur de Recherche, Université Paris Descartes	Examinateur
Mr Boris Manoury	Maître de Conférence, Université Paris-Sud	Co-directeur de thèse
Mme Véronique Leblais	Professeur, Université Paris-Sud	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont adressés aux membres du jury, à savoir Pr Christian Poüs pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse, Pr Isabelle Limon et Pr Chantal Gauthier d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir évalué mes travaux dans un délai assez court, ainsi que Dr Ralf Jockers pour avoir accepté de participer à ce jury. Je leur en suis très reconnaissante.

J'exprime ma profonde gratitude à Rodolphe Fischmeister pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et dans son équipe et de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans ce lieu de travail aussi convivial que plaisant. Je remercie également infiniment Ana-Maria Gómez notre nouvelle directrice de m'avoir permis d'achever ces quelques années passées à l'U769 puis à l'U1180 dans les meilleures conditions.

J'adresse mes plus profonds remerciements à Véronique Leblais, ma directrice de thèse, mon pilier durant ces années passées au labo pour la qualité de son encadrement, et sa grande qualité pédagogique, son organisation sans faille et surtout sa "no stress attitude". Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Merci Véro pour ton soutien, ta patience, ta gentillesse ainsi que tes encouragements dans les moments difficiles. Travailler avec toi durant ces 5 années a été un réel plaisir.

Je tiens également à remercier Boris Manoury, mon encadrant lorsque Véro était en congés maternité ;). Merci de m'avoir permis d'achever mon master M2 dans les meilleures conditions et de m'avoir souvent écoutée d'une oreille si attentive. Merci pour tes petites attentions, ta gentillesse et ton soutien. Je te souhaite le meilleur dans ta vie de chercheur, car t'es le meilleur :)

Je remercie également Fabien Hubert d'avoir accompagné et guidé mes premiers pas dans la recherche, et de m'avoir transmis son excellente maîtrise des techniques expérimentales, j'ai tant appris en travaillant avec toi. Merci Fabien pour ta patience, ta bonne humeur quotidienne, ta disponibilité et tes encouragements. Profite des beaux moments qui vous attendent Morgane et toi ;) Il y a des moments qu'il faut privilégier dans la vie.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Greg, qui m'as tant apporté pendant ma thèse, merci pour ton soutien, tes encouragements, merci d'avoir toujours été disponible quand j'ai eu besoin de ton aide. Merci du fond du cœur.

Je tiens également à remercier toutes les aides techniques dont j'ai pu bénéficier pendant ma thèse, merci ma Flote d'avoir été ma camarade des dissos, toi sur le cœur moi sur l'aorte... j'oublierai jamais toutes nos discussions sous les PSM. Merci Audrey de m'avoir initiée au Western Blot, je penserai à toi à chaque fois que je coule un gel dans ma future vie de chercheur. Merci Philippe pour les échos sur les rats IC et pour ton initiation aux mesures de pression artérielle, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur, tu resteras toujours "the king of echocardiography". Merci à Claudine pour ses conseils avisés en PCR et à Romain pour son aide pour les manipulations de radioéléments à l'institut Cochin. Je remercie la plateforme "Animex" et plus particulièrement Valérie pour les chirurgies effectuées sur les animaux. Je remercie également tout le personnel de la plateforme "SAMM", Audrey, Pierre et Sonia pour leur aide dans l'étude du profil lipidique.

Je remercie également mes collaborateurs : Ralf Jockers de m'avoir tant appris sur le binding, son expertise et sa rigueur scientifiques m'ont énormément apporté, un grand merci à toute ton équipe de recherche, pour leur aide et leur accueil chaleureux. Je remercie également François Dauphin d'avoir pris le temps d'analyser mes résultats de binding, je t'en suis très reconnaissante. Qui dit binding, dit Bertrand Crozatier que je remercie vivement pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues. Merci de t'être intéressé à mon travail, merci d'avoir cru en mes compétences, tes conseils et tes encouragements m'ont remotivée bien plus d'une fois. Je remercie également Fabrice Antigny de m'avoir confié la réalisation des expériences de réactivité vasculaire pour son projet de recherche et m'avoir ainsi permis de travailler sur un projet aussi passionnant que celui de l'hypertension artérielle pulmonaire.

Cette grande aventure, qu'est la thèse est également pleine de rencontres. J'ai vraiment rencontré des personnes formidables que je tiens à remercier pour leur aide, leur soutien ou tout simplement d'avoir fait partie de cette aventure. Je commence par remercier ceux qui, hélas, ne font plus partie de cette grande famille U769, U1180. Giada ma copine de toujours, tu me manques tellement, Hind ma compatriote, Zeineb, et Pierrot mon ami du labo, je suis ravie d'avoir pu partager un bout de chemin avec vous. Je remercie également mes amis BurExiens, ma petite polonaise, ma Marta, la tata de mes bébés. Je remercie ma Delphine, ma Gazette à moi, merci pour ton soutien dans les moments difficiles, notamment en août 2015 ;) je n'oublierai jamais toutes nos discussions matinales autour de la beauté, et j'ai bien compris, le remède à tous les bobos c'est "prendre un bain et se badigeonner de crème", je reviendrai au labo juste pour te trouver un mari ;), Germain, le français de souche, merci pour ta générosité et ton grand cœur, Ibrahim mon cher compatriote ou "Bibi" pour les intimes, voire pour tout le monde, je te souhaite de tout cœur une publication dans "nature", tu le mérites vraiment, Sarah I pour ses leçons de mode et de "noblesse de la matière", t'es vraiment unique. Liang, le petit chinois du BurEx et les petites nouvelles, Marion, Aurélia et Marine, je te remercie particulièrement Marine pour ta gentillesse et ta bonté, sans toi je n'aurai pas eu une table des matières aussi jolie sur ce manuscrit. Je tiens également à remercier Sarah K, Carole, Yueyi et Jérôme V pour toutes les discussions que nous avons eues autour du bar et pour votre bonne humeur quotidienne. Merci ma petite Nieves (Alias "a moi yo m'en fou"), pour ta générosité, et ton grand cœur.

Je remercie également tous les membres de l'équipe 1 (Alias "les gens du 2"), de l'équipe 3 (les espagnols) et toutes les personnes sans qui mes pauses déjeuner n'auraient pas été aussi plaisantes, et animées : Ana, Anne, Jessica, Jérémy, Jérôme L ...

Je tiens également à remercier du fond du cœur les personnes grâce à qui tout dans le labo marche comme sur des roulettes : Françoise, la maman des doctorants, pour ses compétences administratives, je te souhaite une très belle retraite et pleins de belles choses, Sophie "Sophai" pour les intimes, sans qui notre vie de chercheur serait bien plus compliquée. Patrick, je te remercie pour tous tes conseils et aides en informatique, malgré que tu n'aies jamais soutenu mon désir d'avoir une licence GraphPad ;)

Et pour finir, je dédierai ces derniers remerciements aux personnes qui me sont les plus précieuses : j'adresse une pensée bien particulière à mon cher papa, j'espère que tu seras toujours aussi fier de ta fille là où tu es. Je te remercie petite maman pour ton soutien sans faille, d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours encouragée à aller de l'avant, on ne peut vraiment pas espérer meilleure maman. Je remercie également mes frères (Reda et zozo), mes sœurs (Imène et Maya) et mes belles sœurs (Lydia et Marijana) pour leur soutien et leur aide au quotidien notamment à l'arrivée des jujus.

Je ne remercierai jamais assez mon cher époux Salem, mon compagnon de tous les jours, merci pour ton soutien sans faille durant ces 14 années. Merci de m'avoir épaulée, écoutée et supportée par moments (je sais que je ne t'ai pas facilité la vie ces 3 derniers mois). Merci tout simplement de faire partie de ma vie.

Je finis par remercier mes petits amours de bébés, Adam et Elias, vous êtes la plus belle chose qui nous soit arrivée. Je pensais que votre venue au monde à cette période un peu difficile serait difficile à gérer, etttttt non j'ai tout faux, vous êtes un vrai rayon de soleil, mon énergie quotidienne, votre sourire me fait oublier tous les tracas. Merci tout simplement d'être là.

RESUME

L'AMPc est un second messenger exerçant un rôle vasculoprotecteur majeur, par ses effets relaxants et inhibiteurs de la prolifération et de la migration cellulaires. Les concentrations intracellulaires d'AMPc sont finement régulées par leur synthèse via les adénylates cyclases et leur dégradation par les phosphodiésterases (PDEs). Nous avons évalué l'impact de l'environnement cellulaire sur la voie de signalisation couplée au récepteur β -adrénergique (β -AR/AMPc/PDE) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), ainsi que les altérations potentielles de celle-ci en situation pathologique d'insuffisance cardiaque (IC).

Notre première étude montre que dans les CMLs d'aorte de rat en culture, adoptant un phénotype synthétique, la voie de signalisation β -AR/AMPc/PDE est hautement modulée par la densité cellulaire. Ainsi, une faible densité cellulaire est associée à une régulation négative de l'expression fonctionnelle du récepteur β_1 -AR, à une activité hydrolytique des PDEs-AMPc plus faible et à des concentrations d'AMPc intracellulaire plus élevées que celles observées dans des cellules confluentes.

Notre deuxième étude montre que dans l'aorte de rat, l'IC est associée à une dysfonction endothéliale (DE), une hyperréactivité aux agents contractants et une altération de la fonction et de l'expression des PDEs-AMPc. Nos résultats suggèrent que l'altération de la voie du NO/GMPc suite à la DE conduit à une hyper-activation de la PDE3, qui masque la fonction de la PDE4 et altère la relaxation β -AR.

L'ensemble de ce travail met en évidence le rôle critique de l'environnement cellulaire dans le contrôle de la voie β -AR/AMPc/PDE des CMLVs

Mots clés : Muscle lisse vasculaire, récepteur β -adrénergique, AMPc, phosphodiésterases, densité cellulaire, insuffisance cardiaque

ABSTRACT

cAMP is second messenger which plays a prominent vasculoprotective role by its relaxing effects and inhibition of cell proliferation and migration. Intracellular cAMP level is regulated by its synthesis by adenylate cyclase and its degradation by phosphodiesterases (PDEs). We evaluated the influence of cellular environment on signaling pathway coupled to β -adrenoceptors (β -AR/cAMP/PDE) on vascular smooth muscle cells (VSMCs), as well as potential alterations in heart failure (HF).

The first study showed that in cultured rat aortic SMCs exhibiting synthetic phenotype, the β -AR/cAMP/PDE signaling pathway is highly modulated by the cellular density. Thus, the low density state being associated to a downregulation of the β_1 -AR, a lower cAMP-PDE activity and a higher basal [cAMP]_i compared to confluent cells.

Our second study showed that in rat aorta, HF is associated with endothelial dysfunction, hyper-reactivity to contractile agents and an alteration of function and expression of cAMP-PDEs. Our results suggest that NO/cGMP pathway alteration following the ED in HF leads to hyper-activation of PDE3 which masks PDE4 function and alters β -adrenoceptor relaxation

Thus, our works highlights the critical role of the cellular environment in controlling the vascular β -AR signaling.

Keywords: Vascular smooth muscle, β -adrenoceptor, cAMP, phosphodiesterases, cellular density, heart failure.

ABREVIATIONS

AA	Acide arachidonique.
ABC	<i>ATP binding cassette</i> .
AC	Adénylate cyclase.
ACs	Adénylate cyclase soluble.
Ach	Acétylcholine.
ADNc	ADN complémentaire.
AKAP	<i>A-kinase anchoring protein</i> - Protéine d'ancrage de la PKA.
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique.
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i> - Peptide natriurétique atrial.
ASI	Activité sympathomimétique intrinsèque.
ATP	Adénosine triphosphate.
ATPase	Adénosine triphosphatase.
α-AR	α -adrénergique.
α-SM-actin	<i>α-smooth muscle-actin</i> - α -actine du muscle lisse
b-FGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> - facteur de croissance des fibroblastes.
BK_{Ca}	<i>Large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel</i> - Canaux potassiques à large conductance activés par le Ca ²⁺ .
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> .
β-AR	Béta-adrénergiques.
β-ARK1	<i>Beta adrenergic kinase 1</i> .
CaM	Calmoduline.
CaMKII	Protéine kinase II dépendante du complexe Ca ²⁺ /Calmoduline.
Cav	Cavéoline.
Ca²⁺	Calcium.
Ca²⁺/CaM	Complexe calcium-calmoduline.
CCVD	Canaux calciques voltage-dépendants.
CE	Cellule endothéliale.
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i> - Protéine fluorescente cyan.
CGRP	<i>Calcitonin gene related-peptide</i> - Peptide lié au gène de la calcitonine.
Cl_{Ca}	Canaux chlore dépendants du Ca ²⁺ .
CICR	<i>Ca²⁺-induced Ca²⁺ release</i> .
CML	Cellule musculaire lisse.
CMLVs	Cellules musculaires lisses vasculaires.
CNG	<i>Cyclic nucleotide gated channels</i> .
CNB	<i>Cyclic nucleotide-binding domain</i> .
Col1a1	Collagène de type 1.
Col3a1	Collagène de type 3.
COX	Cyclooxygénase.
DAG	Diacylglycérol.
DEP	<i>Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin</i> .

EDCF	<i>Endothelium-derived contracting factor</i> - Facteurs contractants dérivés de l'endothélium.
EDHF	<i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i> - Facteur hyperpolarisants dérivés de l'endothélium.
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i> - Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium.
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique.
EETs	Acides époxyeicosatriénoïques.
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno assay</i> .
eNOS	NO synthase endothéliale.
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i> - Facteur d'échange nucléotidique directement activé par l'AMPc.
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> .
ERO	Espèces réactives de l'oxygène.
ET	Endothéline.
FBS	<i>Fetal bovin serum</i> - Sérum de veau fœtal.
FCS	<i>Fetal calf serum</i> - Sérum de veau fœtal.
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> .
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> - Transfert d'énergie de fluorescence par résonance.
GAF	<i>cGMP-binding PDEs, adenylate cyclase, fh1A</i>
GCs	Guanylate cyclase soluble.
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> - Facteur d'échange des nucleotides à guanine.
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique.
GRK	<i>G-protein coupled receptor kinase</i> - Kinase des récepteurs couplés aux protéines G.
GTP	Guanosine triphosphate.
GTPase	Guanosine triphosphatase.
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> .
HEK	<i>Human embryonic kidney</i> .
HTA	Hypertension artérielle.
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire.
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> - Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
IC	Insuffisance cardiaque, insuffisants cardiaques.
ICYP	[¹²⁵ I]-Iodo-Cyanopindolol.
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.
IGFs	<i>Insulin-like growth factors</i>
IL-1	Interleukine-1
IP3	Inositol 1,4,5 tri-phosphate.
IP₃R	Récepteur à l'IP3.
IRAG	<i>IP3 receptor-associated cGMP kinase substrate</i> .

K_{ATP}	Canal potassique dépendant de l'ATP.
K_{ca}	Canal potassique dépendant du calcium.
K_m	Constante de Michaelis.
K⁺	Potassium.
LRP-1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein-1.</i>
LTCC	<i>L-Type Calcium Channel</i> - Canal calcique de type L.
MEC	Matrice extracellulaire.
MHC	<i>Myosin Heavy chain.</i>
ML	Muscle lisse.
MLC	<i>Myosin light chain</i> - Chaîne légère de myosine.
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i> - Kinase des chaînes légères de myosine.
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i> - Phosphatase des chaînes légères de myosine
MMPs	Métalloprotéases de la matrice.
MRP	<i>Multidrug resistance protein.</i>
MYPT	<i>Myosin phosphatase target.</i>
MβCD	Méthyl-β-cyclodextrine.
NA	Noradrénaline.
NHR2	<i>N-terminal hydrophobic region.</i>
NM-MHC	<i>Non muscle-myosin heavy chain</i> - Chaîne lourde de myosine non musculaire
NO	Monoxyde d'azote.
NOS	NO synthase.
NPY	Neuropeptide Y.
PA	Pression artérielle.
PAS	<i>Period, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, single minded.</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline.</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen.</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction.</i>
PDE	Phosphodiesterase.
PDE-AMPC	Phosphodiesterase hydrolysant l'AMPC.
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> - Facteur de croissance dérivé des plaquettes.
PFA	Paraformaldéhyde.
PGE1	Prostaglandine E1.
PGI₂	Prostacycline.
PIP₂	Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate.
PI3K	<i>Phosphoinositide 3 Kinase</i> - Kinase de phosphoinositide 3.
PKA	Protéine kinase AMPc-dépendante.
PKB	Protéine kinase B.
PKC	Protéine kinase C.
PKG	Protéine kinase GMPc-dépendante.
PKI	<i>Protein kinase inhibitor</i> - Inhibiteur de la protéine kinase.
PLA2	Phospholipase A2.
PLC	Phospholipase C.
PMCA	<i>Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase</i> - La pompe Ca ²⁺ -ATPase de la membrane plasmique
PP1c	Sérine / thréonine phosphatases de type 1.

PRKX	<i>human X chromosome-encoded protein kinase X.</i>
Protéine G	Protéine G hétérotrimérique.
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride.</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G.
REM	<i>Ras exchange motif.</i>
RGS	<i>Regulator of G protein signaling.</i>
RhoK	<i>Rho Kinase.</i>
RPL 32	<i>Ribosomal protein L32.</i>
RRAS	<i>RAS-related protein.</i>
RS	Réticulum sarcoplasmique.
RVP	Résistance vasculaire périphérique.
RyR	<i>Ryanodine receptor</i> - Récepteur de la ryanodine.
SCIM	<i>Scanning ion conductance microscopy.</i>
SERCA	<i>Sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase</i> - ATPases calcium dépendantes du réticulum sarcoplasmique.
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rats</i> - rats spontanément hypertendus.
SM-MHC	<i>Smooth muscle-myosin heavy chain</i> - Chaîne lourde de myosine musculaire.
SNA	Système nerveux autonome.
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism.</i>
SOCE	<i>Store operated calcium entry.</i>
SOCS-3	<i>Suppressor of cytokine signaling-3.</i>
SP	Substance P.
SUR2B	<i>Sulfonylurea receptor 2B.</i>
Tagln	<i>Transgelin.</i>
TBP	<i>Tata box binding protein.</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i> - Facteur de croissance transformant- β
Tm	<i>Melting temperature</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α.</i>
TxA2	Thromboxane A2.
UCR	<i>Upstream conserved regions.</i>
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein.</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor.</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide.</i>
Vmax	Vitesse initiale maximale de réaction.
VPR	<i>Volume pressure recording</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> - Protéine fluorescente jaune
Yhwaz	<i>14-3-3 protein zeta/delta.</i>

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une artère.

Figure 2 : Modes d'initiation de la contraction de la CMLV par augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique.

Figure 3 : Activité de la phosphatase (MLCP) et de la kinase (MLCK) de la chaîne légère de la myosine (MLC) dans la CMLV.

Figure 4 : Caractéristiques ultra-structurelles des CMLs synthétiques et contractiles.

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

Figure 6 : Structure schématique de l'adénylate cyclase membranaire (AC).

Figure 7 : cycle d'activation/inactivation des protéines G.

Figure 8 : Représentation schématique de la PKA et de son activation.

Figure 9 : Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines Epac.

Figure 10 : Organisation des 11 familles de PDEs : représentation schématique de leur structure.

Figure 11 : Représentation schématique de la structure des isoformes de PDE3.

Figure 12 : Caractéristiques structurelles des 4 groupes de PDE4.

Figure 13 : Structure des cavéoles.

Figure 14 : Cycle des récepteurs β -adrénergiques.

Figure 15 : Représentation du système de cuves à organe isolé.

Figure 16 : Diagramme de Jablonski simplifié (A) et déplacement du spectre d'émission de la fluorescence (B).

Figure 17 : Les conditions requises pour le FRET.

Figure 18 : Représentation du phénomène de FRET de la sonde Epac2-camps.

Figure 19 : Paramètres cinétiques des signaux AMPc en réponse à une stimulation β -adrénergique transitoire (pulse d'isoprénaline de 15 sec).

Figure 20 : Expériences de liaison spécifique par compétition du [¹²⁵I]-ICYP sur des cellules HEK surexprimant le récepteur β_1 - ou β_2 -AR.

Figure 21 : Schémas récapitulatifs de la contribution des récepteurs β_1 et β_2 -ARs dans la synthèse de l'AMPC et du rôle des PDEs dans son hydrolyse dans les CMLVs.

Figure 22 : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPC dans le contrôle du tonus contractile basal dans les aortes de rats SHAM et IC.

Figure 23 : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPC dans le contrôle de la réponse relaxante β -adrénergique dans les aortes de rats SHAM et IC.

TABLEAUX

Tableau 1 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs régulation.

Tableau 2 : Expression des principales isoformes des PDEs-AMPC dans les différents phénotypes du muscle lisse vasculaire.

Tableau 3 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et leur concentration.

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

Tableau 5 : Composition de la solution de Ringer utilisée lors des expériences de FRET.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative.

Table des matières

PREAMBULE	1
INTRODUCTION	4
I. Physiologie du muscle lisse vasculaire	5
A. Généralités	5
1. Système vasculaire	5
2. Types de vaisseaux sanguins et leurs caractéristiques chez l'Homme	5
B. Structure de la paroi vasculaire.....	7
1. Intima	7
2. Media	8
3. Adventice	9
4. <i>Vasa vasorum</i>	9
5. Innervation	9
C. Cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV) : siège du tonus contractile vasculaire	10
1. Ultrastructure de la CMLV.....	10
2. Mécanisme moléculaire de la contraction de la CML	11
3. Couplage excitation/contraction du muscle lisse vasculaire.....	11
a. Contraction de la CMLV suite à une augmentation du calcium intracellulaire.....	11
a.1 Couplage électro-mécanique.....	13
a.2 Couplage pharmaco-mécanique.....	14
b. Phénomène de sensibilisation/désensibilisation de l'appareil contractile au Ca ²⁺	15
D. Contrôle du tonus vasculaire	17
1. Régulation nerveuse du tonus vasculaire	17
a. Le système nerveux sympathique.....	18
b. Le système nerveux parasympathique	18
c. Le système nerveux sensoriel	19

2.	Régulation endothéliale du tonus vasculaire	19
a.	Les EDRFs, facteurs relaxants dépendants de l'endothélium	20
b.	Les EDCFs, facteurs contractants dépendants de l'endothélium.....	22
E.	Modulation phénotypique de la CMLV	23
1.	Caractéristiques générales des phénotypes contractiles et synthétiques de la CMLV	24
2.	Les différents marqueurs du phénotype de la CMLV	25
3.	Modulation phénotypique des CMLVs et pathologies vasculaires	27
4.	Facteurs modulants le phénotype de la CMLV.....	31
a.	Les facteurs solubles	32
b.	La matrice extracellulaire (MEC).....	33
c.	Les facteurs mécaniques.....	34
d.	L'endothélium.....	35
e.	La densité/confluence des cellules en culture.....	37
II.	Voie de signalisation de l'AMPC	39
A.	Les adénylates cyclases	39
B.	Les récepteurs couplés aux protéines G	44
C.	Les effecteurs de l'AMPC.....	46
1.	La protéine kinase A (PKA)	46
2.	Le facteur d'échange Epac	49
3.	Les canaux CNG " <i>Cyclic nucleotide gated channels</i> "	52
D.	Dégradation de l'AMPC	54
1.	Structure, régulation et expression des PDEs	55
a.	Les PDEs de type 1	56
b.	Les PDEs de type 3	57
c.	Les PDEs de type 4	60
2.	Rôle des PDEs dans la régulation de la fonction vasculaire	65
a.	Rôle de la PDE1	65
b.	Rôle de la PDE3	66
c.	Rôle de la PDE4	69

3.	Rôle des PDEs dans la compartimentation de la voie de l'AMPC	69
4.	L'efflux de l'AMPC par les MRPs (<i>Multidrug resistance proteins</i>)	71
III.	Les récepteurs β -adrénergiques.....	72
A.	Propriétés pharmacologiques des récepteurs β -ARs et applications thérapeutiques	73
B.	Différents états de conformation des récepteurs β -AR	74
C.	Localisation cavéolaire des récepteurs β -ARs	76
1.	Les cavéoles.....	76
2.	Rôle des cavéoles dans la signalisation β -adrénergique	78
D.	Désensibilisation	79
E.	Rôle des récepteurs β -ARs dans la fonction contractile vasculaire.....	81
F.	Implications physiopathologiques des récepteurs β -ARs au niveau vasculaire	83
1.	HTA systémique.....	83
2.	Athérosclérose	85
3.	Insuffisance cardiaque (IC)	85
a.	Physiopathologie de l'IC.....	86
b.	Altérations de la voie β -AR / AMPC au cours de l'IC	88
OBJECTIFS.....		90
MATERIEL ET METHODES.....		92
I.	Modèles expérimentaux	93
A.	Modèle animal d'insuffisance cardiaque (IC).....	93
1.	Conception du modèle	93
2.	Validation du modèle	94
B.	Modèle de CMLs aortiques de rat en culture.....	95
1.	Isolement des CMLs aortiques	95
2.	Culture des CMLs aortiques	96
3.	Phénotypage des CMLs aortiques de rat.....	97
II.	Agents pharmacologiques.....	99
III.	Réactivité vasculaire.....	100
A.	Isolement de l'aorte de rat.....	100

B.	Mesure de la réactivité vasculaire : système de cuves à organe isolé	101
C.	Analyse des données.....	102
IV.	Mesure de la pression artérielle chez le rat par la technique du manchon caudal.	102
A.	Principe et protocole.....	102
B.	Analyse des données.....	103
V.	Mesure des concentrations de nucléotides cycliques.	103
A.	Mesure des concentrations d'AMPC et de GMPC, par une technique immuno-enzymatique.....	103
1.	Principe.....	103
2.	Préparation des extraits tissulaires et cellulaires.....	104
3.	Dosage immuno-enzymatique	105
4.	Analyse et expression des résultats	105
B.	Mesure du taux d'AMPC intracellulaire par imagerie <i>in situ</i> par transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET).....	105
1.	Principe de fluorescence	105
2.	Principe de la technique FRET	106
3.	La sonde FRET "Epac2-camps"	107
4.	Installation microscopie FRET	108
5.	Expression de la sonde FRET Epac2-camps	109
6.	Destruction des structures cavéolaires et validation par un marquage à la filipin III	109
7.	Protocole expérimental de FRET	110
8.	Analyse des données.....	110
VI.	Mesure du niveau d'expression génique par RT-PCR quantitative en temps réel.....	112
A.	Extraction et dosage des ARNs totaux	112
B.	Transcription inverse des ARN	112
C.	PCR quantitative en temps réel.....	113
D.	Choix des amorces	115
E.	Expression des résultats.....	117
VII.	Etude de l'expression et de l'activité des phosphodiésterases.....	118
A.	Western Blot	118

1.	Préparation des extraits protéiques.....	118
2.	Dosage des protéines	118
3.	Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	119
4.	Transfert des protéines sur membrane.....	119
5.	Immunomarquage et révélation	119
6.	Anticorps utilisés	120
7.	Analyse et quantification	120
B.	Dosage d'activité des PDEs-AMPC.....	121
1.	Principe.....	121
2.	Préparation des extraits protéiques.....	121
3.	Protocole de dosage de l'activité PDEs-AMPC.....	121
4.	Analyse des résultats.....	122
VIII.	Etudes de liaison spécifique sur les récepteurs β -ARs.	123
A.	Principe des études de liaison spécifique par compétition.....	123
B.	Obtention des préparations cellulaires	123
C.	Protocole expérimental de l'étude de compétition du [125 I]-ICYP par les ligands des récepteurs β_1 - ou β_2 -AR	125
D.	Analyse des résultats.....	126
	RESULTATS	128
I.	Influence de la densité cellulaire sur la voie de signalisation de l'AMPC dans les CMLVs	129
A.	Introduction	129
B.	Résultats : Article 1 "Influence of cell density on cAMP pathway of vascular smooth muscle cells"	131
C.	Conclusion	132
II.	Rôle des PDEs-AMPC dans la réactivité vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque.....	134
A.	Introduction	134
B.	Résultats : Article 2 "alteration of vascular reactivity in heart failure : Role of phosphodiesterases 3 and 4"	136
C.	Conclusion	137
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	139
	CONCLUSIONS	159

BIBLIOGRAPHIE	161
ANNEXES	190
I. Article 3 : " Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension "	191
II. Revue : " Cyclic nucleotide Phosphodiesterases in cardiac and vascular smooth muscles : a therapeutic perspective "	192

PREAMBULE

L'AMPc exerce un rôle vasculoprotecteur majeur, par ses effets vasorelaxants et inhibiteurs de la prolifération et de la migration cellulaires (McDaniel et al. 1994, Indolfi et al. 1997, Koyama et al. 2001). Les concentrations intracellulaires de ce second messager sont finement régulées par sa synthèse, via les adénylates cyclases, effecteurs majeurs des récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) et par sa dégradation, via les phosphodiésterases (PDEs), qui limitent la diffusion intracellulaire de celui-ci (Maurice et al. 2014). Plusieurs isoformes de PDEs coexistent dans le muscle lisse vasculaire. Ces dernières années, mon équipe d'accueil a développé des techniques d'imagerie de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) permettant d'étudier la signalisation de l'AMPc en temps réel dans différents compartiments de la cellule. Cette approche a notamment permis de mieux comprendre l'implication des différentes isoformes de PDEs dans la compartimentation intracellulaire de la signalisation dépendante de l'AMPc dans les myocytes cardiaques (Leroy et al. 2008, Fischmeister et al. 2006) et vasculaires, dans lesquelles la PDE3 qui hydrolyse l'AMPc et le GMPc et la PDE4 qui hydrolyse exclusivement l'AMPc, représentent l'activité hydrolytique de l'AMPc (PDE-AMPc) prédominante (Zhai et al. 2012).

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) présentent un phénotype contractile *in situ* dans la media des vaisseaux intacts, mais acquièrent un phénotype synthétique/prolifératif en situation pathologique ou lors de leur mise en culture. Cette modification phénotypique est associée à une modification du profil d'expression et d'activité des PDE-AMPc.

Mon travail de thèse vise à caractériser la voie de signalisation β -ARs/AMPc/PDEs dans ces conditions pathologiques, et d'évaluer l'impact de l'environnement cellulaire sur celle-ci.

Ainsi, dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai mis à profit la technique FRET afin de caractériser cette voie de signalisation β -ARs/AMPc/PDEs, à l'échelle cellulaire, dans des CMLs isolées de l'aorte de rat ayant acquis un phénotype synthétique après leur mise en culture, puis d'évaluer l'influence de la confluence cellulaire sur les différentes composantes de cette voie.

La deuxième partie de mon travail de thèse s'est inscrite dans la continuité d'un des projets de notre équipe portant sur l'évaluation du rôle des principales familles de PDEs-AMPc dans la régulation de la fonction contractile de l'aorte de rat et sur l'étude de leurs altérations potentielles en situation pathologique d'insuffisance cardiaque (IC), une pathologie cardiaque associée à des altérations vasculaires. Cette étude réalisée sur des artères intactes a permis de

d'évaluer le rôle des cellules endothéliales environnantes dans la régulation de la voie de signalisation β -ARs/AMPC/PDEs musculaire lisse vasculaire.

INTRODUCTION

I. Physiologie du muscle lisse vasculaire

A. Généralités

1. Système vasculaire

L'appareil cardio-vasculaire comporte un système de pompage, "le cœur", et de distribution, "les gros vaisseaux", amenant le sang jusqu'à de très fins vaisseaux "les capillaires" situés au voisinage immédiat des cellules et à travers la paroi desquels se font des échanges continus avec l'environnement immédiat des cellules. L'appareil cardio-vasculaire assure le transport rapide de gaz et de matières entre les différentes parties du corps, qu'il s'agisse de nutriments, de déchets ou de molécules hormonales qui véhiculent des informations importantes pour le métabolisme des cellules cibles. Il transporte également des cellules et des globulines jouant un rôle dans la défense de l'organisme contre les agressions microbiennes et dans les défenses immunitaires.

Le système vasculaire est composé de 2 circuits sanguins :

- La circulation pulmonaire, ou "petite circulation", prend naissance au niveau du ventricule droit et se termine au niveau de l'oreillette gauche. Elle est constituée d'un réseau unique, recevant la totalité du débit cardiaque, et assurant les échanges gazeux alvéolo-capillaires.

- La circulation systémique, ou "grande circulation", prend naissance au niveau du ventricule gauche et se termine au niveau de l'oreillette droite. Elle est formée d'une série de réseaux élémentaires disposés en parallèle recevant chacun une partie du débit cardiaque, et assurant l'irrigation sanguine de tous les organes et tissus.

Le système vasculaire comprend également une circulation lymphatique qui constitue un système de drainage parallèle au système veineux. Les vaisseaux lymphatiques drainent une partie des liquides interstitiels, sous forme de lymphe, vers les organes lymphoïdes et le cœur.

2. Types de vaisseaux sanguins et leurs caractéristiques chez l'Homme

Il existe 3 grandes catégories de vaisseaux sanguins : les artères, les capillaires et les veines (Bakehe 2013). Les contractions du cœur chassent le sang dans les grosses artères issues des ventricules, l'artère pulmonaire et l'aorte pour les ventricules droit et gauche, respectivement. Le sang parcourt ainsi les ramifications des artères jusqu'aux plus petites, les artérioles, puis passe dans les lits capillaires des organes et des tissus. A sa sortie des capillaires, le sang traverse les veinules puis se jette dans des veines de plus en plus grosses qui convergent vers le cœur, les veines pulmonaires débouchant dans l'oreillette gauche et les veines caves

supérieures et inférieures débouchant dans l'oreillette droite. Ce parcours est long, la totalité des vaisseaux d'un homme adulte mesurerait 100 000 kms.

- Artères et artérioles

Il existe deux types d'artères :

- Les artères "élastiques ou de conductance" sont de gros vaisseaux issus du cœur avec des diamètres internes pouvant atteindre 1 à 2 cm environ chez l'Homme. Leur rôle est d'amortir l'onde pulsée et de transformer le débit cardiaque pulsatile en débit continu. Leur paroi, relativement peu épaisse, est riche en structures élastiques.
- Les artères "musculaires ou de résistance" sont de taille moyenne avec des diamètres internes de 1-10 mm. Elles sont situées dans le prolongement des artères élastiques. Leur rôle est de distribuer le sang vers les artérioles et de contrôler le débit sanguin tissulaire. Leur paroi, relativement épaisse par rapport à leur diamètre, est riche en fibres musculaires.

Les artérioles, situées à la suite des artères musculaires, sont de petits vaisseaux sanguins musculaires avec un diamètre interne d'environ 30 μm , et une paroi fine. Elles jouent un rôle très important dans la régulation du débit sanguin dans le lit capillaire.

- Capillaires sanguins

Les capillaires sanguins sont des micro-vaisseaux, d'un diamètre interne de 5 à 8 μm , qui relient les artérioles pré-capillaires aux veinules post-capillaires. Leur paroi fine, constituée uniquement d'un endothélium reposant sur une lame basale, permet les échanges entre le sang et le compartiment interstitiel.

- Veinules et veines

Les veinules post-capillaires, d'un diamètre interne d'environ 20 μm , ont une paroi enrichie en péricytes. Elles sont le principal lieu d'échanges des lymphocytes entre le sang et les organes lymphoïdes. Les veinules collectrices, qui leur font suite, ont un diamètre interne d'environ 0,5 cm et une paroi qui s'épaissit et est riche en péricytes.

Les veines ont généralement un diamètre interne beaucoup plus important que celui observé dans les veinules ou même dans les artères musculaires (1 à 3 cm environ chez l'Homme), mais leur paroi est mince et déformable conférant plutôt aux veines une capacité structurale à pouvoir stocker le sang. Les veines possèdent des structures valvulaires, disposées dans le sens du flux sanguin, et s'opposant au retour veineux.

B. Structure de la paroi vasculaire

La paroi des vaisseaux sanguins est constituée de trois tuniques morphologiquement distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, la media et l'adventice. La taille et la complexité de ces trois tuniques varient selon le type de vaisseau sanguin : elles peuvent être très épaisses ou réduites à une simple mono-couche cellulaire.

1. Intima

L'intima, ou endothélium vasculaire, est la couche la plus interne de la paroi vasculaire qui tapisse la face luminale des vaisseaux sanguins (**Figure 1**). Elle est constituée d'une seule couche de cellules endothéliales (CEs) reliées entre elles par des jonctions intercellulaires et reposant sur une fine couche de tissu conjonctif lâche externe (Movat and Fernando 1963, Hansen 1987). En l'absence de contraintes mécaniques, les CEs sont de forme polygonale, 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. Les CEs sont directement en contact avec le sang circulant et assurent de nombreuses fonctions : elles inhibent la coagulation sanguine, métabolisent certaines hormones circulantes, constituent une barrière sélective aux protéines plasmatiques, synthétisent des facteurs de croissance qui agissent sur les éléments figurés du sang et sur les cellules musculaires lisses (CMLs) vasculaires (CMLVs) sous-jacentes, et transportent des lipoprotéines et des substances vasoactives dans la paroi vasculaire. L'endothélium est également capable de moduler le tonus vasculaire par la production de vasodilatateurs (prostacycline, bradykinine et monoxyde d'azote (NO)) et vasoconstricteurs (endothéline-1 (ET-1), thromboxane A2). Ces mêmes substances sont capables, à long terme, d'agir sur la structure des CMLVs sous-jacentes, et influencent ainsi le remodelage vasculaire. L'intégrité de la fonction endothéliale est donc essentielle pour le contrôle du tonus vasculaire et la structure de la paroi artérielle.

L'endothélium est très sensible aux modifications pathologiques et reste une cible privilégiée des facteurs de risque des pathologies vasculaires. 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 quel que soit le territoire vasculaire, les CEs 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.

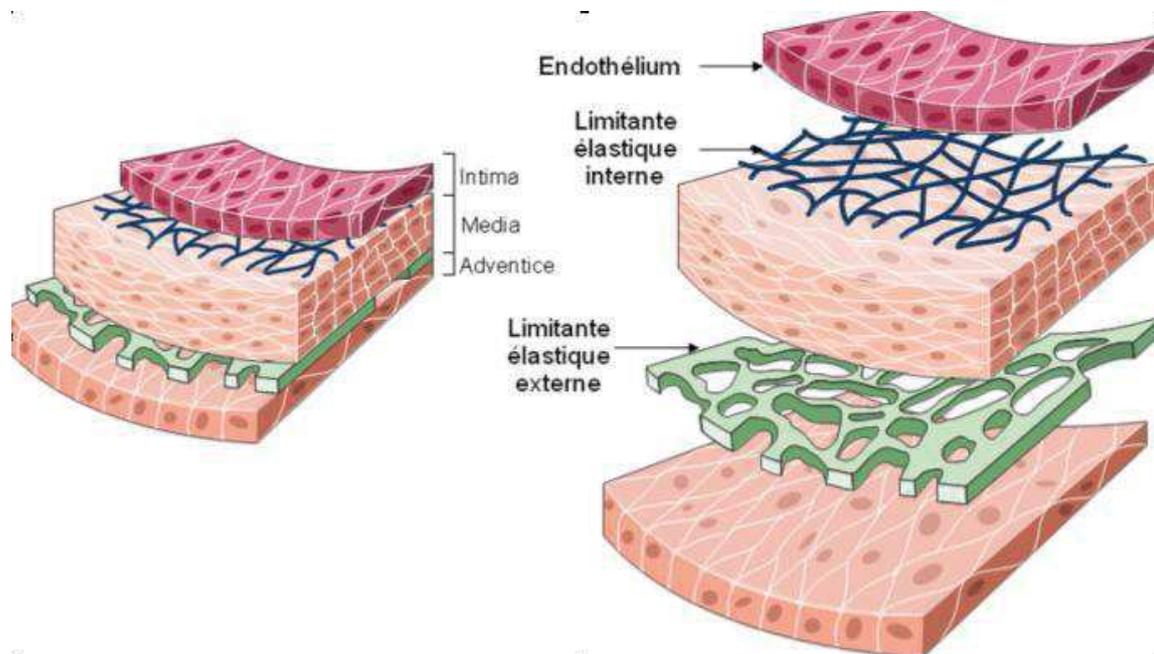


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une artère.

2. Media

La media est la couche médiane de la paroi vasculaire (**Figure 1**). Elle est essentiellement constituée de CMLVs et de matrice extracellulaire (MEC) : fibres élastiques, fibrilles d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène, protéoglycanes. Le muscle lisse (ML) vasculaire est organisé en faisceaux non striés qui s'enroulent sous forme circulaire ou elliptique autour de l'axe luminal du vaisseau (Tani et al. 1977, Krizmanich and Lee 1987). Cette disposition favorise ainsi le ceinturage de la lumière des vaisseaux et la réduction de leur calibre au cours de la vasoconstriction. Chaque faisceau possède plusieurs CMLs qui sont disposées de façon parallèle et reliée entre elles par des jonctions intercellulaires. L'épaisseur de la media varie en fonction du type vasculaire, du sexe et même de l'âge (Krizmanich and Lee 1987, Johnson et al. 2001). La media est le siège du tonus contractile vasculaire. Deux limitantes élastiques interne et externe séparent respectivement la media de l'intima et de l'adventice.

3. Adventice

L'adventice est la tunique la plus externe de la paroi vasculaire (**Figure 1**). Elle est constituée de fibres d'élastine et de collagène qui forment des unités lamellaires concentriques par rapport à l'axe luminal des vaisseaux. L'épaisseur de cette tunique varie en fonction du type vasculaire : dans les artères élastiques, elle est relativement mince, riche en fibres élastiques et comporte obligatoirement un *vasa vasorum* et des fibres nerveuses ; 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.

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.

4. Vasa vasorum

Comme toutes les cellules de l'organisme, les cellules constitutives de la paroi vasculaire présentent une activité métabolique. Leur proximité immédiate avec le sang circulant fait que la plupart du temps, les cellules vasculaires effectuent directement leurs échanges avec ce sang circulant. Pour les vaisseaux de gros diamètre, la nutrition des cellules constituant la paroi vasculaire est assurée à la fois par le sang circulant mais aussi par un système capillaire, le *vasa vasorum*.

Ce réseau capillaire permet donc d'apporter des nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau. Il est présent dans toutes les artères comportant plus de 29 unités lamellaires (Wolinsky and Glagov 1967). Le *vasa vasorum* peut en outre apporter un certain nombre de médiateurs et d'hormones en contact plus ou moins direct avec les CMLs des artères les plus grosses.

5. Innervation

Le ML vasculaire est sous le contrôle du système nerveux autonome (SNA), et essentiellement du système sympathique. Les vaisseaux sont innervés par des fibres nerveuses dont les afférences aboutissent à la limite de la media et de l'adventice. L'arborisation terminale de l'axone forme un réseau périvasculaire, permettant à toute la tunique musculaire, et non pas à chaque CML individuellement, de répondre à un stimulus. Ces fibres nerveuses agissent directement sur les CMLs de la couche la plus externe de la media, puis la

transmission de l'excitation se fera de proche en proche par couplage électrique entre les cellules. La densité de l'innervation est inversement corrélée à la taille du vaisseau mais aussi à la résistance du vaisseau. Ainsi, ce sont les petites artérioles pré-capillaires qui sont le plus innervées. Cette innervation est responsable d'un état de vasoconstriction permanent appelé tonus sympathique vasomoteur et de la résistance vasculaire périphérique (RVP).

Si la plupart des nerfs vasomoteurs sont noradrénergiques, des terminaisons cholinergiques existent également (Goyal 1989). D'autres terminaisons nerveuses ont été mises en avant : elles sont souvent purinergiques, mais peuvent aussi libérer d'autres médiateurs, principalement le peptide vasoactif intestinal (VIP : *Vasoactive intestinal peptide*), l'histamine et la dopamine. La sérotonine, la substance P, les enképhalines et le CGRP (*Calcitonin gene related-peptide* ou peptide lié au gène de la calcitonine) pourraient aussi être des neurotransmetteurs vasculaires. Enfin, l'action du neuropeptide Y (NPY) comme co-neurotransmetteur du système adrénergique est bien documentée. Ce peptide est libéré avec la noradrénaline dont il renforce l'action, directement en stimulant des récepteurs spécifiques (Stjarne et al. 1986).

C. Cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV) : siège du tonus contractile vasculaire

1. Ultrastructure de la CMLV

Les CMLVs sont fusiformes d'une largeur de 5 à 10 μm pour une longueur de 20 à 200 μm . Chez l'adulte, la CMLV est dotée d'un haut degré de spécialisation dont la fonction principale est la fonction contractile, qui permet de moduler le tonus vasculaire artériel, indispensable à la régulation du débit sanguin et de la pression artérielle (PA).

L'appareil contractile de la CMLV est constitué de 2 types de filaments :

- Les filaments épais de myosine sont formés de 2 paires de chaînes légères (*Myosin light chain*, MLC), l'une de 20 kDa (MLC20 ; chaîne régulatrice, phosphorylable) et l'autre de 17 kDa (MLC17 ; chaîne essentielle), et de 2 chaînes lourdes d'environ 200 kDa (*Myosin heavy chain*, MHC). Un gène code pour 4 isoformes de MHC exprimées dans le muscle lisse (*smooth muscle*-MHC, SM-MHC) et obtenues par épissage alternatif, sur l'exon 21 pour les isoformes SMA et SMB, et sur l'exon 39 pour les isoformes SM1 et SM2.
- Les filaments fins d'actine sont constitués de polymères d' α -*smooth muscle*-actin (α -SM-actin ou α -actin-2), associés à la tropomyosine, la caldesmone et la calponine. Contrairement aux cellules musculaires striées, il n'y a pas de troponine C.

2. Mécanisme moléculaire de la contraction de la CML

L'état contractile de la CML est dépendant du niveau de phosphorylation des chaînes légères régulatrices de la myosine MLC20, lui-même régulé par deux enzymes :

- La kinase de la chaîne légère de la myosine (*MLC Kinase* : MLCK) phosphorylant la MLC20 sur la Sérine 19, et provoquant un changement de conformation de la myosine qui passe dans une conformation plus allongée, capable de se lier avec l'actine (Ikebe et al. 1987);
- La phosphatase de la chaîne légère de la myosine (*MLC Phosphatase* : MLCP), assurant la déphosphorylation de ce résidu, et provoquant ainsi la rupture de l'interaction actine-myosine.

L'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine triphosphate) 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 MLC20 qui est un processus hautement régulé.

L'activité de la MLCK est augmentée lors d'une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Ca^{2+}). La fixation réversible du Ca^{2+} sur la calmoduline (CaM ; 4 ions calciques se liant à une molécule de CaM) induit un changement de conformation de celle-ci (Means et al. 1991). Le complexe Ca^{2+} /CaM interagit alors avec la MLCK, et provoque son activation.

Parallèlement à ce mécanisme de contraction dépendant du Ca^{2+} , il existe un second mécanisme, appelé sensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} , qui permet de maintenir la MLC20 dans un état phosphorylé en l'absence de modification de la concentration cytosolique de Ca^{2+} .

3. Couplage excitation/contraction du muscle lisse vasculaire

Le couplage excitation/contraction (CEC) du muscle lisse vasculaire est l'ensemble des phénomènes permettant la contraction du muscle suite un stimulus physiologique.

a. Contraction de la CMLV suite à une augmentation du calcium intracellulaire

A l'état de repos, la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol de la CML est d'environ 0,1 μM , alors qu'elle est de l'ordre de 1 à 2 mM dans le milieu extracellulaire (Bolton 1979, Marin 1993) et de 10 à 15 mM dans le réticulum sarcoplasmique (RS) (Chapman and Tunstall 1987).

Cette homéostasie calcique est assurée grâce à différents mécanismes de transports actifs à travers la membrane plasmique et les membranes intracellulaires. A la membrane plasmique, la pompe Ca^{2+} -ATPase (*Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase* : PMCA) expulse un ion Ca^{2+} contre l'entrée de 2 ions H^+ (Carafoli 1992), alors que l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fait sortir un ion Ca^{2+} contre l'entrée de 3 ions Na^+ dans la cellule (Eisner and Lederer 1985).

Parmi les organites intracellulaires, le réticulum sarcoplasmique (RS) joue un rôle primordial dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire. Le pompage du Ca^{2+} dans le réticulum est assuré par la Ca^{2+} -ATPase du RS (*Sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase* : SERCA) qui peut représenter jusqu'à 90 % des protéines de la membrane de ce RS.

Ainsi, les SERCAs agissent en concert avec les PMCA et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pour maintenir une faible concentration cytosolique de Ca^{2+} . La contribution relative de ces systèmes est variable en fonction de l'espèce et des différents types de CMLs, mais la plupart des auteurs considèrent que le transport par les SERCAs serait le mécanisme le plus important (Orallo 1996).

Trois différentes formes de signalisation calcique ont été décrites dans le muscle lisse (Ledoux et al. 2006):

i) Le Ca^{2+} cytoplasmique global représente une augmentation généralisée de calcium dans le cytoplasme. Il induit la contraction du muscle lisse par activation de la MLCK.

ii) Les vagues calciques ou "*calcium waves*" résultent d'une libération de calcium des réservoirs intracellulaires par les récepteurs à l'inositol 1,4,5 tri-phosphate (IP3) et les récepteurs à la ryanodine (RyR). Ces vagues calciques sont responsables de la contraction du muscle mais peuvent également activer les canaux potassiques à large conductance (BK_{Ca}), responsables d'une sortie de K^+ , d'une hyperpolarisation membranaire et donc d'une diminution du tonus vasculaire.

iii) Les étincelles calciques ou "*calcium sparks*" sont définies comme une élévation localisée et transitoire de Ca^{2+} résultant de l'ouverture des RyR du RS. La concentration locale de calcium cytosolique peut alors atteindre 10-100 μM . Les *sparks* calciques sont capables d'activer les BK_{Ca} situés en regard des RyR et ainsi provoquer une hyperpolarisation de la membrane par efflux de K^+ .

Une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique à des valeurs supérieures à 1 μM déclenche la contraction de la CMLV. Ainsi, ce Ca^{2+} peut avoir une origine extracellulaire et/ou sarcoplasmique. Ces deux sources de Ca^{2+} ont un rôle différent dans le processus de la contraction musculaire et sont dépendantes du mode d'initiation de la contraction. En effet,

l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique peut être due soit à une modification du potentiel de membrane (initiation électro-mécanique) qui va provoquer l'ouverture de canaux calciques dépendants voltage-dépendants (CCVD) et permettre l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire, soit à la liaison d'un agoniste à un récepteur (initiation pharmaco-mécanique), ce qui augmente les concentrations de Ca^{2+} par sa libération des réservoirs intracellulaires (**Figure 2**). Ces deux systèmes sont dépendants et agissent en synergie.

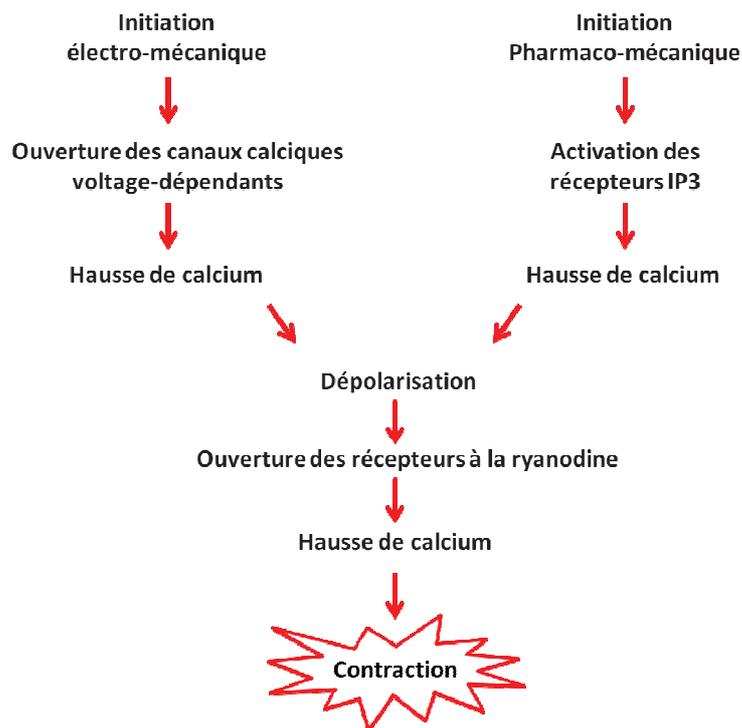


Figure 2 : Modes d'initiation de la contraction de la CMLV par augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique.

a.1 Couplage électro-mécanique

Le potentiel de membrane des CMLs au repos est de -60 à -40 mV, celui-ci est régi par deux types de canaux ioniques : les canaux chlore et les canaux potassiques qui sont activés par le calcium (exemple les BK_{Ca} et Cl_{Ca}). Une activation par le calcium du canal chlore va provoquer une sortie de Cl^- , et donc une dépolarisation de la membrane plasmique, au contraire, l'activation des canaux potassiques provoque une sortie de K^+ et donc une hyperpolarisation.

L'entrée du Ca^{2+} dans la CML est contrôlée par le potentiel de membrane qui détermine l'ouverture des CCVDs (Shmigol et al. 1998). Deux types de canaux CCVD sont décrits dans

le ML vasculaire (les canaux L et les canaux T) (Thorneloe and Nelson 2005, Rodman et al. 2005), les canaux calciques de type L (LTCC : *L-type calcium channel* ou canaux $Ca_v1.$) et plus précisément l'isoforme $Ca_v1.2.$ (Thorneloe and Nelson 2005) se caractérisent par un seuil d'activation élevé (de l'ordre de -20 mV) et une cinétique d'inactivation lente, ils sont considérés comme la principale source extracellulaire de Ca^{2+} .

Le canal calcique de type T (Ca_v3 , "*Transient*") quant à lui se caractérise par un seuil d'activation faible (de l'ordre de -50 mV), il semble également jouer un rôle dans le couplage électro-mécanique. Son expression au niveau du ML vasculaire a été mise en évidence (Rodman et al. 2005) mais son rôle fonctionnel reste à déterminer.

a.2 Couplage pharmaco-mécanique

Dans le cas d'un couplage pharmaco-mécanique, l'activation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG) déclenche une cascade de signalisation intracellulaire dont la finalité est la libération de calcium dans le cytosol à partir des stocks intracellulaires du RS.

Les agonistes vasoconstricteurs sont des hormones véhiculées par la circulation sanguine, des neurotransmetteurs libérés notamment par les terminaisons nerveuses sympathiques (noradrénaline, NA), ou des autacoïdes libérés par les cellules ou tissus environnants (ET-1, angiotensine II). Ces agonistes activent des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques de la famille $G_{q/11}$ qui vont déclencher la voie de la phospholipase C (PLC). Cette enzyme hydrolyse le phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), constituant de la bicouche lipidique membranaire, générant ainsi deux seconds messagers : l' IP_3 et le diacylglycérol (DAG). L' IP_3 est un second messager diffusible qui va se lier et activer son récepteur spécifique (IP_3R) situé à la membrane du RS, responsable d'une libération de Ca^{2+} des stocks du RS vers le cytosol (Hirose et al. 1999). Le Ca^{2+} libre peut se lier à la CaM pour déclencher le processus de contraction, mais également se lier et activer les RyR situés à la membrane du RS, participant également à l'efflux de Ca^{2+} vers le cytosol. Ce mécanisme appelé "*Ca²⁺-induced Ca²⁺ 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'amplifier ce phénomène de CICR (Janiak et al. 2001). Le Ca^{2+} intracellulaire affecte également la probabilité d'ouverture des IP_3R . Ainsi, 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 .

b. Phénomène de sensibilisation/désensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+}

La sensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} est définie par le processus par lequel la contraction dépendante du Ca^{2+} se produit, mais pour une concentration en Ca^{2+} inférieure à celle nécessaire pour activer uniquement la MLCK (Somlyo and Somlyo 1994). L'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au Ca^{2+} ont permis de montrer que différents agonistes induisent des réponses contractiles d'intensité variable pour une élévation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire similaire (Himpens et al. 1990).

Ce phénomène dépend essentiellement de l'activité de la MLCP qui est indépendante de la concentration de Ca^{2+} . Ainsi, si l'activité de la MLCP est réduite, l'équilibre entre les formes non phosphorylée et phosphorylée de la MLC20 sera déplacé en faveur de la forme phosphorylée, augmentant alors la force de contraction du ML.

La MLCP est constituée de 3 sous-unités : une sous-unité qui permet l'ancrage de la MLCP sur la MLC (MYPT pour *myosin phosphatase target*), une sous-unité catalytique de 37 kDa (apparentée à la famille des sérine/thréonine phosphatases de type 1, PP1c), et une 3^{ème} sous-unité de 20 kDa dont la fonction est inconnue. Différentes isoformes de MYPT sont décrites, MYPT1 étant l'isoforme majoritairement décrite dans la CML. La phosphorylation de MYPT1 diminue l'activité de la MLCP et augmente ainsi la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile (Hirano 2007). Parmi les protéines capables d'induire cette phosphorylation « inhibitrice », la Rho Kinase (RhoK) est la première identifiée et l'une des plus importantes. Un autre mécanisme de régulation de l'activité de la MLCP implique une protéine de 17 kDa (appelée CPI-17). Sous sa forme phosphorylée par la protéine kinase C (PKC), CPI-17 agit comme un puissant inhibiteur de la MLCP par blocage direct de sa sous-unité catalytique (Kitazawa et al. 2003) (**Figure 3**).

A l'inverse, toute augmentation de l'activité de la MLCP déplace l'équilibre vers la forme non phosphorylée de la MLC20 en faveur de la relaxation du ML. Ce processus est appelé désensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} . Il est principalement régulé par les nucléotides cycliques AMPc et GMPc qui activent la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) et la protéine kinase GMPc-dépendante (PKG) (**Figure 3**). En effet, il a été montré que la phosphorylation de télodine par la PKA et/ou la PKG conduit à la déphosphorylation de la

MLC20 par un mécanisme qui reste encore non élucidé (Wu et al. 1998). La PKA et la PKG sont également capables de réduire la phosphorylation inhibitrice de MYPT1 par un mécanisme d'exclusion de phosphorylation, la Ser-695 de MYPT1 une fois phosphorylée par ces kinases empêcherait la phosphorylation de la Thr-696 de MYPT1 qui va ainsi lever son inhibition sur la MLCP (Wooldridge et al. 2004).

Le rôle d'une autre kinase, la protéine kinase II dépendante du complexe Ca^{2+}/CaM (CaMKII), dans la modulation de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile a également été décrit. Une étude a montré que cette kinase est capable de 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 and Singer 2000). La PKA est également capable d'inactiver la MLCK suite à sa phosphorylation (Hathaway et al. 1985). Une autre voie de désensibilisation de l'appareil contractile a également été décrite, celle-ci fait intervenir le facteur d'échange du guanosine triphosphate (GTP) pour la famille Ras : Epac (*Exchange protein directly activated by cAMP*). En effet, une étude a montré que l'application d'un analogue de l'AMPc, activateur sélectif de cette protéine, induisait une vasorelaxation par un mécanisme impliquant la diminution d'activité de la protéine Rho-A, ce qui limiterait son effet inhibiteur sur l'activité de la MLCP (Zieba et al. 2011).

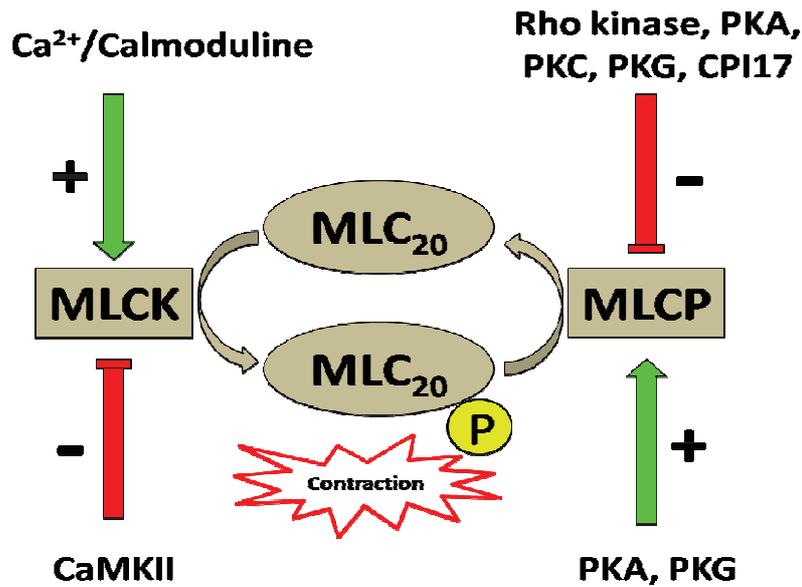


Figure 3: Activité de la phosphatase (MLCP) et de la kinase (MLCK) de la chaîne légère de la myosine (MLC) dans la CMLV.

L'activité de la MLCK est régulée par le complexe Ca^{2+} /CaM et une kinase dépendante de ce complexe (CaMKII). La MLCP est régulée par différentes kinases et protéines.

D. Contrôle du tonus vasculaire

1. Régulation nerveuse du tonus vasculaire

Le niveau de contraction des CMLVs est contrôlé à la fois par le système nerveux et le système hormonal. Les modes d'action de ces deux systèmes diffèrent en raison de la structure du vaisseau et la localisation des CMLs au sein de la media. En effet, si les afférences nerveuses peuvent être en contact direct avec les CMLVs, les hormones, véhiculées par le sang, ne sont pas en contact direct avec les CMLVs. La couche de CEs limite l'accès des hormones aux CMLVs, et les hormones agissent donc soit par diffusion, soit par effet indirect via les CEs. Par ailleurs, les médiateurs libérés par les terminaisons nerveuses peuvent également diffuser vers les CEs s'ils ne sont pas dégradés ou recaptés immédiatement.

Le système nerveux autonome joue un rôle essentiel dans le contrôle et le maintien du tonus vasculaire. Les vaisseaux sont innervés majoritairement par le système nerveux sympathique. Seuls quelques territoires sont également innervés par le système nerveux parasympathique.

a. Le système nerveux sympathique

Les fibres sympathiques participent au tonus vasculaire et ont une influence vasoconstrictrice. La noradrénaline (NA) libérée par les fibres post-ganglionnaires sympathiques peut agir sur les récepteurs α -adrénergiques (α -ARs) des CMLVs provoquant une contraction de la CML, et sur les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) responsables, au contraire, d'une relaxation.

Les récepteurs α -AR sont subdivisés en deux sous-types, α_1 - et α_2 -AR. Différents travaux ont démontré que les récepteurs α_1 étaient couplés à une production d'IP₃ via l'activation d'une PLC par une protéine G_{q/11} (Guimaraes and Moura 2001). Ces récepteurs α_1 sont largement exprimés au niveau des artères irriguant les reins, les territoires splanchniques et la peau. Dans ces organes, leur activation par les catécholamines provoque une vasoconstriction et donc une diminution du débit sanguin local. Les récepteurs α_2 sont présents essentiellement au niveau des veines où leur activation provoque une faible vasoconstriction qui favorise le retour veineux. Ces effets, couplés à l'activation d'une protéine G_i, impliqueraient l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (AC), l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendant, et l'activation de canaux potassiques (Guimaraes and Moura 2001).

Les récepteurs β -ARs sont classés en trois sous-types, les récepteurs β_1 -, β_2 - et β_3 -AR (Lands et al. 1967, Bylund et al. 1994). Au niveau artériel, les récepteurs β -ARs sont responsables d'une vasodilatation, le sous-type β_2 -AR étant prédominant, excepté au niveau des artères coronaires où les récepteurs β_1 -ARs sont majoritaires (Guimaraes and Moura 2001). Les propriétés de ces récepteurs β -ARs vasculaires seront détaillées dans le paragraphe III de l'introduction de ce manuscrit.

Globalement, l'innervation sympathique exerce un tonus vasoconstricteur, car d'une part, la densité des récepteurs α -AR est prédominante par rapport à celle des récepteurs β -AR dans la plupart des vaisseaux, et d'autre part, la NA a une affinité supérieure pour les récepteurs α_1 -AR.

b. Le système nerveux parasympathique

L'acétylcholine (Ach), libérée par les terminaisons nerveuses parasympathiques, agit au niveau de récepteurs muscariniques présents sur la CMLV mais aussi sur les CEs. Sur les CMLVs, l'activation de récepteurs muscariniques principalement du sous-type M₃ (Eglen et al. 1996) couplés à une protéine G_{q/11}, induit une élévation de la concentration du Ca²⁺ cytoplasmique consécutive à l'activation de la voie de la PLC, responsable d'une contraction de la cellule. Au contraire, l'action de l'Ach sur les CEs provoque une relaxation de la CMLV

par une voie indirecte. En effet, l'activation des récepteurs muscariniques du sous-type M₁ ou M₃ génère la synthèse et la libération de facteurs endothéliaux diffusibles vasorelaxants, tels que le monoxyde d'azote (NO). Cette voie de relaxation dépendante de l'endothélium sera décrite dans le paragraphe I.D.2.a de l'introduction. En situation normale, ou lors de l'administration exogène d'Ach, l'effet endothélial de l'Ach est prédominant et est responsable des effets vasodilatateurs de l'Ach.

c. Le système nerveux sensoriel

Le système nerveux sensoriel peut également être impliqué dans le contrôle de l'état contractile des CMLs des vaisseaux cutanés par un mécanisme appelé réflexe d'axone décrit dès 1923 par Bayliss. En effet, 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 par la libération de neurotransmetteurs. Les neurones moteurs sensoriels sont activés par une variété de stimuli physiques et chimiques et utilisent comme neurotransmetteurs la substance P et le *calcitonine gene-related peptide* (CGRP) (Maggi and Meli 1988, Kawasaki et al. 1988). Ces neuropeptides jouent un rôle déterminant dans le processus inflammatoire en provoquant une vasodilatation mais également une hypersensibilité qui va préserver la zone lésée d'une autre atteinte.

Les récepteurs au CGRP sont localisés sur les CEs (Hagner et al. 2002) et les CMLVs (Luu et al. 1995). L'activation de ces récepteurs induit une vasodilatation impliquant différents mécanismes qui varient dans les différents lits vasculaires, tels que : la diminution de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire, la réduction de la sensibilité de l'appareil contractile au Ca²⁺, la production d'AMPC, l'activation de canaux potassiques et la libération de NO (Bell and McDermott 1996).

La substance P provoque la libération de plusieurs médiateurs vasoactifs, tels que l'histamine par dégranulation mastocytaire et la sérotonine (5-HT) par les plaquettes.

2. Régulation endothéliale du tonus vasculaire

L'endothélium joue un rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire via la libération de différents facteurs capables de diffuser et d'agir au niveau de la CMLV. L'action de différents médiateurs neuro-hormonaux tels que l'Ach, l'adrénaline et NA, l'endothéline-1, l'histamine, la 5-HT, ou la bradykinine, sur leurs récepteurs respectifs exprimés à la

membrane des CEs va induire la synthèse et la libération de facteurs solubles qui vont alors moduler le tonus contractile des CMLs avoisinantes, mais également leur prolifération. Les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium sont nommés EDRFs (*Endothelium-derived relaxing factors*) par opposition aux facteurs contractants dérivés de l'endothélium ou EDCFs (*Endothelium-derived contracting factors*).

En situation physiologique, l'endothélium produit majoritairement des EDRFs et joue un rôle essentiel vasculo-protecteur. Lorsque la balance entre EDRFs et EDCFs est altérée en faveur des EDCFs, une dysfonction endothéliale s'installe et semble être la première étape dans la succession des événements menant à des pathologies cardiovasculaires.

a. Les EDRFs, facteurs relaxants dépendants de l'endothélium

En 1980, Furchgott et Zawadzki ont montré que la relaxation de l'aorte de lapin suite à l'application de l'Ach dépend de la présence des CEs (Furchgott and Zawadzki 1980). Ces travaux ont pu ainsi mettre en lumière le rôle de l'endothélium dans la modulation du tonus contractile de la CMLV grâce à la libération d'un facteur relaxant dépendant de l'endothélium. Par la suite, une série de travaux a montré que ce facteur stimulait la guanylate cyclase soluble (GCs) et qu'il était rapidement dégradé par l'anion superoxyde (O_2^-), deux propriétés ayant permis d'identifier cet EDRF comme étant le NO (Palmer et al. 1987). Ce radical libre gazeux joue le rôle de médiateur-relais pour de nombreuses substances vasorelaxantes comme la bradykinine, l'histamine, la 5-HT, l'Ach ou l'ATP. Il est issu de la transformation de la L-arginine en L-citrulline par une enzyme, la NO synthase (NOS). Trois isoformes de cette enzyme ont été identifiées. Deux isoformes, constitutives et dépendantes de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, sont distinguées, une isoforme dite neuronale (nNOS ou NOS 1) et une isoforme endothéliale (eNOS ou NOS 3) (Vanhoutte et al. 2016). Leur activation est sous la dépendance de plusieurs mécanismes notamment une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Presta et al. 1997). La troisième isoforme dite inducible (iNOS ou NOS 2) est une isoforme dont l'expression est essentiellement induite dans des conditions de stress pathologique (Hansson et al. 1994). Une fois synthétisé, le NO est capable de diffuser rapidement et librement à travers la membrane cellulaire. Sa fixation sur la GCs va induire la production de GMPc (Guanosine monophosphate cyclique) à partir de GTP (Poulos 2006). Le GMPc se lie à différentes protéines cibles, telles que la PKG, certains canaux ioniques (voir paragraphe II.C.3 de l'introduction), et certaines phosphodiesterases

(PDEs), enzymes assurant l'hydrolyse des nucléotides cycliques (voir paragraphe II.D.1 de l'introduction) (Morgado et al. 2012).

La PKG, un des principaux effecteurs intracellulaires du signal GMPc, contrôle la phosphorylation de diverses cibles protéiques intracellulaires conduisant à la diminution de la concentration intracellulaire de calcium soit par la diminution de sa libération des réservoirs intracellulaires via les récepteurs à l'IP₃ du RS (suite à la phosphorylation de la protéine IRAG "*IP3 receptor-associated cGMP kinase substrate*" exerçant alors un effet inhibiteur sur l'activité de ce récepteur), soit par augmentation de sa recapture dans le RS (par phosphorylation du phospholamban, levant ainsi l'inhibition de la pompe SERCA) soit par diminution de son entrée depuis le milieu extracellulaire (par phosphorylation des canaux LTCC). L'ensemble de ces mécanismes conduit alors à la relaxation de la CML (Francis et al. 2010).

Un autre EDRF synthétisé par les CEs est la prostacycline (PGI₂). La PGI₂ est un dérivé de l'acide arachidonique (AA) par action d'une enzyme, la cyclooxygénase (COX). Il existe deux isoformes de COX, la COX-1 et la COX-2, la COX-1 étant l'isoforme constitutive, la COX-2 quant à elle est plutôt induite lors de processus pathologiques et du vieillissement (Shi et al. 2008). La synthèse de la PGI₂ ainsi que celle des autres prostanoïdes est déclenchée par une élévation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ dans la CE, activant alors la phospholipase A₂ (PLA₂) dont l'action sur les phospholipides membranaires permet de libérer de l'AA. Ce dernier est transformé par les COXs en endoperoxydes, qui sont par la suite convertis en PGI₂, TXA₂, PGD₂, PGE₂ et/ou PGF_{2α} par leurs synthèses respectives (Bos et al. 2004).

La prostacycline est le premier prostanoïde à avoir été identifié en 1976 (Moncada et al. 1976). Une fois synthétisée, la prostacycline diffuse à travers la membrane de la CE, pour ensuite agir sur des récepteurs de type IP, situés à la membrane de la CMLV. Ces récepteurs couplés à une protéine G_{as}, puis à l'activation de la voie AMPc/PKA déclenchent la relaxation de la cellule. La prostacycline possédant un fort pouvoir vasodilatateur est utilisée en thérapeutique pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Barst et al. 1994).

Le fait que certaines vasorelaxations dépendantes de l'endothélium persistaient en présence d'inhibiteurs de la NOS et de la COX, a suggéré l'existence d'un autre mécanisme vasorelaxant dépendant de l'endothélium, mais indépendant du NO et de la PGI₂ (Komori et al. 1988). Cette relaxation est généralement associée à une hyperpolarisation de la CMLV et a

été au départ attribuée à un facteur endothélial non défini nommé EDHF (*Endothelium-derived hyperpolarizing factor* ou facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium). Cet acronyme porte à confusion car il implique l'existence d'un seul facteur endothélial responsable de ce type de relaxation, alors que différents facteurs provenant de l'endothélium incluant le NO, la PGI₂ mais aussi les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le monoxyde de carbone, l'adénosine et divers métabolites de l'AA sont capables d'induire une hyperpolarisation du muscle lisse (Feletou and Vanhoutte 2007). Il existe maintenant assez de preuves pour dire que la relaxation EDHF-dépendante est induite par l'hyperpolarisation de la membrane de la CE suite à une élévation de la concentration de calcium intracellulaire permettant l'activation de canaux K⁺ dépendants du calcium (K_{ca}) et l'efflux de K⁺. Cette hyperpolarisation endothéliale est par la suite transférée aux CMLs adjacentes soit par la production de différents facteurs (peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) mais également le K⁺ lui-même) capables de diffuser à travers les membranes soit par les jonctions gap myoendothéliales. Au niveau des CMLVs, ces différents facteurs activent des canaux K⁺ (BK_{Ca}, Kir) générant une hyperpolarisation de la membrane de la CMLV qui s'accompagne de la fermeture des canaux LTCC, aboutissant à la relaxation (Busse et al. 2002). De ce fait, l'acronyme EDHF représente plutôt un mécanisme de relaxation, par transfert de l'hyperpolarisation membranaire de la CE à la CMLV, plutôt qu'un facteur spécifique. Sa contribution varie en fonction du lit vasculaire et du diamètre des vaisseaux. Il représente un mécanisme 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.

b. Les EDCFs, facteurs contractants dépendants de l'endothélium

Plusieurs études ont pu montrer que les prostanoïdes tels que : TXA₂, PGH₂, PGE₂ et PGF_{2α}, produits par action des COXs sur l'AA sont une source majeure de la contraction dépendante de l'endothélium (Vanhoutte et al. 2005). En effet l'inhibition enzymatique des COX prévient les contractions dépendantes de l'endothélium (Miller and Vanhoutte 1985).

En 1985, Hickey et ses collaborateurs ont montré pour la première fois la présence d'un peptide vasoconstricteur sécrété par les CEs (Hickey et al. 1985). Ce peptide de 21 acides aminés, appartient à la famille des endothélines, dont 3 isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3) sont connues, l'ET-1, étant la plus exprimée et la plus abondante au niveau vasculaire. L'ET-1 agit sur deux récepteurs de la superfamille des RCPGs : ET_A et ET_B. Ces deux types de récepteurs

sont localisés sur les CMLs où ils induisent une vasoconstriction par un mécanisme Ca^{2+} -dépendant suite à la production d' IP_3 et de DAG par activation de la PLC. Les CEs quant à elles expriment uniquement le récepteur ET_B dont l'activation est responsable d'une vasorelaxation suite à la production de NO et de prostacycline (Schiffrin 2005). L'action de l'ET sur les récepteurs ET_B semble prévenir la dysfonction endothéliale comme il a été montré dans une étude réalisée sur un modèle murin de délétion du gène codant pour le récepteur ET_B (Bagnall et al. 2006). Ainsi, le récepteur ET_B serait plutôt vasculo-protecteur par opposition au récepteur ET_A .

Les espèces réactives de l'oxygène, peuvent également jouer un rôle dans la vasoconstriction dépendante de l'endothélium. Les ERO telles que le O_2^- , le radical hydroxyle et l' H_2O_2 , générées durant le cycle d'activité normale du métabolisme, peuvent entraîner un stress oxydatif lors d'une surproduction rencontrée dans certains contextes pathologiques comme l'hypertension artérielle (HTA), le diabète et l'athérosclérose. Les ERO sont capables d'induire une vasoconstriction par l'inhibition des trois principales voies de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium, impliquant le NO, la PGI_2 et l'EDHF. Ainsi, l' O_2^- , précurseur des ERO, est non seulement capable de réduire la biodisponibilité du NO mais peut également inhiber sa principale cible la GCs par inactivation oxydative (Munzel et al. 2005). L' O_2^- inhibe également la prostacycline synthase et l'activité des canaux K^+ impliqués dans les réponses médiées par l'EDHF. Il a également été décrit que le stress oxydant diminue le couplage électrique en interagissant avec différentes connexines formant les jonctions gap. Enfin, ces ERO peuvent elles-mêmes agir comme EDCF (Feletou and Vanhoutte 2006).

E. Modulation phénotypique de la CMLV

Dans un contexte non pathologique, les CMLs sont qualifiées de cellules quiescentes car elles prolifèrent à un rythme extrêmement faible, présentent une très faible activité 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 aux muscles squelettique ou cardiaque qui possèdent un état de différenciation terminale, 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. Cette plasticité est bénéfique dans le développement vasculaire lorsque les CMLs jouent un rôle clé dans la morphogénèse des vaisseaux sanguins ou encore

lors de lésions vasculaires où ces cellules 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'ordre pathologique 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 MEC qui est notamment à l'origine de la chape fibreuse des plaques d'athérome et des molécules pro-inflammatoires procurant ainsi un micro-environnement propice pour la pénétration et l'activation des leucocytes. La mise en culture des CMLs entraîne également une transition vers ce phénotype « synthétique ».

1. Caractéristiques générales des phénotypes contractiles et synthétiques de la CMLV

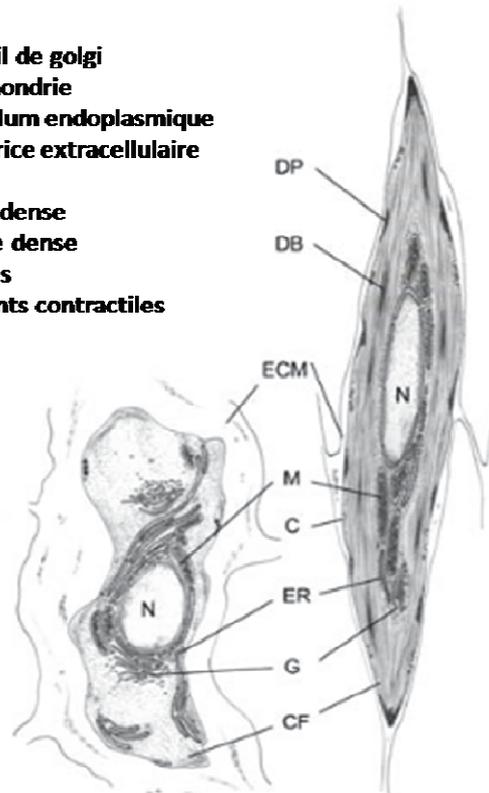
La CMLV peut présenter deux phénotypes différents, le phénotype contractile/quiescent et le phénotype synthétique/prolifératif.

Ces deux phénotypes de la CMLV sont caractérisés par des différences sur le plan morphologique : alors que la CML contractile présente une forme allongée, fusiforme avec un cytoplasme riche en filaments contractiles, la CML synthétique est moins allongée et présente une morphologie pavimenteuse avec un aspect épithélioïde ou rhomboïde (**Figure 4**) (Chamley-Campbell et al. 1979, Hao et al. 2003). Ces cellules synthétiques renferment un plus grand nombre d'organelles témoignant d'une importante capacité de synthèse protéique.

Par ailleurs, ces deux phénotypes présentent des caractéristiques migratoire et proliférative différentes. En effet, la CML synthétique se caractérise par un niveau de prolifération et une capacité migratoire plus importants que la cellule contractile (Hao et al. 2003).

La différenciation de la CMLV peut être contrôlée à deux niveaux : au niveau du programme génétique, qui contrôle l'expression des gènes caractéristiques de la lignée cellulaire et au niveau des signaux environnementaux qui peuvent avoir un impact sur l'état de différenciation de la cellule.

G : Appareil de golgi
M : Mitochondrie
ER : Réticulum endoplasmique
ECM : Matrice extracellulaire
N : Noyau
DB : Corps dense
DP : Plaque dense
C : Cavéoles
CF : filaments contractiles



Phénotype synthétique

Phénotype contractile

Figure 4: Caractéristiques ultra-structurelles des CMLs synthétiques et contractiles.
Modifié par (Rensen et al. 2007)

2. Les différents marqueurs du phénotype de la CMLV

Plusieurs études récentes se sont intéressées à l'étude des marqueurs protéiques permettant de déterminer le phénotype des CMLVs et ainsi suivre leur état de différenciation notamment lors de processus pathologiques (Owens et al. 2004). De nombreux gènes et protéines spécifiques du muscle lisse vasculaire ont été identifiés comme d'excellents marqueurs de l'état de différenciation/maturation des CMLVs. La plupart de ces marqueurs est impliquée dans la fonction contractile de ces cellules, en tant que composant structural de l'appareil contractile ou comme régulateur de sa fonction. Parmi ces marqueurs, ceux qui paraissent les plus pertinents sont la SM- α -actine, les isoformes de la chaîne lourde de la myosine, la smootheline, la calponine h1 et la protéine 22 du muscle lisse (SM22 ou *transgelin*).

La *SM- α -actin* est le marqueur le plus couramment utilisé. Cette isoforme de l'actine représente 40 % des protéines cellulaires totales et 70 % des isoformes d'actine de la CMLV (Owens and Thompson 1986). Bien que son expression soit spécifique des CMLVs différenciées chez l'adulte, elle a également été décrite comme exprimée d'une manière transitoire au cours de la différenciation du muscle cardiaque et squelettique (Woodcock-Mitchell et al. 1988, Ruzicka and Schwartz 1988), mais aussi dans certains états pathologiques, notamment dans les fibroblastes lors des processus de cicatrisation et de revascularisation tumorales (Darby et al. 1990).

Parmi les isoformes de la MHC, les 2 isoformes musculaires lisses SM1 et SM2 paraissent comme des marqueurs spécifiques des CMLVs 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). Il est bien décrit que l'expression des différentes isoformes de cette protéine MHC évolue au cours du développement. Ainsi, différentes études ont montré que le muscle lisse au cours de l'embryogenèse et au stade néonatal exprime d'avantage la forme non musculaire (*Non muscle-MHC*, NM-MHC), qui existe sous 3 isoformes (NMA, NMB et la NMC) codées par 3 gènes différents. L'expression de la NM-MHC diminue chez l'animal adulte pour atteindre environ 10%. Cette diminution est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la SM-MHC (Eddinger and Meer 2007). En supposant que chacune de ces deux formes, SM-MHC et NM-MHC, possède une fonction unique, cette variation d'expression au cours du développement suggère une modulation de la fonction principale des CMLs au cours de la différenciation telle que la perte de la capacité à proliférer et le gain d'une force de contraction. En outre, la culture cellulaire affecte également l'expression de la MHC : on observe à l'inverse une augmentation de l'expression de NM-MHC et une diminution de l'expression de SM-MHC.

Une autre protéine, la calponine h1, a été également proposée comme marqueur spécifique de la différenciation des CMLs en raison de l'absence de son expression dans les cellules en prolifération (Samaha et al. 1996). Néanmoins cette molécule peut être transitoirement exprimée au cours du développement précoce du muscle cardiaque (Miano and Olson 1996).

La transgeline, est une protéine appartenant à la famille des calponines, elle est abondamment exprimée dans le muscle lisse (Lees-Miller et al. 1987), et est largement utilisée comme marqueur au cours de l'embryogenèse et chez l'adulte (Li et al. 1996). Sa fonction principale est de lier l'actine et faciliter la formation des structures du cytosquelette (Han et al. 2009). Il a été rapporté que cette protéine était capable de moduler le phénotype

cellulaire (Dong et al. 2010, Shen et al. 2010), une diminution de son expression est observée dans certaines pathologies artérielles telles que le cancer et l'athérosclérose (Shanahan et al. 1994, Assinder et al. 2009)

Enfin, la smootheline, constituant majeur du cytosquelette des CMLVs, a été également suggérée comme marqueur des cellules différenciées (van der Loop et al. 1996). En effet, l'isoforme B de cette protéine est exclusivement exprimée dans les CMLVs de phénotype contractile ce qui en fait un très bon marqueur phénotypique.

Ces données de la littérature nous laissent conclure qu'actuellement, les deux marqueurs de choix pour le phénotype contractile des CMLs sont la SM-MHC et la smootheline. En effet, l'expression de la SM-MHC n'a jamais été détectée dans un tissu autre que le muscle lisse et c'est l'unique marqueur protéique qui est également spécifique du muscle lisse au cours de l'embryogenèse (Miano et al. 1994). L'expression de la smootheline est quant à elle très rapidement diminuée dans les CMLVs en culture qui acquièrent un phénotype synthétique (Christen et al. 1999). De plus, il a été montré que ces deux protéines sont absentes dans les myofibroblastes des modèles d'artères lésées (Christen et al. 2001). Le niveau d'expression de ces marqueurs diminue lors de la mise en culture des CMLVs et l'ampleur de cette baisse diffère d'un marqueur à un autre (Christen et al. 1999).

En revanche, les marqueurs dont l'expression est augmentée dans le phénotype synthétique sont rares, de ce fait, c'est la diminution de l'expression des protéines associées au phénotype contractile qui est généralement considérée comme caractéristique du phénotype synthétique.

3. Modulation phénotypique des CMLVs et pathologies vasculaires

La CML chez l'adulte est hautement spécialisée et sa fonction principale est la contraction et la régulation du diamètre vasculaire et de la pression sanguine. En temps normal, ces cellules prolifèrent à un rythme extrêmement faible et montre une capacité de synthèse protéique très faible également. Néanmoins, une plasticité importante des CMLs peut être observée au cours du développement vasculaire, en effet, dans ce contexte, la CML joue un rôle clef dans la morphogenèse vasculaire et montre une capacité proliférative et migratoire importantes ainsi qu'une production accrue des différents composants de la MEC qui constitue la majeure partie de la paroi vasculaire. De la même manière, lors de lésions vasculaires, la CML augmente sa capacité proliférative, migratoire et synthétique et joue ainsi un rôle crucial dans la cicatrisation du vaisseau. Cette plasticité qui caractérise la CML mûre reste une propriété essentielle pour le maintien de l'intégrité vasculaire, cependant, une

conséquence délétère de cette plasticité est le fait qu'elle prédispose la CML à des signaux environnementaux qui sont capables d'induire un changement phénotypique et l'acquisition de certaines caractéristiques qui contribuent au développement et/ou à la progression de pathologies vasculaires. De plus, il est clairement admis que le changement phénotypique de la CML joue un rôle important dans diverses pathologies vasculaires, notamment l'athérosclérose, la resténose post-angioplastie, et l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire.

La pathologie dans laquelle la modulation phénotypique de la CMLV joue un rôle prépondérant est l'athérosclérose, caractérisée par une lésion de la paroi artérielle. Cette maladie est responsable de 55% des décès dans les pays occidentaux. Son processus pathologique est complexe et peut mettre à contribution différents types cellulaires tels que les macrophages, les lymphocytes, les CEs et les CMLVs (Ross 1993). En particulier, les CMLVs acquièrent un phénotype synthétique et une importante capacité migratoire leur permettant de migrer depuis la media vers l'intima. Différentes études réalisées sur un modèle animal d'induction de l'athérosclérose par hypercholestérolémie (Masuda and Ross 1990) ont confirmé que trois processus sont impliqués dans la formation des lésions athéromateuses : i) La prolifération des CMLVs, des macrophages et des lymphocytes ; ii) La formation par les CMLVs d'une matrice de tissu conjonctif comprenant des fibres élastiques, du collagène et des protéoglycanes ; et iii) l'accumulation de lipides, en particulier de cholestérol libre et estérifié, autour de la matrice formée et des cellules la composant.

Il a été rapporté que le rôle des CMLVs dans le développement de cette pathologie pourrait dépendre du stade de la pathologie. Ainsi, ces cellules semblent jouer un rôle délétère dans le développement précoce et la progression de la lésion d'athérosclérose (Ross 1993), mais semblent être capables de jouer un rôle bénéfique dans la stabilisation de la plaque au sein des lésions d'athérosclérose mûres, avant le stade final de la pathologie et la rupture de la plaque où les CMLs peuvent contribuer via l'apoptose et/ou l'activation de diverses cascades de protéases (Galis et al. 1994, Galis and Khatri 2002)

La contribution des CMLVs dans le processus pathologique de l'athérosclérose n'est pas uniquement liée à leur haute capacité à proliférer et migrer mais également aux différents changements engendrés par leur modulation phénotypique incluant l'augmentation de la production des composants de la MEC (Liau et al. 1993, Turley 2001), la production de différentes protéases (Galis et al. 1994), la participation dans les réponses inflammatoires chroniques (Hansson et al. 1986, Rong et al. 2002, Roque et al. 2002), l'altération de la

fonction contractile, de l'expression des différentes protéines contractiles et de la signalisation calcique (Kocher and Gabbiani 1986, Kocher et al. 1991, House et al. 2008).

L'un des moyens thérapeutiques utilisés pour traiter les artères atteintes de lésions athéromateuses est l'angioplastie par ballonnet pouvant être complétée par la pose d'un stent. L'efficacité de cette technique chirurgicale peut malheureusement être compromise par le phénomène de resténose vasculaire. Au cours de ce processus, les CMLs de la media subissent une modulation phénotypique et acquièrent des caractéristiques prolifératives et migratoires suite à la dénudation de l'endothélium et l'atteinte de la media. Ces CMLVs vont alors migrer vers l'intima où elles prolifèrent et sécrètent différents composés de la MEC, notamment le collagène pour tenter de réparer les dommages vasculaires. Les fibroblastes de l'adventice sont également capables de migrer vers l'intima et se différencient à ce niveau en myofibroblastes. D'autre part, différents facteurs de croissance et cytokines, tels que le PDGF (*platelet-derived growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) et l'IL-1 (Interleukine-1), sécrétés par les plaquettes agissent sur les macrophages et les CMLVs et maintiennent ainsi l'état prolifératif et synthétique de ces dernières. Les CMLVs en prolifération, les myofibroblastes dédifférenciés ainsi que la MEC synthétisée forment la lésion hyperplasique de l'intima et contribuent ainsi au phénomène de resténose (Newby and Zaltsman 2000, Marx et al. 2011).

L'HTA est également associée à une altération du phénotype des CMLVs. Cette pathologie, cliniquement définie par une pression artérielle (PA) systolique supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou une PA diastolique supérieure ou égale à 90 mmHg, représente un facteur de risque cardiovasculaire majeur. Bien que son étiologie reste complexe et varie d'un individu à l'autre, cette maladie se caractérise par une augmentation des résistances vasculaires périphériques résultant de l'augmentation de la contractilité de la CMLV mais aussi d'un remodelage de la paroi vasculaire

Les artères de résistance sont caractérisées par un tonus dit myogénique qui est défini par la capacité de ces artères à se contracter et à réduire leur diamètre interne en réponse à une augmentation de la pression intra-luminale. Ce tonus les protège contre les hausses excessives de la pression, et empêche un endommagement des organes en régulant le débit sanguin local (Davis and Hill 1999). En revanche, si cette augmentation de pression est prolongée, les artères subissent des changements structurels connus sous le nom de remodelage vasculaire. Ce remodelage est différent en fonction de la localisation de l'artère mais aussi du stade de la pathologie : le remodelage dit "*eutrophic*" survient dans les artères de résistance dans les

stades précoce et intermédiaire de la pathologie (Mulvany 2012). Ce remodelage est caractérisé par une réduction de la lumière du vaisseau sans modification de l'épaisseur de la paroi vasculaire, et une augmentation du ratio media / lumière du vaisseau. Lors de ce remodelage, les CMLVs ne prolifèrent pas mais se réorganisent uniquement autour de la lumière du vaisseau. Ceci a été confirmé par la réalisation d'expériences en présence d'inhibiteurs de la croissance cellulaire tels que les inhibiteurs de la tyrosine kinase et la MAP kinase (Bakker et al. 2004). Lorsque l'hypertension persiste et devient sévère, un autre type de remodelage s'installe, c'est le remodelage "*hypertrophic*". Il est rencontré dans les grosses artères telle que l'aorte et est caractérisé par un épaissement de la media et une augmentation du ratio media / lumière du vaisseau (Feihl et al. 2006). Ce type de remodelage induit une altération de la MEC et une modulation phénotypique des CMLVs du phénotype contractile au phénotype synthétique (Castro and Tanus-Santos 2013, Lemarie et al. 2010, Hayashi and Naiki 2009). La MEC joue un rôle important dans le phénomène de remodelage vasculaire : sa protéolyse implique un détachement des CMLVs de la matrice et facilite ainsi leur prolifération, leur migration et l'infiltration des cellules inflammatoires dans la paroi artérielle (Briones et al. 2010). Une augmentation de l'activité des métalloprotéases de la matrice (MMPs) dans l'HTA implique une dégradation importante de l'élastine et du collagène, ce qui favorise la migration des CMLs (Belo et al. 2015). L'hydrolyse de l'élastine composant de la MEC conférant une élasticité à l'artère participe également à la rigidité artérielle rencontrée dans le remodelage vasculaire (Briones et al. 2010).

Le remodelage vasculaire dans l'HTA est également associé à une élévation de l'expression des facteurs de croissance tels que le TGF- β_1 (*Transforming growth factor- β_1*) (Sarzani et al. 1989), des substances vasoactives telle que l'angiotensine II (Morishita et al. 1992) et l'augmentation de la production des ERO (Montezano et al. 2015).

L'HTA pulmonaire (HTAP), définie par une pression artérielle moyenne supérieure à 25 mmHg, est causée par des altérations fonctionnelles et structurales des artères pulmonaires. Ces altérations aboutissent à une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires, entraînant une hypertrophie cardiaque droite et à terme une insuffisance cardiaque droite (Hoepfer et al. 2013). Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans cette pathologie sont divers et complexes et les altérations structurales sont associées à une modulation du phénotype des CMLVs, à une dysfonction endothéliale et à une activation des fibroblastes. Dans un premier temps, la différenciation de cellules précurseurs en CMLs conduit à la muscularisation des artères pulmonaires distales qui sont normalement non

musculaires. Par la suite, une hypertrophie et une hyperplasie des CMLs ainsi que l'accumulation des protéines de la MEC augmentent l'épaisseur de la media dans les artères pulmonaires musculaires. Enfin, des lésions intimaes se développent suite à la migration CMLs de la media vers l'intima, et à l'accumulation des cellules inflammatoires et des constituants de la MEC (pour revue (Morrell et al. 2009)).

La dysfonction endothéliale est responsable d'une libération accrue de facteurs paracrines tels que les facteurs de croissance qui stimulent la prolifération des CMLVs pulmonaires et les chimiokines qui recrutent les cellules inflammatoires circulantes (Eddahibi et al. 2006, Sanchez et al. 2007). L'exposition de CMLs isolées d'artère pulmonaire à un milieu de culture de CEs de ce type d'artère induit leur prolifération, cet effet étant amplifié lorsque les CEs proviennent de patients atteints d'une HTAP (Eddahibi et al. 2006). L'un des facteurs dérivés de l'endothélium pouvant être impliqué dans la modulation phénotypique des CMLs de l'artère pulmonaire est l'endothéline-1. En effet, la concentration plasmatique de ce peptide est augmentée chez les patients atteints d'HTAP (Allen et al. 1993) et il a été rapporté que l'endothéline-1 stimule la prolifération des CMLs de l'artère pulmonaire (Hassoun et al. 1992).

4. Facteurs modulants le phénotype de la CMLV

En raison du rôle de la prolifération et de la migration des CMLVs dans le développement de certaines pathologies vasculaires, plusieurs études se sont intéressées à l'étude des facteurs favorisant la modulation phénotypique et le passage de ces cellules du phénotype contractile au phénotype synthétique. Ces modifications phénotypiques, observées *in vivo* dans certains contextes pathologiques décrits ci-dessus, peuvent également apparaître *in vitro*, lorsque les CMLVs sont retirées de leur environnement et mises en culture. 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 ainsi un contrôle étroit sur le phénotype des CMLVs (Stegemann et al. 2005, Rensen et al. 2007) (**Figure 5**).

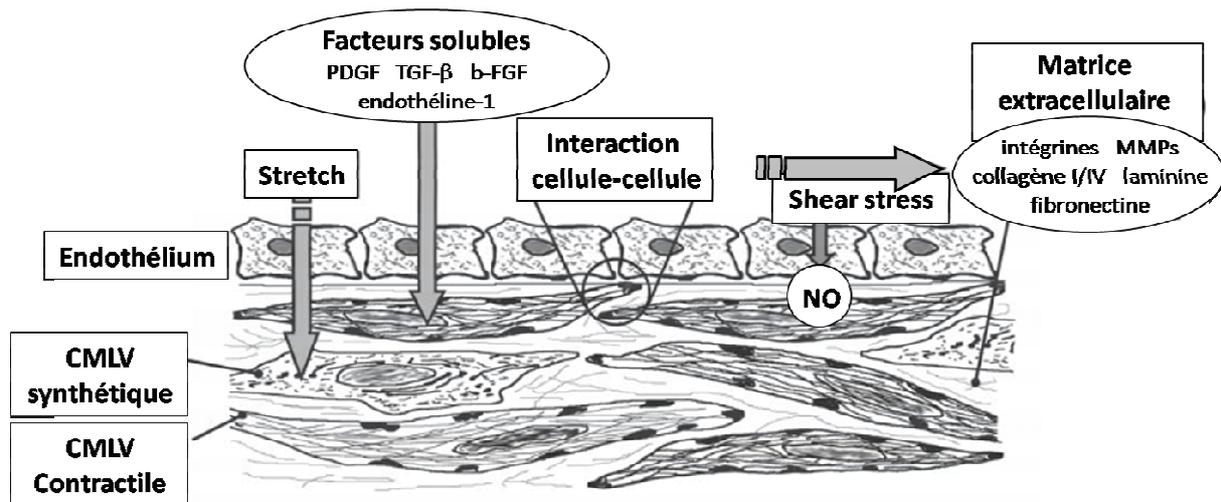


Figure 5 : Facteurs impliqués dans le développement, la différenciation et la modulation phénotypique des CMLVs. Modifié par (Rensen et al. 2007)

a. Les facteurs solubles

L'expression des marqueurs phénotypiques des CMLs peut être modulée par de nombreux facteurs de signalisation, dont certains exercent des effets dépendants du phénotype. On peut citer le PDGF, le TNF- α , le TGF- β , le b-FGF (*Basic fibroblast growth factor*), les IGFs (*Insulin-like growth factor*), l'angiotensine II, l'ET-1 ou encore l'héparine (Pour revue (Rensen et al. 2007)).

Dans les CMLVs adultes, les deux isoformes de PDGFs, PDGF-A et PDGF-B, induisent le phénotype synthétique. Ainsi, une étude a montré que le PDGF diminue l'expression de la SM- α -actine dans les CMLs d'aorte de rat (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 du PDGF-A et du PDGF-B réduit la prolifération et la migration des CMLs à la suite d'une lésion artérielle, réduisant ainsi la formation de la néo-intima (Deguchi et al. 1999, Kotani et al. 2003). Par ailleurs, un autre facteur de croissance, le TGF- β , semble être essentiel pour le maintien du phénotype contractile des CMLs (Wang et al. 2011). Tout comme le PDGF, il joue un rôle dans la migration des précurseurs de CMLs vers les CE et leurs interactions futures, comme l'a révélé la souris déficiente en TGF- β (Sanford et al. 1997). Contrairement au PDGF, le TGF- β module clairement le phénotype des CMLs

adultes vers le phénotype contractile. En effet, le TGF- β 1 augmente les niveaux d'expression de la SM- α -actine, de la SM-MHC et de la calponine dans les CMLs en culture (Hautmann et al. 1997) et le TGF- β 2 augmente l'expression de la SM- α -actine et de la desmine dans les CMLs de porc en culture (Hao et al. 2002).

D'autres protéines sont également capables de moduler le phénotype des CMLs. Il s'agit de l'acide rétinoïque, du TNF- α , de l'angiotensine II et de l'IGF-1. D'une manière intéressante, il a été rapporté que ces facteurs pouvaient induire le phénotype synthétique mais aussi le phénotype contractile et que cette modulation différentielle semble être liée à l'état de différenciation initiale des CMLs (pour revue (Rensen et al. 2007))

b. La matrice extracellulaire (MEC)

Bien que les effets des facteurs biochimiques solubles sur la régulation du phénotype des CMLs a fait l'objet de plusieurs études dans le passé, il semble à présent que la MEC joue un rôle aussi important dans cette modulation.

La MEC est essentiellement composée des différentes isoformes de collagène (principalement le collagène de type I et le collagène de type III), d'élastine et de protéoglycanes. Il a été montré que parmi ces protéoglycanes, l'héparine, jouait un rôle important dans la régulation du phénotype des CMLs. En effet, des études ont montré que cette molécule contribue au maintien du phénotype contractile des CMLVs (Hao et al. 2002, Frid et al. 1997). Le perlecan, un autre protéoglycane, semble également inhiber la prolifération des CMLs (Tran et al. 2004). Son expression est négativement régulée par le PDGF, ce qui affecte la migration des CMLs (Koyama et al. 1998).

Un autre constituant de la MEC, le collagène, contribue également au maintien du phénotype contractile, et d'une manière intéressante, le collagène de type I monomérique active la prolifération des CMLs, contrairement au collagène de type I de forme fibrillaire. Ainsi, une étude a montré que des CMLs cultivées sur ces deux types de collagène montraient des profils d'expression de gènes, codant des protéines de la MEC et du cytosquelette, complètement différents (Ichii 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. Au cours de ce processus, différentes familles de protéases dégradant les composants de la MEC sont augmentées incluant la sérine protéase, la cystéine protéase mais aussi les métalloprotéases de la matrice (Bendeck et al. 1994, Lijnen et al. 1998, Sukhova et al. 1998, Zempo et al. 1994).

Des modifications d'expression des MMPs sont décrites comme jouant un rôle majeur dans le contrôle du processus migratoire des CMLs dédifférenciées (Filippov et al. 2005, Dollery and Libby 2006, 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.

c. Les facteurs mécaniques

In vivo, les CMLVs sont constamment soumises à des contraintes mécaniques qui semblent influencer les caractéristiques phénotypiques de ces cellules, et jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et dans certains processus pathologiques tels que l'athérosclérose et l'HTA.

Il existe deux facteurs mécaniques principaux: (i) les contraintes de cisaillement ou "shear stress", correspondant à la force tangentielle exercée par le flux sanguin directement à la surface des CEs ; et (ii) les contraintes circonférentielles cycliques liées à la pulsativité du flux et de la PA agissant directement sur les CMLVs.

Les forces mécaniques associées au flux sanguin jouent un rôle dans le contrôle du tonus et dans le remodelage de la paroi vasculaires mais aussi dans le développement des plaques d'athérosclérose. Les effets du shear stress sont médiés par l'endothélium qui régule les réponses de la CMLV à ce type de contraintes mécaniques, non seulement par la libération de facteurs endothéliaux tel que le NO mais aussi par des interactions directes entre cellules. Cette modulation dépendante de l'endothélium sera détaillée dans le paragraphe suivant (paragraphe I.E.4.d)

Les CMLs artérielles sont principalement exposées à des contraintes circonférentielles cycliques qui résultent de la PA pulsatile. Les grosses artères répondent passivement aux variations de 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 ainsi le sang en aval. L'élasticité des gros vaisseaux amortit ainsi les variations périodiques de la pression, et adaptent celle-ci au cours du cycle cardiaque dans les petits vaisseaux de résistance moins élastiques.

Les contraintes circonférentielles cycliques sont capables d'influencer le phénotype des CMLs en faveur d'un phénotype contractile. Ainsi, il a été montré que l'exposition de CMLVs néonatales à ce type de contraintes mécaniques augmentait l'expression de la SM-MHC et diminuait celle de la NM-MHC (Reusch et al. 1996). D'autre part, l'exposition *in*

in vitro de segments d'aorte de lapin à une pression intra-luminale faible (10 mmHg) induit une diminution de l'expression protéique de la protéine h-caldesmon, considérée comme un marqueur du phénotype contractile, et cet effet est prévenu par l'application d'une pression intra-luminale physiologique de 80 mmHg (Birukov et al. 1998). En revanche, l'élévation pathologique de la pression intra-murale, telle qu'observée en situation d'HTA, conduit à un épaissement de la media par hypertrophie et/ou hyperplasie des CMLs, particulièrement dans les artères de résistance (Aalkjaer et al. 1987).

Le concept d'une réponse graduée aux différents niveaux de pression auxquels sont exposées les CMLVs est à présent bien établi (Williams 1998) : i) une pression physiologiquement basse conduit à une dédifférenciation des CMLVs ; ii) une pression physiologique maintient leur phénotype quiescent/contractile; et iii) une élévation anormale de la pression comme dans l'HTA conduit à une réponse maladaptative, avec hypertrophie des CMLVs et synthèse accrue de composants de la MEC.

d. L'endothélium

Les CE contrôlent le tonus vasculaire en libérant des facteurs vasoactifs agissant sur les CMLVs (Vanhoutte 1989). Ces facteurs vasoactifs modulent également le phénotype prolifératif des CMLs vasculaires, les facteurs vasorelaxants, tels que le NO et la prostacycline, inhibant la prolifération de ces cellules (Garg and Hassid 1989, Thomae et al. 1995, Nakaki et al. 1991), et les facteurs vasoconstricteurs, tels que l'ET-1, stimulant leur prolifération (Janakidevi et al. 1992).

Afin d'étudier les interactions entre les CE et les CMLVs et d'explorer l'influence de l'endothélium sur les caractéristiques phénotypiques des CMLs, différents systèmes de culture ont été utilisés permettant de réaliser des études dans des systèmes intégrés plus proches de la physiologie *in vivo* : il s'agit de : (1) la co-culture directe dans laquelle les CE sont ensemencées en présence des CMLs préalablement cultivées. La séparation des deux types cellulaires est ensuite réalisée à l'aide de billes supermagnétiques (Heydarkhan-Hagvall et al. 2003) ; (ii) la culture trans-membranaire qui consiste à co-cultiver des CMLs et des CE sur une membrane poreuse, ce qui permet de caractériser l'influence du contact direct entre les deux types cellulaires (Yoshida et al. 1996, Rose and Babensee 2007) ; et (iii) le système de bioréacteur qui consiste à réaliser une construction vasculaire (CMLs-CEs) sur un gel, qui sera ensuite soumis à un flux et à une pression. Grâce à ce dispositif, les conditions physiques,

biochimiques et mécaniques *in vivo* sont reproduites et sont étroitement contrôlées (Williams and Wick 2005, Bulick et al. 2009)

Différentes études menées *in vitro* montrent que les CEs ont tendance à moduler le phénotype des CMLs en faveur d'un phénotype synthétique. Dans l'une de ces études, les CMLs ont été cultivées sur une plaque, et les CEs cultivées sur un support membranaire poreux placé sur la plaque de culture (Yoshida et al. 1996). Ce dispositif permet ainsi de réaliser une co-culture cellulaire avec un milieu de culture commun mais sans contact physique entre les deux types cellulaires. Cette étude a clairement montré que les CEs humaines induisaient la prolifération des CMLVs. Par ailleurs, les auteurs se sont intéressés à l'influence de l'état de confluence des CEs sur cette modulation et ont montré que les CEsensemencées à faible et moyenne densités induisaient la prolifération des CMLs alors que cette modulation phénotypique était perdue lorsque les CEs étaientensemencées à forte densité (Yoshida et al. 1996). Une seconde étude a été réalisée avec des CEs bovines dans deux modèles de co-culture transmembranaires différents, le modèle de co-culture en bicouche de cellules (CEs/CMLs) qui permet le contact physique entre ces deux types de cellules, et un second modèle dans lequel le milieu de culture des CMLs était conditionné par les CEs mais sans contact physique (Fillinger et al. 1997). Cette étude a montré qu'au bout de 7 jours de culture cellulaire, les CEs induisaient une prolifération des CMLVs similaire dans les deux modèles de culture, suggérant ainsi que le processus de modulation phénotypique par les CEs est contrôlé par des facteurs solubles. Cependant, la plupart de ces expériences a été réalisée dans des conditions de culture statique, ne reproduisant pas l'environnement des CEs *in vivo*, confrontées aux contraintes mécaniques de type shear stress.

Dans le souci de reproduire les conditions *in vivo* de contraintes mécaniques, Williams et al (Williams and Wick 2005) ont utilisé un système de bioréacteur, dans lequel les CMLs sont cultivées sur des tubes d'acide polyglycolique et soumises à un flux pulsatile. L'endothélialisation est alors réalisée 10 ou 23 jours suivant l'ensemencement des CMLs, générant ainsi une co-culture de longue durée (15 jours) ou de courte durée (2 jours), respectivement. Ces travaux ont pu confirmer, d'une part, la modulation positive du phénotype synthétique des CMLs par les CEs, et d'autre part, que cette modulation dépend de l'état prolifératif et de la confluence des CEs, tel qu'il a été observé dans l'étude de Yoshida (Yoshida et al. 1996). Ainsi, ces CEs stimulent la prolifération lorsqu'elles sont dans un état non confluent et prolifératif (co-culture à court-terme), mais l'inhibent lorsqu'elles sont dans un état confluent et quiescent (co-culture à long-terme) (Williams and Wick 2005).

L'ensemble de ces travaux montrent la complexité du rôle des CE dans la modulation phénotypique des CMLVs, puisque cette modulation ne dépend pas uniquement de la présence ou de l'absence de ces cellules mais également des conditions qui entourent ces deux types cellulaires et qui ne sont pas toujours facile à reproduire *in vitro*.

e. La densité/confluence des cellules en culture

A ce jour, peu d'études ont évalué l'influence des conditions de culture cellulaire, notamment la densité d'ensemencement des cellules, sur la modulation phénotypique des CMLVs.

Une étude réalisée sur des CMLs isolées de l'aorte de porc et mises en culture, a souligné l'influence de la densité cellulaire sur leur phénotype (Chamley-Campbell and Campbell 1981). Afin de caractériser le phénotype cellulaire, les auteurs de l'étude ont réalisé un marquage FITC (Fluorescein isothiocyanate) de la myosine du muscle lisse, une observation de la cellule en microscopie électronique afin d'identifier la présence de filaments fins et épais du cytosquelette dont l'abondance est caractéristique du phénotype contractile et d'estimer le contenu cellulaire en différents organelles (mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique) pouvant également témoigner du phénotype cellulaire. La capacité proliférative des cellules a également été évaluée par comptage cellulaire à la cellule Malassez.

La mise en culture de ces CMLs isolées de l'aorte de porc induit, après 6-8 jours de culture, une modification phénotypique (du contractile vers le synthétique) et une forte capacité proliférative, qui peut être réversible lorsque les cellules sont ensemencées à une densité intermédiaire (5.10^4 à 10^5 cellules/ml), mais irréversible lorsque les cellules sont ensemencées à une faible densité (10^3 à 5.10^3 cellules/ml). En revanche, lorsque les cellules sont ensemencées à une densité élevée (10^6 cellules/ml), formant très rapidement une monocouche confluyente (en 1 jour), les cellules ne subissent aucune modulation phénotypique et restent indéfiniment dans un état contractile. Cette étude souligne ainsi que la modulation phénotypique observée après la mise en culture des CMLVs est dépendante de la densité d'ensemencement des cellules, qu'elle peut être réversible et contrecarrée lorsque les cellules sont ensemencées à très haute densité.

Par ailleurs, les auteurs ont montré que la modulation phénotypique spontanée de CMLVs ensemencées à une densité intermédiaire était abolie, lorsque ces cellules étaient co-cultivées en présence d'une monocouche de CMLVs, dans des conditions où ces deux cultures

baignaient dans le même milieu mais sans contact direct entre les cellules. Ces données suggèrent donc le rôle d'un facteur soluble produit par les CMLs en état de confluence, plutôt que le contact direct entre les cellules, dans cette modulation phénotypique. De manière intéressante, les auteurs ont également observé des effets similaires inhibiteurs de la modulation phénotypique des CMLVs d'une co-culture de CEs confluentes et de l'héparine, suggérant ainsi que le facteur en question pourrait s'agir de l'héparine.

Vallot et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence le rôle de la confluence cellulaire sur le phénotype cellulaire lors d'une étude menée sur des CMLs isolées d'aorte de rat et mises en culture afin d'étudier l'influence de la prolifération cellulaire sur la signalisation calcique du muscle lisse vasculaire (Vallot et al. 2000). Dans cette étude, le phénotype des cellules est caractérisé par immunomarquage de deux protéines du cytosquelette, l'isoforme 2 de la SM-MHC (SM2), marqueur du phénotype contractile et l'isoforme B de la NM-MHC (NMB-MHC), marqueur du phénotype synthétique. La capacité proliférative de ces cellules a été évaluée par l'étude de l'expression de l'antigène PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*).

Après 5 jours de culture cellulaire à une densité d'ensemencement de $1,4 \cdot 10^4$ cellules/cm², l'expression de la SM2 est fortement diminuée voire abolie, tandis que l'expression de la NMB-MHC est fortement augmentée, témoignant ainsi d'un passage du phénotype contractile au synthétique. Ces cellules expriment également le PCNA témoignant de leur capacité proliférative. Après 12 jours de culture cellulaire, le profil d'expression de la SM2 et de la NMB-MHC reste inchangé, en revanche l'expression du PCNA est réprimée. Ceci suggère que la durée de la culture cellulaire peut influencer la capacité proliférative des cellules sans modifier leur phénotype. Par ailleurs, les auteurs ont également évalué l'influence de la composition du milieu de culture, notamment en sérum, sur l'expression de ces marqueurs. Ainsi, dans les cellules cultivées avec un milieu de culture contenant 10% de FCS (*Fetal calf serum*), la SM2 est absente et la NMB-MHC est fortement exprimée, alors qu'une faible concentration de sérum (0,1 %) permet de maintenir les cellules dans un état contractile, avec le maintien de l'expression de SM2 et une expression faible de la NMB-MHC. D'une manière intéressante, les cellulesensemencées à forte densité (10^5 cellules/cm²) en présence de 10% de FCS, ne subissent pas de modification de phénotype, et leur capacité proliférative est diminuée. Ceci suggère que la densité et le contact cellulaires sont des éléments importants capables d'influencer le phénotype des CMLVs.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux permet de souligner l'influence de la confluence des CMLVs sur leur modulation phénotypique, ainsi que l'importance des conditions de culture cellulaire, notamment le mode d'ensemencement et la densité cellulaire.

II. Voie de signalisation de l'AMPc

L'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (ou AMPc) a été identifié au milieu du siècle dernier (Sutherland and Rall 1958). Ce nucléotide cyclique de faible poids moléculaire est impliqué dans la majorité des grandes fonctions cellulaires (réponse immunitaire, prolifération ou différenciation cellulaire, sécrétion hormonale, contractilité musculaire, apprentissage, mémoire, métabolisme énergétique, exocytose...). Au niveau vasculaire, il régule un grand nombre de processus physiologiques, tels que la prolifération et la migration cellulaires, l'expression génique mais également le couplage excitation-contraction du muscle lisse vasculaire (Koyama et al. 2001, McDaniel et al. 1994).

Très vite après la découverte de ce second messager, les enzymes responsables de sa synthèse, les adénylate cyclases, et de sa dégradation, les phosphodiésterases (PDEs) furent caractérisées (Butcher and Sutherland 1962, Rall and Sutherland 1962). Un grand nombre d'études réalisées durant ces 50 dernières années a permis de mieux comprendre le rôle crucial de l'AMPc dans la réponse cellulaire à de nombreux hormones et neurotransmetteurs. Cependant la découverte récente de nouveaux acteurs impliqués dans la voie de l'AMPc renforce la complexité de ce système, hautement régulé et au cœur d'interactions croisées avec d'autres voies de signalisation.

A. Les adénylates cyclases

Les adénylates cyclases (AC) sont les enzymes responsables de la synthèse de l'AMPc, en catalysant la transformation de l'ATP en AMPc en présence de Mg^{2+} . Les AC présentent une expression ubiquitaire. Dix isoformes d'AC ont été caractérisées depuis 1989, dont 9 membranaires (AC1-AC9) et une soluble (AC10, ou ACs) (Krupinski et al. 1989, Hanoune and Defer 2001).

Les dix isoformes d'AC présentent une grande hétérogénéité dans leur distribution tissulaire et dans leur mode de régulation. Elles sont ainsi classées en cinq groupes en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés et de leurs mécanismes de régulation (Sunahara et al. 1996, Ishikawa and Homcy 1997, Patel et al. 2001). Cette

classification est présentée dans le **tableau 1**, adapté de la publication de Sunahara (Sunahara and Taussig 2002).

Les AC1-AC9 sont des enzymes transmembranaires activées par la sous-unité α_s des protéines G hétérotrimériques. Elles possèdent 2 régions transmembranaires (M1 et M2) alternées par 2 régions cytoplasmiques (C1 et C2 divisées en C1a, C1b et C2a, C2b) (Krupinski et al. 1989). M1 et M2 sont chacune constituées de 6 segments transmembranaires organisés en hélice α . En dépit de leur forte ressemblance de topologie avec des transporteurs et canaux ioniques, leur fonction reste inconnue. Les régions C1a et C2a, homologues, sont bien conservées et forment des hétérodimères constituant le domaine catalytique de l'enzyme avec les sites de fixation de l'ATP et la forskoline, un diterpène extrait de la plante *Coleus forskohlii*. Le domaine C2a contient le site de liaison pour les sous-unités α_s et β/γ des protéines G hétérotrimériques, ainsi qu'un site de phosphorylation pour la PKC. C1a possède un site de liaison pour la sous-unité α_i (AC1, 3, 8, 5, 6). C1b assure le lien entre M2 et C1a, et possède un site de régulation par le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (AC1, 3, 8) et un site de phosphorylation pour la PKA (AC5, 6). Le second domaine non catalytique C2b n'est présent que dans les isoformes AC1, 2, 3, 8 (Pavan et al. 2009) (**Figure 6**).

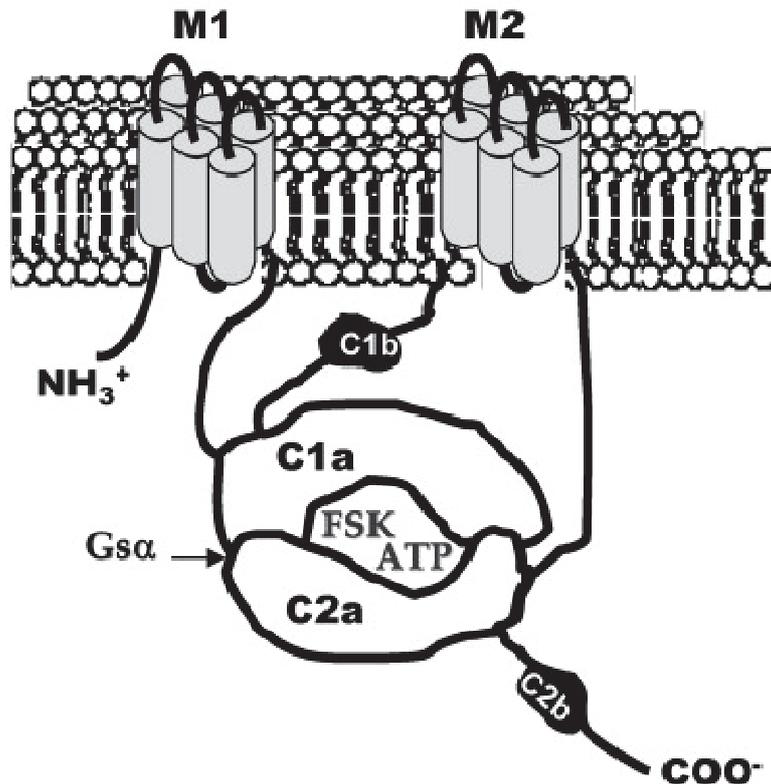


Figure 6 : Structure schématique de l'adénylate cyclase membranaire (AC)
(Modifié (Pavan et al. 2009))

Les adénylates cyclases membranaires (AC) possèdent 2 régions transmembranaires M1 et M2 (chacune constituée de 6 hélices) alternées par 2 régions cytoplasmiques C1 et C2. Ces deux régions contiennent le domaine catalytique et les sites de liaison de la protéine Gα, du complexe Gβγ et de la forskoline et d'autres sites de régulation.

Toutes les isoformes membranaires (AC1-AC9) sont régulées par les sous-unités α et β/γ des protéines G hétérotrimériques. Certaines d'entre elles sont également capables de répondre à d'autres stimuli y compris les protéines Gα_i, les protéines kinases (PKA, PKC, CaM kinase II), les phosphatases (calcineurine), le calcium et le complexe Ca²⁺/CaM (Hanoune and Defer 2001) (**Tableau 1**). Ces enzymes peuvent être également activées directement par la forskoline, à l'exception de l'AC9. L'AC soluble initialement identifiée au niveau des spermatozoïdes et récemment décrite dans les cardiomyocytes, particulièrement au niveau de la mitochondrie, n'est pas sensible à la forskoline, et contrairement aux AC membranaires, n'est pas activée par les protéines G mais par le bicarbonate et le Ca²⁺ (Chen et al. 2012, Di Benedetto et al. 2013).

Tableau 1: Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs modes de régulation. D'après (Sunahara and Taussig 2002).

Groupes	Isoformes	Localisation	Régulation par les protéines G	Effets du calcium	Protéine Kinase
1	AC1	cerveau, médullo-surrénales	Stimulée $G\alpha_s$, Inhibée par $G\alpha_0$ et $G\beta\gamma$	Stimulée par Ca^{2+}/CaM	PKC : stimulation CaMKIV : inhibition
	AC3	épithélium olfactif, cerveau	Stimulée par $G\alpha_s$	Stimulée par Ca^{2+}/CaM	PKC : stimulation CaMKII : inhibition
	AC8	cerveau, poumons, utérus, cœur, testicules, surrénales.	Stimulée par $G\alpha_s$	Stimulée par Ca^{2+}/CaM	
2	AC2	cerveau, poumons, cœur, muscle squelettique	Stimulée par $G\alpha_s$, $G\beta\gamma$		PKC : stimulation
	AC4	cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus	Stimulée par $G\alpha_s$, $G\beta\gamma$		PKC: inhibition
	AC7	ubiquitaire, fortement exprimée dans le cerveau	Stimulée par $G\alpha_s$, $G\beta\gamma$		PKC : stimulation
3	AC5	cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus, surrénales	Stimulée par $G\alpha_s$, Inhibée par $G\beta\gamma$ et $G\alpha_i$	Inhibée par Ca^{2+} .	PKA : inhibition PKC α,ζ : stimulation
	AC6	ubiquitaire	Stimulée par $G\alpha_s$, Inhibée par $G\beta\gamma$ et $G\alpha_i$	Inhibée par Ca^{2+} .	PKA : inhibition PKC : stimulation
4	AC9	Cerveau, muscle squelettique	Stimulée par $G\alpha_s$		
5	AC soluble	Testicules, cœur	Non régulée par protéines G Régulée par HCO_3^- et le Ca^{2+}		

Comme la plupart des types cellulaires, les CMLVs expriment diverses isoenzymes d'AC. Webb a rapporté l'expression des transcrits des isoformes 3, 4, 5, 6 et 8 (Webb et al. 2001) et en 2002, Ostrom a confirmé l'expression des isoformes 3, 5 et 6 au niveau protéique (Ostrom et al. 2002). Les auteurs de ces études se sont surtout focalisés sur l'expression et la localisation de ces enzymes au niveau vasculaire. En utilisant la technique du Western-blot associée au fractionnement membranaire, ils ont pu mettre en évidence une localisation principalement cavéolaire des AC3, 5 et 6 dans les CMLs isolées de l'aorte de rat (Ostrom et al. 2002, Sampson et al. 2004). La fonction différentielle des isoformes d'AC1, AC2, AC5 ou AC6 a été explorée par surexpression de ces isoformes dans des CMLs isolées de l'aorte de rat et par mesure de la production d'AMPc, de la phosphorylation de la protéine VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) témoignant de l'activité de la PKA, de l'activation de la protéine ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), de l'arborisation des CMLs utilisée comme indicateur de la réorganisation du cytosquelette et enfin de leur prolifération (Gros et al. 2006). Dans ces conditions, seule la surexpression de l'AC6 induit l'arborisation des CMLs et la phosphorylation de VASP, tandis que la surexpression de l'AC1 est responsable de la phosphorylation de ERK. Ces travaux suggèrent clairement que les complexes de signalisation des différentes familles d'AC aboutissent à des conséquences fonctionnelles différentes de l'élévation de l'AMPc au niveau vasculaire.

L'équipe de Limon s'intéresse plus particulièrement au rôle fonctionnel de l'AC8 dans les remaniements vasculaires pathologiques tels que l'athérosclérose et la resténose post-angioplastie. En effet, dans les CMLs isolées d'aorte de rat dédifférenciées *in vitro* et présentant ainsi un phénotype sécrétoire, l'augmentation de l'expression de l'AC8, régulée positivement par le complexe Ca^{2+}/CaM , contribue à une sécrétion maximale de phospholipase A2 (Clément et al. 2006), marqueur de l'inflammation associé à une augmentation du risque maladies de l'artère coronaire (Mallat et al. 2005). Une autre étude a montré que l'AC8 était fortement exprimée dans les CMLVs provenant de l'intima de vaisseaux humains présentant des lésions d'athérosclérose par rapport aux CMLVs provenant de la media des mêmes vaisseaux ou d'artères saines. L'AC8 est également sur-exprimée *in vivo*, dans des CML issues de l'artère carotide de rat lésée par gonflement d'un ballonnet, cellules présentant un haut phénotype migratoire (Gueguen et al. 2010).

Ces études montrent que l'expression de l'AC8 est étroitement liée aux propriétés développées par les CMLVs dans l'athérosclérose et lors de la formation d'une néo-intima au

cours de la resténose post-angioplastie. Elle pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de ces pathologies.

B. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de récepteurs transmembranaires capables de lier des messagers de nature diverse, allant de simples photons et ions à des molécules odorantes en passant par des hormones, des acides aminés et des nucléotides. Cette liaison induit alors une cascade de signalisation intracellulaire affectant différents processus physiologiques.

Les RCPGs, en se basant sur l'homologie de séquence et de structure ont été divisés en 5 classes : la classe A de type rhodopsine, la classe B de type sécrétine, la classe C de type glutamate, la classe des récepteurs crépus-grésillés « frizzled » et la dernière classe appelée « adhesion class ». La classe A comporte le nombre le plus important de RCPGs et est elle-même classée en 3 sous-groupes (1a, 1b et 1c). Le sous-groupe 1a comporte les RCPGs des petits ligands tels que les récepteurs β -ARs et les récepteurs à la rhodopsine (Rosenbaum et al. 2009).

Les RCPGs sont constitués de 7 domaines transmembranaires organisés de la manière suivante : l'extrémité N-terminale est exposée à l'extérieur de la cellule ; les sept segments transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (e1, e2 et e3) et trois boucles intracellulaires (i1, i2 et i3) de taille variable ; et l'extrémité C-terminale est située du côté cytoplasmique (Bockaert and Pin 1999).

L'initiation de la cascade de signalisation se produit en réponse à l'interaction du récepteur avec une protéine G hétérotrimérique. A l'état inactif, les 3 sous-unités α , β , et γ constituant la protéine G, sont associées et une molécule de guanosine diphosphate (GDP) liée à la sous-unité α . L'activation du récepteur par un agoniste entraîne une diminution de l'affinité de la sous-unité α pour le GDP, celle-ci échange alors son GDP contre une guanosine triphosphate (GTP) et se dissocie des 2 autres sous-unités. Cette sous-unité α liant le GTP et le complexe $\beta\gamma$ sont sous une configuration active, responsable de la modulation d'effecteur(s). L'activité GTPase (Guanosine triphosphatase) intrinsèque de la sous-unité α permet l'hydrolyse du GTP en GDP et le retour à son état inactif initial. En effet, liée au GDP la sous-unité α se réassocie au dimère β/γ . Ce processus d'inactivation est 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 (Cabrera-Vera et al. 2003, Pierce et al. 2002) (**Figure 7**).

La spécificité et la complexité de la réponse induite par les RCPGs repose sur la grande variété des sous-unités constitutives de ces protéines G hétérotrimériques. Ainsi, 4 familles de protéines G sont distinguées selon la nature de la sous-unité α et de l'effecteur principal ciblé : G_s (stimulatrice de l'AC), $G_{i/o}$ (inhibitrice de l'AC), $G_{q/11}$ (stimulatrice de la phospholipase C) et $G_{12/13}$ (régulatrice du cytosquelette et de certains processus liés au mouvement) (Cabrera-Vera et al. 2003). Tous les sous-types de récepteurs β -ARs sont décrits comme étant couplés à la protéine G stimulatrice G_s menant ainsi à l'activation de l'AC et à la production de l'AMPc (Dixon et al. 1986, Frielle et al. 1987, Emorine et al. 1989). Néanmoins, il a été démontré que dans certaines conditions, les récepteurs β -ARs, particulièrement le récepteur β_3 -AR pourrait être couplé à la protéine G_i (Xiao et al. 1995, Gauthier et al. 1996).

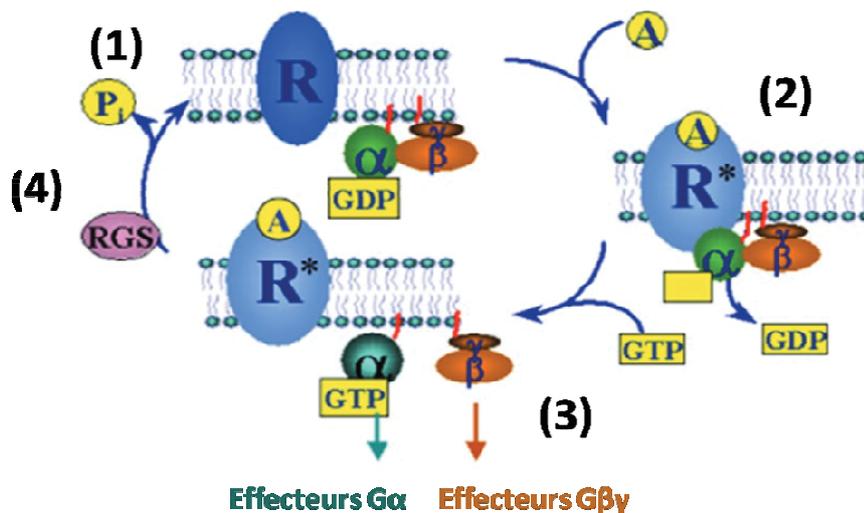


Figure 7: Cycle d'activation/inactivation des protéines-G.
(D'après (Cabrera-Vera et al. 2003))

Un RCPG (R) au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe récepteur-agoniste, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique (sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$) qui va réguler l'activité de divers effecteurs (3) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité GTPase de la sous-unité $G\alpha$ entraîne la réassociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$ (4) et le retour à l'état initial (1).

C. Les effecteurs de l'AMPC

L'AMPC, synthétisée par les AC, est un second messenger pouvant agir sur plusieurs effecteurs cellulaires : La protéine kinase AMPC-dépendante, les canaux CNG : *Cyclic nucleotide gated channels*, le facteur d'échange nucléotidique directement activé par l'AMPC (Epac) et quelques enzymes de la famille des PDEs qui contiennent des sites allostériques aux nucléotides cycliques, en plus de leurs sites catalytiques.

1. La protéine kinase A (PKA)

La PKA est constituée de 2 sous-unités catalytiques (C) liées de façon non covalente à 2 sous-unités régulatrices (R) (Taylor et al. 1990) (**Figure 8**). Dans cette configuration, la PKA est inactive. Les sous-unités régulatrices présentent chacune 2 sites de fixation (A et B) pour l'AMPC. Dans l'état inactif de la PKA, seul le site de liaison B est exposé à la fixation d'une molécule d'AMPC. Lorsqu'elle se produit, cette liaison 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. 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 libèrent l'AMPC et se réassocient avec les sous-unités catalytiques, les inhibant à nouveau (Tasken and Aandahl 2004).

Initialement, 2 classes de PKA (I et II) ont été identifiées selon leur ordre d'élution sur colonne chromatographique échangeuse d'ions. Elles présentent des sous-unités R différentes appelées respectivement RI et RII (Corbin and Keely 1977). Plus tard, grâce à la biologie moléculaire, 4 sous-unités R (RI α , RI β , RII α , RII β) et 4 sous-unités C (C α , C β , C γ et PRKX ou *human X chromosome-encoded protein kinase X*) ont été identifiées (Skalhegg and 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, un peptide nucléaire, le PKI (*protein kinase inhibitor*), se lie à la sous-unité C et inhibe son activité indépendamment 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 du noyau vers le cytoplasme. Les sous-unités catalytiques de retour dans le cytoplasme vont alors former des tétramères de PKA inactifs (Fantozzi et al. 1994).

La localisation subcellulaire de la PKA joue un rôle prépondérant dans le contrôle et la spécificité des effets induits par l'activation de la kinase. En effet, si la limitation de diffusion de l'AMPc dans le cytoplasme permet une compartimentation des signaux cellulaires liés à l'AMPc, celle-ci implique une localisation de la PKA au plus près des protéines cibles effectrices à activer spécifiquement. Ainsi, lorsque la concentration en AMPc augmente au voisinage d'une protéine d'ancrage de PKA (AKAP : *A-Kinase Anchoring Protein*), sa liaison à la sous-unité R libère la sous-unité catalytique C de la PKA qui peut ainsi phosphoryler rapidement et localement le substrat effecteur lié à l'AKAP. Ces protéines d'ancrage assurent donc une grande spécificité et une régulation spatio-temporelle des réponses cellulaires.

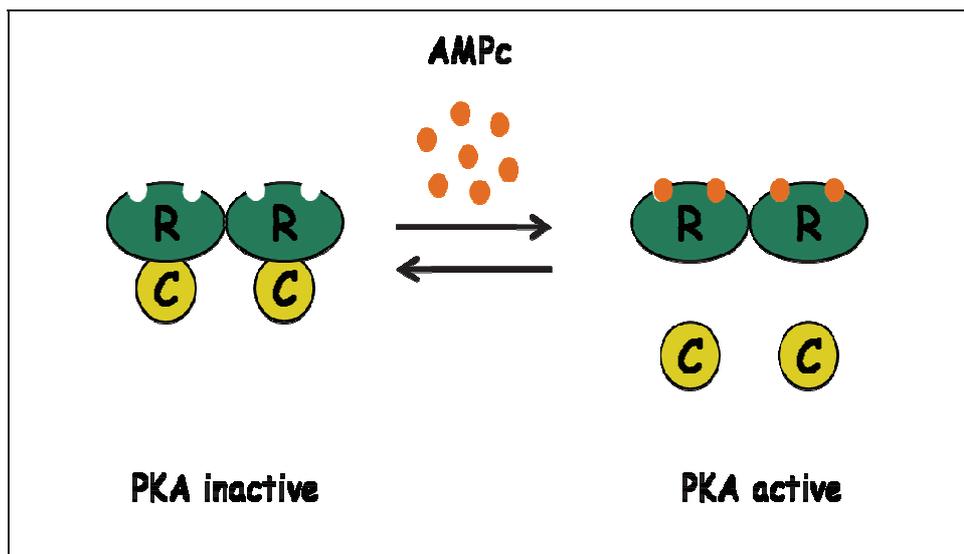


Figure 8 : Représentation schématique de la PKA et de son activation.

La PKA est un hétérotétramère constitué de 2 sous-unités régulatrices (R) et de 2 sous-unités catalytiques (C). La fixation de 4 molécules d'AMPc sur les sous-unités R, induit la dissociation des sous unités C qui phosphorylent spécifiquement des résidus sérine et thréonine au niveau des protéines cibles.

Au niveau vasculaire, il est admis que la PKA soit principalement activée par l'AMPc, ceci conduisant à la phosphorylation de différents substrats cellulaires impliqués dans différents processus physiologiques tels que la relaxation, la migration et la prolifération de la CMLV.

Une élévation de l'AMPc, notamment suite à l'activation des récepteurs β -AR, induit une vasorelaxation. Plusieurs études ont montré que celle-ci est médiée par la PKA qui suite à son activation phosphoryle différents substrats impliqués dans la régulation du tonus musculaire lisse vasculaire. En effet, une corrélation entre le degré de la relaxation et le niveau d'activité de la PKA a été montrée dans l'artère coronaire bovine suite à l'application de l'isoprénaline (Silver et al. 1982) ou de l'adénosine (Silver et al. 1984). D'autres expériences soutiennent le dogme du rôle prépondérant de la PKA dans la relaxation induite par une élévation de l'AMPc, en constatant que l'inhibition pharmacologique de la PKA (par application de H-89) diminue cette réponse relaxante induite par de faibles concentrations d'isoprénaline (Eckly-Michel et al. 1997). Cependant, d'autres études ont suggéré que la PKA n'est pas l'unique médiateur de la vasorelaxation dépendante de l'AMPc et que la PKG pouvait également y jouer un rôle (Lincoln et al. 1990, Komalavilas and Lincoln 1996). Une autre étude a proposé que la relaxation β_2 -adrénergique dans l'aorte de rat, qui n'est que partiellement inhibée par le H-89, fait intervenir la voie de la PKA mais aussi la voie des phosphoinositide 3 kinase (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 and Makhoulf 1995). En effet, la PKG peut également être activée par l'AMPc mais ceci requiert une concentration environ 10 fois plus importante que la concentration en GMPc nécessaire pour activer cette kinase. Il en est de même pour la PKA qui peut également être activée par une forte concentration en GMPc, environ 10 fois plus importante que la concentration d'AMPc nécessaire pour l'activer (Morgado et al. 2012). En revanche, il faut noter que dans la CML, la concentration cytosolique d'AMPc est 10 fois plus élevée que celle du GMPc. Par conséquent, une élévation du niveau d'AMPc pourrait potentiellement activer la PKA et la PKG, alors que le GMPc devrait activer uniquement la PKG (Rembold 1992). Dans des travaux réalisés sur des CMLs de rat, Lincoln et Cornwell ont montré que l'activation de la PKG par l'AMPc conduit à une diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire alors qu'une activation de la PKA par ce second messager conduit uniquement à l'efflux de calcium dans le milieu extracellulaire (Lincoln et al. 1990).

Concernant le rôle de la PKA dans le contrôle de la prolifération des CMLVs, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA inhibe ce processus. Une étude a montré que l'administration d'AMPc ou d'inhibiteurs de PDEs (aminophylline et amrinone) empêche la formation de la néo-intima dans un modèle d'atteinte de l'intégrité vasculaire par gonflement d'un ballonnet chez le rat (Indolfi et al. 1997). L'effet inhibiteur de la prolifération de l'aminophylline est complètement reversé suite à l'inhibition de la PKA. Le même groupe a également montré que le 8-Cl-cAMP, analogue de l'AMPc et activateur de la PKA, inhibe la prolifération des CMLVs *in vitro* et que son administration *in vivo* réduit la formation de la néo-intima (Indolfi et al. 2000). Ces résultats pourraient ainsi apporter une pertinence dans le développement clinique de stratégies pour prévenir la resténose post-angioplastie ou après la pose de stents.

Un autre processus pathologique contribuant à la resténose et à la formation de la néo-intima est la migration des CMLVs. Ce phénomène est également décrit comme inhibé par la voie AMPc/PKA. Une étude a montré qu'un analogue de l'AMPc, activateur sélectif de la PKA (le pCPT-cAMP) diminue, *in vitro*, la migration des CMLs en culture isolées de l'aorte de rat (Yokoyama et al. 2008). Les auteurs ont d'ailleurs montré que dans un modèle murin d'induction de lésion mécanique de l'artère fémorale, l'expression de l'ARNm de certaines sous-unités de la PKA (RII α et C β) diminuait dans cette artère dans les 1 à 4 semaines suivant la lésion, parallèlement à la progression de l'épaississement de la néo-intima.

Ces données suggèrent que la voie AMPc/PKA exerce un rôle vasculoprotecteur majeur en favorisant la vasorelaxation qui serait bénéfique dans un contexte d'hypertension artérielle et en inhibant les processus de prolifération et de migration des CMLVs ce qui limiterait le processus de resténose vasculaire post-angioplastie et la formation de néo-intima.

2. Le facteur d'échange Epac

Le facteur d'échange Epac (*Exchange protein directly activated by cAMP*) ou cAMP-GEF (cAMP-*Guanine nucleotide exchange factor*) appartient à une nouvelle famille de protéines, récemment identifiées comme étant capables de lier directement l'AMPc (de Rooij et al. 1998, Kawasaki et al. 1998) et d'activer les petites protéines G de la famille Ras, Rap1 et Rap2 (Bos 2006). Les protéines Epac constituent ainsi une nouvelle voie de transduction des signaux AMPc indépendante de la PKA, rendant ainsi plus complexe le schéma classique de la signalisation de l'AMPc et ouvrant de nouvelles perspectives quant à la régulation de différents processus cellulaires.

Deux isoformes d'Epac, Epac1 et Epac2, ont été identifiées. Elles sont codées par deux gènes distincts, *RAPGEF3* et *RAPGEF4*, respectivement. *RAPGEF4* génère deux variants d'Epac, un long nommé Epac2A et un court nommé Epac2B présentant des structures très similaires et des domaines hautement conservés (de Rooij et al. 1998, Kawasaki et al. 1998)

Ces protéines se caractérisent par une région N-terminale régulatrice et une région C-terminale catalytique contenant des domaines communs (**Figure 9**) : le domaine d'adressage intracellulaire nommé DEP (*Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin*) ; le domaine de liaison à l'AMPc nommé CNB (*Cyclic nucleotide-binding domain*) et dont la séquence est très proche de celle de la sous-unité R de la PKA ; le domaine REM (*Ras exchange motif*) stabilisant le domaine d'échange du GDP en créant un pont intramoléculaire entre les régions régulatrice et catalytique ; et le domaine GEF responsable de l'activité d'échange du GDP en GTP sur les petites protéines G. La protéine Epac2 se distingue d'Epac1 par la présence, dans sa région régulatrice, d'un second domaine liant l'AMPc, de plus faible affinité que le domaine commun aux deux isoformes et de fonction inconnue (Bos 2006).

Les petites protéines G existent sous 2 états, un état inactif lié à la GDP et un état actif lié à la GTP. Lors d'une augmentation d'AMPc, Epac entraîne une activation des protéines Rap1 et Rap2, en favorisant l'échange du GDP par le GTP (Bos 2006) (**Figure 9**).

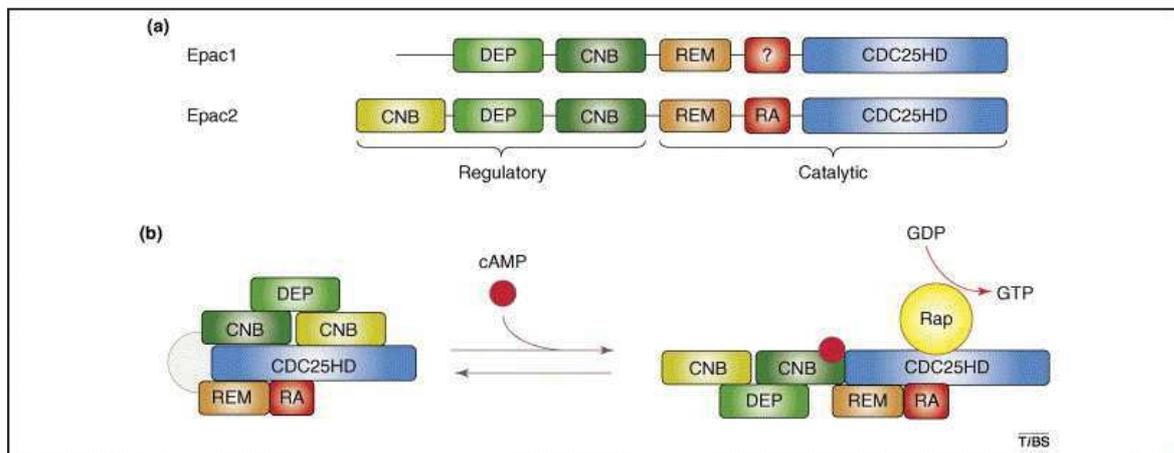


Figure 9 : Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines Epac. (D'après (Bos 2006))

(a) : Structure des protéines Epac. CDC25HD : *CDC25 homology domain*, CNB : *Cyclic nucleotide-binding domain*, DEP : *a dishevelled-Egl-10-Pleckstrin*, RA : *Ras-associating domain*, REM : *Ras exchange motif*. (b) : Mécanisme d'activation de la protéine Epac.

La protéine Epac1 a été décrite dans plusieurs tissus et est particulièrement abondante au niveau cardiaque et rénal (Kawasaki et al. 1998, de Rooij et al. 1998). En revanche l'expression d'Epac2 est confinée au niveau du cerveau, des reins et du pancréas (Kawasaki et al. 1998). La protéine Epac est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires liées à l'AMPc telles que l'adhérence cellulaire, les jonctions intercellulaires, l'exocytose et la sécrétion, la différenciation et la prolifération cellulaires (Morel et al. 2005, Metrich et al. 2008).

Au niveau vasculaire, l'expression de l'isoforme Epac1 est largement décrite dans la CMLV (Purves et al. 2009, Roberts et al. 2013) alors que l'isoforme Epac2 est uniquement décrite au niveau du muscle lisse bronchique (Roscioni et al. 2011). Au niveau de l'endothélium, seule l'isoforme Epac1 a été détectée dans les HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*)(Kooistra et al. 2005) et il a été montré que celle-ci possédait un effet anti-inflammatoire au niveau des cellules endothéliales en inhibant la sécrétion de l'interleukine-6 pro-inflammatoire, par induction d'un régulateur négatif de cette voie, SOCS-3 (*Suppressor of cytokine signaling-3*), mais également en limitant la migration leucocytaire par diminution de la perméabilité vasculaire après activation des intégrines et par stabilisation des jonctions cadhérine-cellules vasculaires endothéliales (Parnell et al. 2012). La protéine Epac jouerait également un rôle dans la régulation de l'angiogenèse, processus important dans le développement de tumeurs et de métastases. Une étude *in vivo* a montré qu'Epac inhibe l'angiogenèse induite par le facteur de croissance endothélial, le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) via l'augmentation de l'expression de la thrombospondine-1(Doebele et al. 2009). Cependant, *in vitro*, Epac a été décrit comme stimulant la prolifération des cellules endothéliales, effet impliqué dans le processus de l'angiogenèse. La contribution d'Epac dans le phénomène de l'angiogenèse reste donc à préciser.

Enfin, en ce qui concerne le rôle d'Epac dans les myocytes vasculaires, il a été décrit que l'utilisation d'un activateur d'Epac, contrairement à celui de la PKA, favorise la migration des CMLVs vers les CEs, ce qui contribuerait à l'épaississement de l'intima et à la formation d'une néo-intima, processus impliqué dans le phénomène de resténose vasculaire (Yokoyama et al. 2008). Cependant, le mécanisme moléculaire exact impliqué dans cet effet demeure inconnu.

Peu d'études ont évalué le rôle d'Epac dans le contrôle du tonus vasculaire. L'équipe de Purves a montré qu'Epac1 était associée à la sous-unité SUR2B (*Sulfonylurea receptor 2B*) du canal potassique dépendant de l'ATP (K_{ATP}), canal impliqué dans la régulation du potentiel de

membrane et donc de la contractilité des CML. Dans les CML isolées d'aorte de rat, l'activation d'Epac par l'AMPC inhibe l'activité du canal K_{ATP} selon un mécanisme dépendant du calcium et de l'activation de la protéine phosphatase 2B, la calcineurine (Purves et al. 2009). Ces auteurs proposent qu'Epac puisse participer ainsi à une régulation positive du tonus vasculaire. Cependant, une étude récente a montré que l'analogue de l'AMPC sélectif d'Epac, le 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, induit la relaxation de la veine porte intacte de lapin et d'artères perméabilisées et sensibilisées au calcium, par un mécanisme impliquant la diminution d'activité de la protéine Rho-A, ce qui limiterait son effet inhibiteur sur l'activité de la MLCP (Zieba et al. 2011). Plus récemment, il a été montré que l'activation de la protéine Epac induit la relaxation des artères mésentériques de rats précontractées à la phényléphrine par l'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux BK_{Ca} . En effet l'application d'un activateur d'Epac augmente la fréquence des *sparks* calciques dans les CMLVs. Cette augmentation localisée de la concentration de Ca^{2+} cytosolique active alors les BK_{Ca} , responsables d'une hyperpolarisation de ces cellules (Roberts et al. 2013).

3. Les canaux CNG "Cyclic nucleotide gated channels"

Ces canaux CNG sont des canaux activés directement par l'AMPC et le GMPc, suite à leur liaison sur un site de liaison situé sur la partie C-terminale du canal. Ce sont des canaux cationiques non sélectifs, perméants aussi bien aux cations bivalents (Ca^{2+}) qu'aux cations monovalents (Na^+) (Kaupp and Seifert 2002). Ces canaux ont longtemps été considérés comme étant spécifiques de la transduction sensorielle des cellules rétinienne et olfactives. Cependant, ces canaux ont une distribution tissulaire plus répandue, et sont exprimés dans le cœur, l'aorte, les reins, et la rate (Biel et al. 1994, Ding et al. 1997). Plusieurs groupes ont mis en évidence l'expression de l'ARNm codant différentes isoformes de canaux CNG, mais également l'expression protéique de ces canaux, incluant le CNGA1, le CNGA2 et le CNGA3, au niveau vasculaire, en particulier au sein de la CE (Yao et al. 1999, Wu et al. 2000, Zhang et al. 2002, Cheng et al. 2003). L'expression de ces différentes isoformes dépend de l'espèce animale et du lit vasculaire.

L'ARNm codant les canaux CNGA1 a été détecté dans les CEs et les CMLs de l'aorte et de l'artère mésentérique de rat (Yao et al. 1999). L'expression de l'ARNm et de la protéine du canal CNGA2 a été également détectée au niveau de l'endothélium et du muscle lisse des artères coronaires et cérébrales humaines (Cheng et al. 2003).

Le rôle fonctionnel des canaux CNG a été principalement exploré au niveau endothélial. Ainsi, il a été montré que le traitement de CEs d'artères pulmonaires de porc par un donneur de NO induit une augmentation de l'expression des canaux CNGA2, ces derniers étant alors impliqués dans l'augmentation de l'entrée du calcium dans la cellule. (Zhang et al. 2002). Une seconde étude a montré que les canaux CNG étaient capables d'augmenter l'entrée de Ca^{2+} et de Na^+ dans la CE de l'artère pulmonaire de rat suite à leur activation par le GMPc. Cette production de GMPc était consécutive à l'activation de la NOS, elle-même activée suite à l'influx de calcium via l'activation des *store operated calcium entry* (SOCE) (Wu et al. 2000).

Ces deux études suggèrent un rôle des canaux CNG dans le contrôle de l'influx et des concentrations intracellulaires de calcium de la CE. Cependant, il faut noter que les auteurs ont utilisé des inhibiteurs pharmacologiques de ces canaux non sélectifs, à savoir le *L-cis*-diltiazem et le LY-83583, capables d'inhiber également les LTCCs et la guanylate cyclase soluble, respectivement. Aussi, ces résultats mériteraient d'être confirmés, l'utilisation d'une autre approche semble alors nécessaire.

Dans une autre étude, les auteurs ont employé une approche génétique par de l'utilisation de l'ARN interférant spécifique du canal CNGA2. Cette étude a pu montrer que l'adrénaline et l'isoprénaline, par l'activation des récepteurs β_2 -ARs sont capables d'induire un influx de Ca^{2+} dans les CEs en culture et que celui-ci est fortement diminué par l'application du *L-cis*-diltiazem, le LY-83583 et par l'ARN interférant spécifique du canal CNG2. De plus, des expériences fonctionnelles sur des anneaux aortiques de souris ont montré que l'inhibition des canaux CNG par le *L-cis*-diltiazem réduit la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. L'ensemble de ces résultats montrent bien que les canaux CNG, en particulier le canal CNGA2 est celui responsable de l'influx calcique et de la vasorelaxation consécutifs à l'activation des récepteurs β_2 -ARs (Shen et al. 2008). Les canaux CNGA2 semblent également jouer rôle dans l'influx calcique et dans la vasorelaxation induits suite à l'activation des récepteurs AT_{2B} de l'adénosine (Cheng et al. 2008).

Enfin, Une étude plus récente s'est intéressée au rôle des canaux CNG dans la réponse contractile des CMLVs (Leung et al. 2010). Ainsi, il a été montré que la vasoconstriction des artères mésentériques induite par l'U46619, un analogue du thromboxane A2 (TxA2), nécessite un influx de calcium extracellulaire. Cette vasoconstriction est partiellement abolie par l'application de la nifédipine, un inhibiteur des LTCCs, et la constriction résiduelle est quant à elle inhibée par les inhibiteurs sélectifs des canaux CNG, le *L-cis*-diltiazem et le LY-83583. De plus, sur des CMLs isolées à partir de l'aorte de rat, l'application de l'U46619

induit une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, cette réponse est abolie dans environ 50% des cellules traitées au *L-cis*-diltiazem. Les résultats de cette étude suggèrent donc un rôle fonctionnel des canaux CNG dans l'induction de la vasoconstriction artérielle par l'analogue du TxA2.

D. Dégradation de l'AMPc

En 1962, Butcher et Sutherland ont décrit l'activité des PDEs des nucléotides cycliques comme étant les enzymes responsables de l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc en 5'-AMP et 5'-GMP, respectivement (Butcher and Sutherland 1962). Ces enzymes jouent un rôle majeur dans la régulation des concentrations intracellulaires de ces deux seconds messagers, AMPc et GMPc, eux-mêmes impliqués dans la régulation d'une myriade de processus physiologiques.

Chez les mammifères, ces enzymes sont regroupées en 11 familles (PDE1 à PDE11) qui se distinguent par le gène codant pour ces protéines, leur structure, leurs propriétés enzymatiques (affinité pour l'AMPc et le GMPc, propriétés catalytiques), leurs propriétés pharmacologiques et leurs mécanismes de régulation, ainsi que leurs fonctions cellulaires (**Figure 10**). Trois familles hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE4, 7 et 8), trois autres sont spécifiques du GMPc (PDE5, 6 et 9) et les autres familles hydrolysent les 2 seconds messagers (PDE1, 2, 3, 10 et 11). Chaque famille de PDEs est codée par 1 à 4 gènes, avec au total, 21 gènes identifiés à l'heure actuelle, ces gènes générant près de 100 iso-enzymes, par des processus transcriptionnels ou post-transcriptionnels par épissage alternatif (Maurice et al. 2014).

Dans mes travaux de thèse, je me suis intéressée aux PDEs hydrolysant l'AMPc (PDE-AMPc) dans la CMLV. Trois familles principales ont été décrites comme étant actives, la PDE1, la PDE3 et la PDE4 (Johnson-Mills et al. 1998, Palmer and Maurice 2000, Zhai et al. 2012). La PDE2, quant à elle, est exprimée dans les CEs de certains lits vasculaires (Sadhu et al. 1999). Le profil d'activité de ces enzymes est différent selon l'espèce animale, le lit vasculaire mais également le phénotype de la CMLV (Maurice et al. 2003).

L'étude fonctionnelle des nouvelles isoformes de PDEs-AMPc (PDE7, PDE8, PDE10 et PDE11) est limitée par le développement d'outils pharmacologiques adaptés. Néanmoins, l'expression de l'ARNm de ces enzymes a été explorée dans certaines études. En comparant l'expression de l'ARNm des PDE1 à PDE10 dans les CMLs d'artères systémiques et pulmonaires de rat, Phillips et son équipe (Phillips et al. 2005) ont montré que la PDE7 était exprimée dans les différents types cellulaires étudiés, que l'expression des transcrits des

PDE8 et PDE9 variaient selon le lit vasculaire, alors que la PDE10 n'était détectée dans aucun de ces tissus vasculaires.

1. Structure, régulation et expression des PDEs

Les PDEs de mammifères partagent une organisation structurale commune, constituée d'un domaine catalytique situé près de l'extrémité C-terminale et d'un domaine régulateur localisé au niveau de l'extrémité N-terminale (Beavo 1995). Le domaine catalytique est hautement conservé : il présente 65% d'homologie de séquence en acides aminés au sein d'une même famille et 25 à 52% d'homologie de séquence d'une famille à une autre. Le domaine régulateur est spécifique à chaque famille et régule l'activité catalytique et la localisation subcellulaire des PDEs. Ainsi, ce domaine régulateur se caractérise pour la famille PDE1 par deux domaines de liaison au complexe Ca^{2+} -CaM, pour les familles PDE2, 5, 6, 10 et 11, par des domaines de liaison au GMPc appelés domaines GAF pour *cGMP-binding PDEs*, *adenylate cyclase*, *fh1A*, pour la PDE4, des régions conservées appelées UCR pour *upstream conserved regions*, et pour la PDE8, par un domaine PAS (nom de 3 protéines connues pour contenir ce domaine : *period*, *arylhydrocarbon receptor nuclear translocator*, *single minded*). Le domaine régulateur peut également contenir des sites de phosphorylation, de dimérisation, ou d'adressage (**Figure 10**) (Conti and Beavo 2007).

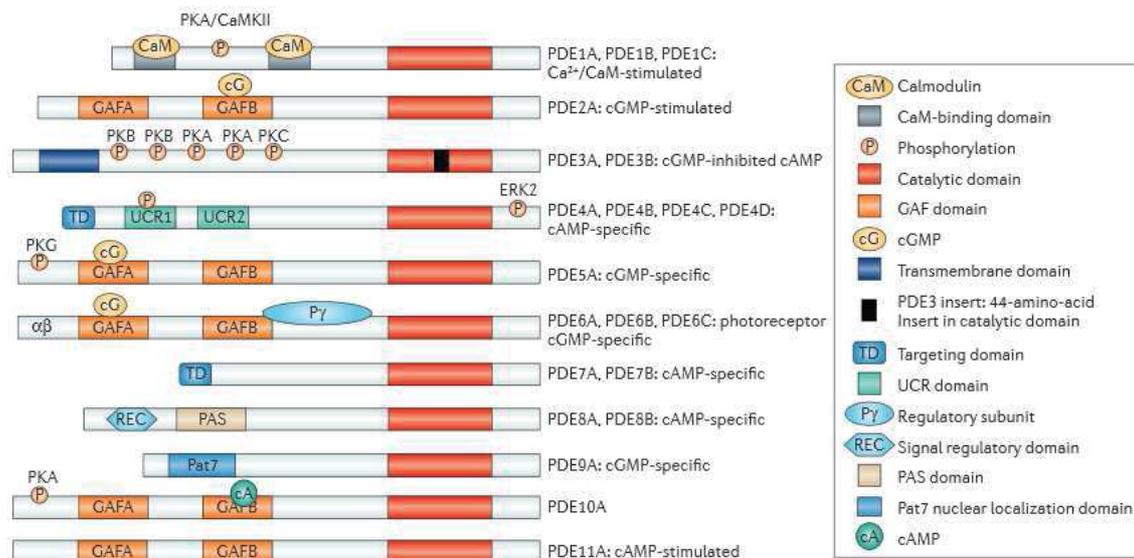


Figure 10 : Organisation des 11 familles de PDEs : représentation schématique de leur structure. (D'après (Maurice et al. 2014)).

Dans la partie C-terminale de toutes les PDEs, le domaine catalytique conservé (rouge) présente 25 à 52% d'homologie de séquence en acides aminés d'une famille à une autre. Les 11 familles se distinguent par leur domaine régulateur N-terminal. A droite de chaque structure représentative d'une famille de PDEs, sont indiquées les isoformes de PDEs composant chacune de ces familles, et leur caractéristique principale.

a. Les PDEs de type 1

Cette famille de PDEs a été l'une des premières découverte (Stoclet et al. 1988). Elle a été d'abord isolée à partir de tissus animaux, en particulier bovins, et caractérisée par sa propriété biochimique unique d'être stimulée par le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ d'où son nom "PDE activée par le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ". La PDE1 est l'unique famille de PDEs pouvant être régulée directement par le Ca^{2+} , constituant ainsi un lien de régulation intéressant entre les nucléotides cycliques et le Ca^{2+} intracellulaire (Kakkar et al. 1999). À ce jour, trois isoformes ont été découvertes (PDE1A, PDE1B et PDE1C). Elles sont le produit de 3 gènes distincts. Les progrès de la biologie moléculaire ont également permis la découverte de nombreux variants de cette enzyme. Comme la plupart des familles de PDEs, la structure primaire de la PDE1 est formée d'un domaine catalytique conservé en position C-terminale et d'un domaine régulateur en position N-terminale présentant 2 domaines de liaison au complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et un site de phosphorylation pour la PKA et la CaMKII. Il est également connu que ces enzymes peuvent créer des dimères (Beavo et al. 2007).

Les 3 isoformes de PDE1 présentent des propriétés enzymatiques différentes, de par leur spécificité de substrat pour l'AMPc et le GMPc et leur affinité pour le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. En effet, les PDE1A et PDE1B hydrolysent préférentiellement le GMPc avec des valeurs de constante de Michaelis (K_m) 27-42 fois et 4-8 fois plus faible pour le GMPc que l'AMPc, respectivement. La PDE1C quant à elle présente des valeurs de K_m à peu près égales pour les deux nucléotides et n'affiche donc pas de préférence de substrat. La liaison du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ modifie la conformation de la PDE1 et permet ainsi de l'activer, il augmente sa vitesse initiale maximale de réaction (V_{\max}) pour l'hydrolyse des nucléotides cycliques sans modifier son K_m (Beavo et al. 2007).

La PDE1 est exprimée dans le cerveau, le poumon, le cœur et le ML. Il existe cependant une distribution spécifique des différentes isoformes de PDE1 qui semble contribuer à la régulation de fonctions cellulaires distinctes (Keravis and Lugnier 2012). Initialement, l'activité de la PDE1 a été décrite dans le cytosol mais il a été récemment montré que la PDE1A est également exprimée dans le noyau où elle contribuerait à la régulation des facteurs de transcription. Cette localisation différentielle contribuerait ainsi à la compartimentation de la signalisation de l'AMPc (Nagel et al. 2006).

Au niveau vasculaire, les trois isoformes de PDE1 ont été identifiées (**Tableau 2**), et l'activité de cette enzyme est associée à la CML et non pas à la cellule endothéliale (Lugnier and Schini 1990, Kishi et al. 1992). D'une manière intéressante, son expression est très variable selon l'espèce, le lit vasculaire, mais aussi le phénotype cellulaire (quiescent ou prolifératif). En effet, une étude a montré que les CMLs isolées à partir de l'aorte humaine et de singe expriment la PDE1A et la PDE1B, alors que les CMLs isolées à partir de l'aorte de rat n'expriment que la PDE1A (Rybalkin et al. 1997). La PDE1C quant à elle est absente dans les cellules humaines quiescentes mais son expression est induite lorsque ces cellules acquièrent un phénotype prolifératif en culture. Ainsi, l'expression de l'ARNm codant l'isoforme PDE1C est fortement augmentée dans les CMLs synthétiques en culture, isolées à partir d'aorte de rat et d'aorte humaine (Cai et al. 2015).

b. Les PDEs de type 3

La PDE3 est codée par deux gènes différents : *PDE3A*, codant pour 3 isoformes (PDE3A1, PDE3A2 et PDE3A3) et *PDE3B* codant pour une seule isoforme (PDE3B1) (Wechsler et al. 2002). Une particularité de cette famille est la présence d'un insert de 44 acides aminés dans le domaine catalytique dans la région C-terminale, qui contribue à son activité catalytique, et

à sa sensibilité au GMPc (He et al. 1998, Manganiello and Degerman 1999). La structure des différentes iso-enzymes de PDE3 (PDE3A1, PDE3A2, PDE3A3 et PDE3B) est proche mais diffère par la présence ou non de domaines NHR1 et NHR2 (*N-terminal hydrophobic region*) au niveau de leur région N-terminale. Ces domaines sont importants pour l'adressage et la localisation membranaire de ces enzymes (Wechsler et al. 2002).

L'isoforme PDE3A1 contient deux domaines NHR1 et NHR2, responsables de la localisation exclusivement membranaire de celle-ci, et 3 sites de phosphorylation pour la PKA et la PKB. La PDE3A2 contient uniquement le domaine NHR2 et deux sites de phosphorylation pour la PKA. Elle a été identifiée dans la fraction membranaire et la fraction cytosolique. La PDE3A3 ne contient ni domaine NHR, ni site de phosphorylation et est purement cytosolique (Zaccolo and Movsesian 2007) (**Figure 11**). Les sites de phosphorylation sont importants pour la régulation de l'activité de l'enzyme et des interactions protéine-protéine (Wechsler et al. 2002). La PDE3B présente une structure très similaire à celle de la PDE3A1 avec un domaine NHR1 plus long que celui de la PDE3A1. Elle est retrouvée associée à la membrane (Yan et al. 2007) et peut être phosphorylée par la PKA ou la PKB et probablement par la PI3K (Movsesian 2002). Ainsi, les PDE3 ont été décrites dans le compartiment cytosolique et associées à différentes membranes, telles que la membrane plasmique, et les membranes d'organites intracellulaires tels que le RS, l'appareil de Golgi, et le noyau (Lugnier 2006). Les formes cytosoliques sont générées par coupure protéolytique au niveau du domaine N-terminal, par l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription, ou par épissage de l'ARN messager (Kasuya et al. 1995).

La PDE3 se distingue également par sa forte affinité pour l'AMPc et le GMPc. En effet, cette enzyme hydrolyse ces deux seconds messagers avec des valeurs de K_m très faibles (0,2 μM pour l'AMPc et 0,1 μM pour le GMPc) et une V_{\max} 4-10 fois plus importante pour l'hydrolyse de l'AMPc que le GMPc (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. Ainsi, certains effets biologiques du GMPc endogène pourraient être la conséquence de l'inhibition de la PDE3 responsable d'une augmentation des concentrations d'AMPc intracellulaire et d'une activation de la PKA ou d'autres effecteurs de l'AMPc. Les PDE3 sont activées lorsqu'elles sont phosphorylées par la PKA ou par la PI3K (Manganiello and Degerman 1999), et leur activité peut être augmentée suite à une élévation des concentrations d'AMPc intracellulaire dans différents types cellulaires, y compris dans les

CMLs d'aorte humaine et de rat en culture (Rose et al. 1997, Liu and Maurice 1998, Palmer and Maurice 2000).

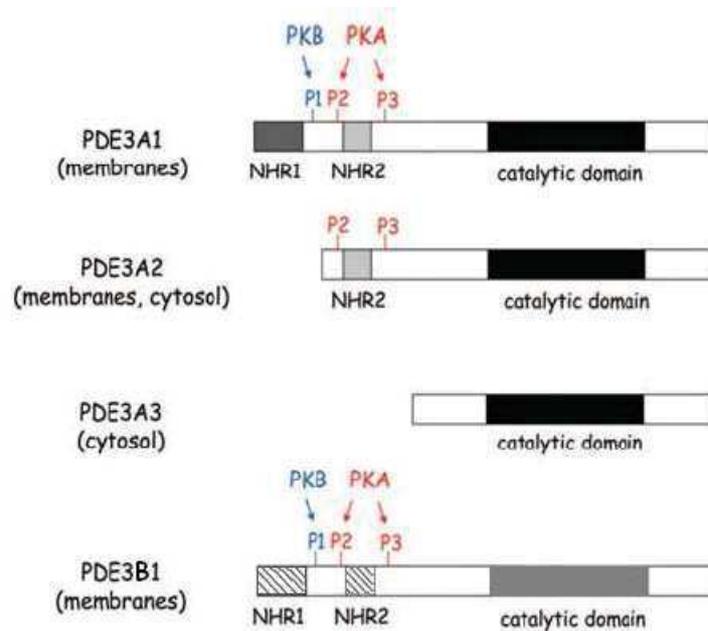


Figure 11: Représentation schématique de la structure des isoformes de PDE3.
(Modifié de (Zaccolo and Movsesian 2007)).

La structure des isoformes de PDE3 diffère par la présence ou non de domaines NHR (*N-terminal hydrophobic region*), et de sites de phosphorylation par la PKA et la PKB : P1, P2, P3.

La PDE3A est principalement exprimée dans le cœur, les plaquettes, les CMLs vasculaire, bronchique et gastro-intestinal, et les oocytes, tandis que la PDE3B est particulièrement exprimée dans les adipocytes, les hépatocytes et les spermatocytes (Reinhardt et al. 1995, Keravis and Lugnier 2012). Des études réalisées sur le CMLVs ont identifié la présence de la PDE3A et de la PDE3B dans le cytoplasme et dans les fractions membranaires, respectivement (Liu and Maurice 1998), suggérant que ces deux isoformes de PDE3 régulent des pools d'AMPc différents.

Il semble également que ces deux isoformes régulent des fonctions cellulaires différentes, car leurs expressions varient selon le phénotype des CMLVs (contractile ou synthétique) (Maurice et al. 2003, Dunkerley et al. 2002). En effet, bien que les activités PDE3 et PDE4 représentent la majeure partie de l'activité de PDE-AMPc au niveau vasculaire (Polson and Strada 1996, Rose et al. 1997, Zhai et al. 2012), une différence relativement importante dans

les activités respectives de ces deux familles PDEs a été rapportée dans les deux phénotypes des CMLVs (contractile et synthétique) : en effet, il a été montré une diminution de l'activité de la PDE3 et notamment une diminution de l'expression de l'isoforme PDE3A, l'expression de l'isoforme PDE3B étant inchangée, dans le phénotype synthétique (CMLVs d'aorte de rat et CMLVs d'aorte humaine mises en cultures), alors que l'activité de la PDE4 est similaire dans les deux phénotypes cellulaires (Dunkerley et al. 2002)(**Tableau 2**).

c. Les PDEs de type 4

Les PDE4, également appelées "PDEs spécifiques de l'AMPC", constituent la plus grande famille de PDEs et hydrolysent spécifiquement l'AMPC. Elles sont codées par 4 gènes différents, *PDE4A*, *PDE4B*, *PDE4C* et *PDE4D*, conduisant à de nombreuses isoformes par épissage alternatif (**Figure 12**). Les PDE4 peuvent être distinguées des autres familles de PDEs hydrolysant spécifiquement l'AMPC (telles que la PDE7 et la PDE8) par leur sensibilité à des inhibiteurs sélectifs tels que le rolipram, et la présence de domaines UCR au niveau de la région régulatrice N-terminale. Ainsi, les différentes isoformes de PDE4 sont classées en 4 groupes en fonction de la taille de la partie N-terminale : les « formes longues », possédant 2 domaines UCR (UCR1 et UCR2) ; les formes courtes contenant uniquement UCR2 ; les formes super-courtes ne comportant que la moitié du domaine UCR2 ; et les formes mortes-courtes sans domaine UCR et présentant alors une unité catalytique inactive (Houslay et al. 2007) (**Figure 12**). Ces domaines UCR régulent directement le site catalytique des PDE4 et interviennent dans les processus de dimérisation (Omori and Kotera 2007). Ils interviennent également dans la localisation subcellulaire de la protéine car ils constituent le siège d'interaction avec les protéines AKAP (Dodge-Kafka et al. 2005).

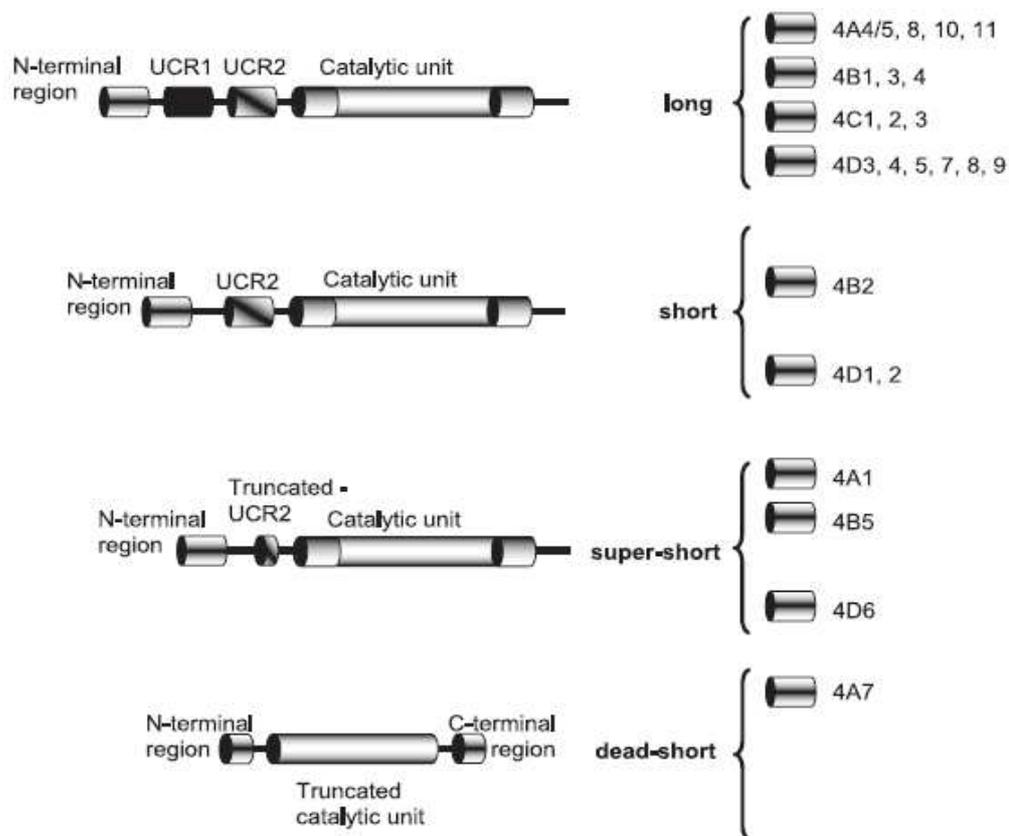


Figure 12 : Caractéristiques structurales des 4 groupes de PDE4.

D'après (Houslay et al. 2007)

Les isoformes de PDE4, résultant de l'épissage alternatif de 4 gènes différents (*PDE4A*, *4B*, *4C* et *4D*), sont classées en 4 groupes en fonction de la taille de leur région N-terminale : les formes longues, les formes courtes, les formes super-courtes et les formes mortes-courtes. UCR : *Upstream conserved region*

Chez l'Homme, l'isoforme PDE4A est ubiquitaire et son expression est relativement élevée au niveau du cerveau. Chez le rat, elle est surtout exprimée dans les neurones, et dans le système olfactif. L'expression des différents variants de cette enzyme est tissu-spécifique (Omori and Kotera 2007). Les PDE4B sont également largement exprimées dans différents tissus notamment dans les cellules immunitaires. Les PDE4D sont également ubiquitaires avec une forte expression dans plusieurs tissus. Quant à la PDE4C, elle est exprimée dans différents tissus mais son expression protéique n'est pas bien explorée par manque d'anticorps fiable (Omori and Kotera 2007).

Les CMLs contractiles isolées à partir de différentes artères humaines et de rat expriment le variant PDE4B2 ainsi que de nombreux variants de PDE4D (PDE4D3, PDE4D5, PDE4D7, PDE4D8 et PDE4D9) (Maurice et al. 2003). L'immuno-précipitation sélective des PDE4A, PDE4B et PDE4D montre une activité catalytique majoritaire de la PDE4D (Liu et al. 2000, Liu and Maurice 1999). Cependant, l'activité enzymatique des PDE4 est différente entre les deux phénotypes des CMLs. Ainsi, l'activité PDE4 représente environ 35% de l'activité PDE-AMPC dans les CMLVs d'aorte de rat possédant un phénotype contractile et environ 75% dans ces mêmes cellules en culture ayant acquis un phénotype synthétique (Rybalkin et al. 2002, Dunkerley et al. 2002). Cette différence s'explique essentiellement 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 and Maurice 2002) (**Tableau 2**).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'une élévation de l'AMPC provoque une augmentation de l'expression et de l'activité de différentes isoformes de la PDE4D, assurant un rétrocontrôle négatif de la signalisation de l'AMPC par augmentation de sa dégradation (Liu and Maurice 1999, Liu et al. 2000, Tilley and Maurice 2002).

Tableau 2 : Expression des principales isoformes de PDEs-AMPC dans les différents phénotypes du muscle lisse vasculaire.

Familles de PDEs	Isoformes de PDEs	Phénotype	Espèce	Lit vasculaire
PDE1	1A	Contractile	Rat	Aorte, artères mésentériques (Nagel et al. 2006, Giachini et al. 2011).
		Synthétique	Rat Singe	Aorte (Rybalkin et al. 1997, Zhai et al. 2012, Nagel et al. 2006).
	1B	Contractile	Rat	Aorte, artères mésentériques (Giachini et al. 2011)
		Synthétique	Singe	Aorte (Rybalkin et al. 1997)
	1C	Contractile	Rat	Aorte, artères mésentériques, pulmonaires, rénales, coronaires (Giachini et al. 2011, Phillips et al. 2005).
		Synthétique	Homme Rat	Aorte (Rybalkin et al. 1997, Rybalkin et al. 2002, Cai et al. 2011, Cai et al. 2015, Zhai et al. 2012)
PDE3	3A	Contractile	Rat	Aorte, artères pulmonaires, rénales, coronaires (Dunkerley et al. 2002, Phillips et al. 2005, Zhao et al. 2008).
		Synthétique	Homme Rat	Aorte (Dunkerley et al. 2002, Zhai et al. 2012, Palmer and Maurice 2000, Liu and Maurice 1998, Zhao et al. 2008).
	3B	Contractile	Rat	Aorte, artères pulmonaires, rénales, coronaires (Dunkerley et al. 2002, Phillips et al. 2005).
		Synthétique	Homme, Rat	Aorte (Dunkerley et al. 2002, Zhai et al. 2012, Palmer and Maurice 2000, Liu and Maurice 1998).

PDE4	4A	Contractile	Rat	Aorte, artères pulmonaires, rénales, coronaires (Phillips et al. 2005).
		Synthétique	Rat	Aorte (Zhai et al. 2012).
	4B	Contractile	Rat	Aorte, artères pulmonaires, rénales, coronaires (Liu and Maurice 1999, Liu et al. 2000, Phillips et al. 2005, Zhao et al. 2008).
		Synthétique	Rat	Aorte (Liu and Maurice 1999, Liu et al. 2000, Zhai et al. 2012, Zhao et al. 2008).
	4C	Contractile	Rat	Aorte, artères rénales (Phillips et al. 2005).
	4D	Contractile	Rat	Aorte, artères pulmonaires, rénales, coronaires (Liu and Maurice 1999, Liu et al. 2000, Phillips et al. 2005).
		Synthétique	Rat	Aorte (Liu and Maurice 1999, Liu et al. 2000, Zhai et al. 2012).
	PDE7	7A	Contractile	/
Synthétique			Rat	Aorte (Zhai et al. 2012).
7B		Contractile	/	/
		Synthétique	Rat	Aorte (Zhai et al. 2012).
PDE8	8A	Contractile	/	/
		Synthétique	Rat	Aorte (Zhai et al. 2012).
	8B	Contractile	/	/
		Synthétique	/	/

2. Rôle des PDEs dans la régulation de la fonction vasculaire

a. Rôle de la PDE1

La PDE1 joue un rôle dans la régulation de différentes fonctions vasculaires et des modifications anormales l'affectant sont impliquées dans différentes pathologies.

La PDE1A est associée à l'augmentation de la tolérance au nitrate. 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), l'inhibition des PDEs-GMPc par le zaprinast permettant de reverser cette tolérance par la restauration de GMPc intracellulaire (Pagani et al. 1993). Dans ce contexte, l'utilisation des inhibiteurs de PDE1 dans le but de limiter le développement de la tolérance aux nitrates pourrait être une piste thérapeutique à évaluer chez l'Homme. Une autre étude a également souligné l'implication de la PDE1A dans la réactivité vasculaire : dans les artères mésentériques isolées à partir de rats implantés de mini-pompes osmotiques libérant de l'angiotensine II (60 ng/min) pendant 14 jours, l'expression de la PDE1A est augmentée et la concentration cellulaire de GMPc diminuée. Cette diminution est prévenue en présence d'un inhibiteur de la PDE1 (10 µM de vinpocétine), suggérant ainsi que l'activation de la PDE1 contribue à l'augmentation des réponses contractiles observées dans ces artères en réduisant les concentrations intracellulaires de GMPc (Giachini et al. 2011).

Les PDE1A et PDE1C sont impliquées dans le phénomène de vieillissement vasculaire. Une étude récente (Nino et al. 2015) a montré que les niveaux d'expression des ARNm codant ces enzymes sont augmentés dans les CMLVs humaines sénescents et que l'inhibition de la PDE1 réduit les marqueurs de vieillissement cellulaire. D'une manière intéressante, en utilisant les bases de données GWAS humaine "*Genome-wide association studies*", il a été constaté que le polymorphisme nucléotidique (SNP, *Single nucleotide polymorphism*) de la PDE1 est associé à une élévation de la pression artérielle diastolique et à l'épaississement de l'artère carotide, deux marqueurs du dysfonctionnement vasculaire au cours du vieillissement (Nino et al. 2015, Yan 2015). Ces résultats établissent ainsi un lien évident entre la régulation de la PDE1 et les anomalies vasculaires du vieillissement

La PDE1C, considérée comme marqueur de la prolifération des CMLs dans les vaisseaux humains et de rongeurs, est également associée aux phénomènes de resténose post-angioplastie et d'athérosclérose. Ainsi, Rybalkin a montré que dans des cultures de CMLs aortiques humaines, l'induction de PDE1C est nécessaire à la prolifération cellulaire

(Rybalkin et al. 1997). L'expression de la PDE1C a été rapportée comme étant mineure dans l'aorte humaine et la veine saphène saines, mais son induction est considérable dans les CMLs de ces vaisseaux mis en culture (Rybalkin et al. 1997, Cai et al. 2015). Cette augmentation de l'expression de PDE1C est également observée dans les cellules isolées à partir de lésions d'athérosclérose aortiques (Rybalkin et al. 2002) mais aussi *in vivo* dans les lésions de la néo-intima d'artères coronaires humaines (Rybalkin et al. 2002). *Ex vivo*, l'inhibition de la PDE1C par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens ou d'un inhibiteur de la PDE1 conduit à la suppression de la prolifération des CMLs isolées à partir de l'aorte saine ou de lésions d'athérosclérose (Rybalkin et al. 2002). D'une manière intéressante, dans un modèle murin *in vivo*, la délétion du gène codant pour la PDE1C (PDE1C KO) ou l'inhibition pharmacologique de la PDE1 par l'application péri-vasculaire de l'IC86340, un inhibiteur sélectif de PDE1, atténue la formation de la néo-intima dans un modèle de blessure de la carotide chez la souris (Cai et al. 2015). Les auteurs de cette étude ont également montré que la PDE1C jouait un rôle critique dans la régulation de la stabilité des récepteurs de croissance, tels que le récepteur PDGF- β , récepteur connu pour son implication dans le remodelage vasculaire. L'inhibition de la PDE1C diminue l'expression de ce récepteur par un mécanisme dépendant de la voie AMPc/PKA impliquant une dégradation lysosomale du récepteur d'une manière dépendante du récepteur LRP-1 (*low density lipoprotein receptor-related protein-1*) (Cai et al. 2015).

b. Rôle de la PDE3

La resténose demeure le talon d'Achille de l'angioplastie vasculaire. Différents agents pharmacologiques ont montré un effet bénéfique dans la prévention de cet incident dans différents modèles animaux de resténose post-angioplastie, parmi lesquels l'héparine, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), les inhibiteurs d'influx calciques, mais aussi les inhibiteurs sélectifs de la PDE3. En effet, de nombreuses études ont montré que les inhibiteurs de PDE3 inhibent la prolifération et la migration des CMLVs *in vitro* et limitent l'accumulation néo-intimale de ces cellules *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).

Le cilostazol, un inhibiteur sélectif de la PDE3, commercialisé sous le nom de Pletal[®], est connu pour ses effets vasorelaxants et inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire et de la prolifération des CMLVs. Différentes études cliniques ont été réalisées dans le but d'évaluer

son bénéfique par rapport à des anti-agrégants plaquettaires classiques tels que l'aspirine et clopidogrel. Le cilostazol a montré une efficacité dans l'atténuation de la resténose post-angioplastie, notamment chez les patients à haut risque de resténose six mois après la pose du stent (essai clinique CREST) (Douglas et al. 2005) et chez les patients diabétiques implantés d'un stent à élution médicamenteuse (essai clinique DECLARE-DIABETES) (Lee et al. 2008). Dans un autre essai clinique (DAPC), le cilostazol, en comparaison à l'aspirine, a réduit la progression de l'athérosclérose de la carotide chez des patients atteints d'un diabète de type II (Katakami et al. 2010). L'ensemble de ces études souligne l'intérêt thérapeutique du cilostazol dans ces pathologies vasculaires mais son utilisation reste limitée à cause des effets secondaires qui accompagnent son administration tels que les maux de tête, les vertiges, les diarrhées, et l'augmentation de la fréquence cardiaque (Bobin et al. 2016).

Les deux isoformes de PDE3, PDE3A et PDE3B, sont exprimées dans différents lits vasculaires mais l'étude de leur spécificité fonctionnelle est limitée en l'absence d'inhibiteurs spécifiques de chaque iso-enzyme. Récemment et grâce au développement de souris déficientes en PDE3A (KO-PDE3A) ou en PDE3B (KO-PDE3B), il a été montré que la déficience en PDE3A inhibe clairement la prolifération des CMLVs 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 CMLVs issues des souris KO-PDE3B ne sont pas affectées et leur transfection avec un si-RNA dirigé contre la PDE3A génère une inhibition de la synthèse d'ADN similaire à celle observée dans les CMLVs issues des souris KO-PDE3A. Cet outil génétique a permis d'identifier la PDE3A comme impliquée dans le processus de prolifération cellulaire, révélant la PDE3A comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des pathologies vasculaires associées à un phénomène de prolifération cellulaire.

Les inhibiteurs de PDE3 jouent également un rôle vasorelaxant. Plusieurs études de réactivité vasculaire menées sur des aortes pré-contractées, en présence ou non d'un endothélium, ont permis de démontrer que l'inhibition sélective de la PDE3 produit une vasorelaxation indépendante de l'endothélium et potentialise l'effet relaxant d'une stimulation β -adrénergique ou de l'activation des AC (Tanaka et al. 1988, Maurice and Haslam 1990, Jang et al. 1993, Eckly and Lugnier 1994). Les effets de l'inhibition de la PDE3 sur le contrôle du tonus vasculaire ont été principalement attribués à l'atténuation de l'hydrolyse de l'AMPc mais différents travaux ont également rapporté l'importance de l'effet inhibiteur du GMPc sur l'activité de la PDE3 dans la 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 (*Atrial natriuretic peptide*), et augmente les niveaux d'AMPc dans les CMLVs créant une synergie avec les agents stimulant les ACs et la synthèse d'AMPc, comme la prostaglandine I₂ ou l'isoprénaline. Bien que ce mécanisme soit identique à celui décrit pour les cardiomyocytes, l'absence de la PDE2 dans les CMLVs, 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 ces cellules. Dans ce contexte, plusieurs travaux démontrent que le GMPc peut réguler des fonctions dans les CMLVs à travers l'inhibition de la PDE3 (Maurice and Haslam 1990, Maurice et al. 1991, Jang et al. 1993, Eckly and Lugnier 1994, Osinski and Schror 2000, Osinski et al. 2001).

Dans une étude récente, Maass et ses collaborateurs (Maass et al. 2015) ont identifié six mutations faux-sens de la PDE3A chez des patients présentant une hypertension à transmission autosomique dominante associée à une brachydactylie de type E, malformation congénitale des doigts. Ces PDE3A mutées sont caractérisées par un gain de fonction associé à une augmentation de l'activité hydrolytique de l'AMPc responsable d'une hyperprolifération des CMLVs et d'une augmentation des résistances vasculaires. Cette étude devrait soutenir l'intérêt du développement et de l'utilisation des inhibiteurs de PDE3 dans le traitement de l'hypertension, notamment quand celle-ci est associée à une brachydactylie.

Au niveau de l'endothélium, les inhibiteurs de la PDE3 réduisent la prolifération et l'expression des molécules d'adhésion des CEs (Lugnier and Schini 1990, Suttorp et al. 1993, Blease et al. 1998), mais très peu d'information est disponible concernant les isoformes de la PDE3 exprimées dans ces cellules. Une étude récente a montré que dans les CEs de l'artère humaine en culture, la PDE3B interagit directement avec le facteur d'échange Epac1 et forme un signalosome membranaire qui contrôle les effets de l'AMPc sur l'adhésion, la migration et la formation des tubules et ceci en contrôlant la voie de signalisation de RRAS (*RAS-related protein*) et de la PI3K γ . L'inhibition de la PDE3 par le cilostamide ou l'utilisation d'un peptide qui perturbe ce complexe (Epac1-PDE3B) conduit alors à l'activation de la protéine Epac1 et induit l'adhésion cellulaire et la formation de tubules (Wilson et al. 2011). Des études complémentaires seraient nécessaires afin de déterminer comment ce complexe de signalisation pourrait être exploité dans le contrôle du phénomène de l'angiogenèse au cours de la cicatrisation et de la métastase tumorale.

c. Rôle de la PDE4

Contrairement aux effets des inhibiteurs de la PDE3 sur le contrôle du tonus contractile et la prolifération des CMLVs, les inhibiteurs de la PDE4 ne sont généralement pas associés à une vasodilatation et n'inhibent pas la prolifération des CMLVs (pour revue, (Polson and Strada 1996)). Cependant, lorsque les inhibiteurs sélectifs de la PDE4 sont utilisés en présence d'activateurs de la voie de l'AMPc ou d'inhibiteurs de la PDE3, ou encore dans les expériences dans lesquelles les vaisseaux sont intacts (endothélium fonctionnels), ils acquièrent la capacité d'induire une vasorelaxation et d'inhiber la prolifération des CMLVs au phénotype synthétique (Maurice et al. 1991, Jang et al. 1993, Eckly and Lugnier 1994, Polson and Strada 1996). Un donneur de NO, un endothélium fonctionnel, ou un inhibiteur de la PDE3 révèlent l'effet vasorelaxant de l'inhibition de la 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 la concentration d'AMPc, ce qui permet de dévoiler une régulation par la PDE4 du niveau de l'AMPc (Komas et al. 1991, Eckly and Lugnier 1994). Ces observations prouvent l'existence d'une interaction entre la PDE3 et la PDE4 médiée par le GMPc.

Comme c'est le cas avec les inhibiteurs de PDE3, les inhibiteurs de PDE4 réduisent la prolifération et l'expression des molécules d'adhésion des CEs vasculaires (Lugnier and Schini 1990, Suttorp et al. 1993, Blease et al. 1998). De plus, les inhibiteurs de PDE4 réduisent la perméabilité de ces cellules comme l'ont montré des expériences *in vitro* (Lugnier and Schini 1990, Suttorp et al. 1993, Blease et al. 1998) et *in vivo* en utilisant le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs aviaires fécondés (DeFouw and DeFouw 2001). Néanmoins, les isoformes de PDE4 exprimées dans ces cellules et leur rôle dans ces différentes fonctions biologiques restent à déterminer.

Une étude récente a montré que dans les CEs de l'artère humaine en culture, la PDE4D interagit directement avec le facteur d'échange Epac1 et forme un signalosome membranaire qui régule la perméabilité endothéliale par l'activation des petites protéines-G Rap1. L'utilisation d'un peptide qui perturbe ce complexe (Epac1-PDE4D) conduit à l'augmentation de la perméabilité de ces cellules (Rampersad et al. 2010).

3. Rôle des PDEs dans la compartimentation de la voie de l'AMPc

La première preuve d'un effet cellulaire non uniforme de l'augmentation de la concentration de l'AMPc remonte aux travaux de Buxton et Brunton, qui ont comparé

l'activation de la PKA par l'AMPC en réponse à un traitement avec des agonistes de différents RCPGs, la prostaglandine E1 (PGE1), agoniste du récepteur aux prostanoides, et l'isoprénaline, agoniste des récepteurs β -ARs, sur des cœurs perfusés de lapins. Dans cette étude, les tissus cardiaques ont été homogénéisés puis séparés en fractions solubles et particulaires, le niveau d'activité de la PKA a été déterminé dans chaque fraction. Cette analyse a montré que le niveau d'activation de la PKA dans les différentes fractions cellulaires dépend du ligand utilisé : la PGE1 serait responsable de l'augmentation de l'activité de la PKA soluble alors que l'isoprénaline augmenterait l'activité de la PKA particulaire. De plus, seule l'augmentation de l'activité PKA particulaire est associée à un effet isotrope cardiaque. Ces travaux suggèrent ainsi qu'après sa production, l'AMPC est compartimentalisé dans la cellule et pourrait ainsi induire différents effets biologiques. (Buxton and Brunton 1983). Plus tard, une série d'expériences menées par Jurevicius et Fischmeister (Jurevicius and Fischmeister 1996) sur des myocytes ventriculaires de grenouille a montré qu'une stimulation locale des récepteurs β -ARs conduisait à l'activation locale des LTCCs et que cette restriction d'effet était levée par l'application d'un inhibiteur non-sélectif des PDEs. Ces résultats suggèrent donc que les PDEs sont importantes pour la définition de microdomaines locaux d'AMPC impliqués dans la régulation β -adrénergique des LTCCs.

Une autre étude réalisée sur des cellules vivantes avec la technique du transfert de fluorescence par résonance (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) a apporté de solides évidences soutenant l'idée du rôle des PDEs dans la compartimentation de la voie de l'AMPC (Leroy et al. 2008). Dans ces expériences, Leroy et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence la contribution des PDEs dans la dynamique spatiotemporelle de l'AMPC dans le myocyte ventriculaire. En réalisant des stimulations brèves des récepteurs β -ARs, les auteurs ont montré que le pic d'AMPC produit est plus rapide à la membrane que dans le cytosol, ceci suggérant que l'AMPC est rapidement produit et hydrolysé au niveau membranaire et que sa diffusion au niveau du cytoplasme est limitée. Une autre étude réalisée sur des cellules HEK (*Human embryonic kidney*), et utilisant également la technique FRET a montré, que deux différentes familles de PDE4, la PDE4B et la PDE4D, sont responsables de la compartimentation de l'AMPC intracellulaire, la PDE4B régulant l'AMPC sous-membranaire et la PDE4D contribuant principalement à la régulation de l'AMPC cytosolique (Terrin et al. 2006). Enfin, une autre étude menée au laboratoire souligne l'importance des PDEs dans le contrôle des signaux intracellulaires de l'AMPC, dans les CMLVs en culture. Les auteurs ont montré que dans le cytosol de ces cellules, la fonction de la PDE4 est majoritaire et que son

inhibition permettait de démasquer la fonction de la PDE1 et de la PDE3. En revanche, dans le compartiment sous-membranaire, la PDE3 et la PDE4 hydrolysent conjointement ce second messenger (Zhai et al. 2012).

4. L'efflux de l'AMPc par les MRPs (*Multidrug resistance proteins*)

Bien que le contrôle des concentrations intracellulaires des nucléotides cycliques soit principalement attribué aux PDEs, d'autres voies peuvent également participer à la diminution des concentrations cellulaires de ces messagers. L'efflux des nucléotides mono-phosphorylés a été observé pour la première fois par Davoren et Sutherland (Davoren and Sutherland 1963, Sutherland and Rall 1958) qui en découvrant la bio-synthèse de l'AMPc en réponse à une stimulation hormonale et à l'activation des AC avaient noté une élévation concomitante de l'AMPc dans le milieu extracellulaire (Davoren and Sutherland 1963).

En 1999, des chercheurs ont identifié des transporteurs cellulaires appelés MRP4, membres des transporteurs transmembranaires ABC (*ATP binding cassette*). Ces transporteurs sont capables d'exporter les analogues nucléotidiques tels que les purines monophosphates dotées de propriétés antivirales (Schuetz et al. 1999). La ressemblance de ces molécules à l'AMPc a incité la réalisation d'études pour évaluer la capacité de MRP4 à transporter l'AMPc et le GMPc (Chen et al. 2001, van Aubel et al. 2002, Sampath et al. 2002, Wielinga et al. 2003). Les résultats obtenus ont permis d'affirmer que MRP4 mais aussi MRP5 étaient capables de transporter l'AMPc et le GMPc à l'extérieur de la cellule par un mécanisme ATP-dépendant.

Les MRP4 et MRP5 sont exprimées dans plusieurs tissus, y compris le ML (Mitani et al. 2003, Dazert et al. 2003) mais leur fonctions physiopathologiques ne sont pas clairement élucidées. Au niveau vasculaire, l'étude de Sassi et ses collègues (Sassi et al. 2008) a montré que ces deux transporteurs étaient surexprimés lors de la prolifération *in vitro* des CMLs isolées de l'artère coronaire humaine et suite à l'atteinte de l'intégrité des artères carotides *in vivo* chez le rat. D'une manière intéressante, l'inhibition de MRP4 augmente les concentrations intracellulaires d'AMPc et de GMPc, bloque la prolifération des CMLVs et prévient l'apparition de la néo-intima après une lésion vasculaire. La MRP4 pourrait ainsi constituer une cible potentielle à visée antiproliférative. De plus, son inhibition a également entraîné un effet bénéfique sur le processus prolifératif des CMLs artérielles pulmonaires associé à l'HTAP. Ainsi, il a été montré que l'expression de MRP4 est augmentée dans les artères pulmonaires de patients atteints d'une HTAP idiopathique et dans un modèle murin d'HTAP par hypoxie (Hara et al. 2011). D'une manière intéressante, l'administration orale

d'un inhibiteur de MRP4 (le MK 571) reverse l'HTAP chez ces souris et la délétion du gène codant pour cette protéine (souris *Mrp*^{-/-}) protège de l'HTAP suite à l'hypoxie. Ces résultats montrent que MRP4 pourrait représenter une cible thérapeutique de l'HTAP.

III. Les récepteurs β -adrénergiques

Parmi les RCPGs, les récepteurs β -adrénergiques constituent un chef de file des récepteurs modulant l'activité des AC, et jouent un rôle crucial dans la régulation de multiples aspects de la fonction vasculaire.

En 1948, Ahlquist observe que l'ordre de classement de la puissance de plusieurs molécules (adrénaline, noradrénaline, isoprénaline ...) n'est pas le même selon les effets observés au niveau de différents organes tels le cœur, les vaisseaux, l'intestin, l'utérus et suggère l'existence de récepteurs différents qu'il appelle α et β : les récepteurs α induisant un effet de type « constricteur » sauf au niveau de l'intestin, et les récepteurs β un effet de type « relaxant » sauf au niveau cardiaque. Dix-neuf années plus tard, les récepteurs β -adrénergiques ont été classés en deux sous-types (β_1 et β_2) (Lands et al. 1967). Ces deux récepteurs ont été clonés en 1987 et 1986, respectivement (Frielle et al. 1987, Dixon et al. 1986). Durant les années 80, l'existence d'un récepteur β -AR atypique a été proposée sur des bases pharmacologiques et en 1989, un troisième sous-type de récepteur, le récepteur β_3 -AR, a été cloné (Emorine et al. 1989). Ces trois sous-types de récepteurs sont codés par trois gènes différents localisés, respectivement, sur les chromosomes humains 10 (β_1), 5 (β_2) et 8 (β_3) (Bylund et al. 1994).

Classiquement, les récepteurs β_1 -AR sont décrits comme les récepteurs prédominants dans le cœur, où leur activation stimule les fonctions cardiaques, et principalement la fonction inotrope (force contractile) et la fonction chronotrope (fréquence cardiaque). Les récepteurs β_2 -AR sont exprimés au niveau des CMLs (voies respiratoires, vaisseaux sanguins, tractus digestif et uro-génital) et leur activation se traduit par une relaxation musculaire. L'expression des récepteurs β_3 -AR est généralement plus faible par rapport aux deux sous-types précédents. Leur activation stimule la lipolyse au niveau des adipocytes, et exerce des effets relaxants sur différents muscles lisses, notamment le muscle détrusor vésical et le muscle lisse vasculaire.

A. Propriétés pharmacologiques des récepteurs β -ARs et applications thérapeutiques

Les agonistes β -AR, par définition, activent sélectivement les récepteurs β -AR vis-à-vis des récepteurs α -AR. Les catécholamines ont des propriétés agonistes sur les 3 sous-types de récepteurs β -AR, mais avec des affinités différentes : isoprénaline > noradrénaline \geq adrénaline pour les récepteurs β_1 -AR ; isoprénaline > adrénaline > noradrénaline pour les récepteurs β_2 -AR ; et isoprénaline \geq noradrénaline > adrénaline pour les récepteurs β_3 -AR avec une affinité plus faible que pour les récepteurs β_1 - et β_2 -AR (Lafontan 1994).

La sélectivité β_1/β_2 des agonistes β -AR leur confère des intérêts thérapeutiques distincts en fonction de la localisation préférentielle de ces deux récepteurs. L'isoprénaline, ayant une affinité similaire pour les récepteurs β_1 - et β_2 -AR, est utilisée comme médicament d'urgence en perfusion IV, pour ses effets β_1 cardiaques et β_2 vasculaires, dans le traitement des bradycardies sévères et dans l'arrêt cardiaque par asystolie ou bloc auriculo-ventriculaire complet, et peut, de ce fait, aux mêmes doses stimuler le cœur et dilater les bronches. Cette non sélectivité β_1/β_2 contre-indique son utilisation chronique en tant que bronchodilatateur car la stimulation cardiaque parallèle présenterait des risques iatrogènes.

Les agonistes sélectifs β_1 -AR, tels que la dobutamine, sont utilisés pour leurs effets cardiaques dans les syndromes de bas débit cardiaque. Les agonistes sélectifs β_2 -AR, tels que le salbutamol, sont quant à eux utilisés pour leurs propriétés bronchodilatatrices dans le traitement de l'asthme et de la BPCO et pour leurs propriétés de relaxation utérine dans les menaces d'accouchement prématuré.

Les antagonistes β -ARs sont des molécules qui s'opposent aux effets des catécholamines endogènes en se liant d'une manière compétitive et réversible sur le site de liaison de ces catécholamines de ces récepteurs β -ARs. Ces molécules représentent une classe majeure au sein de la pharmacopée avec un intérêt thérapeutique démontré dans les principales pathologies cardiovasculaires telles que l'HTA, l'insuffisance coronarienne, l'insuffisance cardiaque et certains troubles du rythme. Le dichloro-isoprotérénol a été le premier antagoniste β -AR sélectif synthétisé, en 1958, mais son effet agoniste partiel a limité son utilisation thérapeutique. Le propranolol a été synthétisé en 1962 par l'équipe de James Whyte Black (Prix Nobel 1988), et demeure le chef de file de cette famille d'antagonistes β -AR, regroupant à l'heure actuelle 17 molécules-médicaments.

Ces antagonistes β -ARs se caractérisent par certaines propriétés pharmacologiques distinctives telles que :

- *La sélectivité relative pour les récepteurs β_1 - et β_2 -AR* : la sélectivité β_1 , encore appelé cardiosélectivité, permet de limiter, d'un point de vue thérapeutique, les effets liés au blocage des récepteurs β_2 (bronchoconstriction, vasoconstriction, hypoglycémie). En fonction de cette propriété, les antagonistes β -ARs sont classés en 2 générations, la 1^{ère} génération ne présentant aucune sélectivité (exemple : propranolol), et la 2^{ème} génération comprenant les molécules avec une meilleure affinité pour le récepteur β_1 -AR (exemple : aténolol, métoprolol).

- *L'activité sympathomimétique intrinsèque (ASI)* : celle-ci traduit une propriété d'« agoniste partiel » de ces antagonistes β -ARs. Ces molécules sont ainsi capables de s'opposer à la liaison des médiateurs endogènes tout en stimulant partiellement le récepteur. L'avantage est de limiter l'effet bradycardisant pour les agonistes partiels β_1 -AR et de produire un effet vasodilatateur périphérique pour les agonistes partiels β_2 -AR.

- *Une propriété vasodilatatrice* : certains antagonistes β -AR se caractérisent par leur capacité à induire une vasorelaxation périphérique, et ceci par différents mécanismes tels qu'un effet agoniste partiel β_2 -AR (céliprolol), un effet antagoniste α_1 -AR (bucindilol, carvédilol, labétolol), ou par augmentation de la libération de NO endothélial (nébivolol). Ces molécules vasodilatatrices définissent une 3^{ème} génération d'antagonistes β -ARs qui peuvent être sélectifs du récepteur β_1 -AR (céliprolol, nébivolol) ou non sélectifs (bucindilol, carvédilol, labétolol). Cet effet vasodilatateur représente un intérêt thérapeutique potentiel de ces molécules de 3^{ème} génération dans la sphère des médicaments cardiovasculaires, mais reste à démontrer d'un point de vue clinique.

B. Différents états de conformation des récepteurs β -AR

Le concept d'"états de conformation" du récepteur β -AR a été proposé pour expliquer les propriétés pharmacologiques particulières de certains ligands de la famille des aryloxypropanolamines (Konkar et al. 2000, Kaumann et al. 1998) et expliquer le fait que ces ligands pouvaient interagir avec un récepteur selon deux modes d'action différents, un effet « stimulant » de type agoniste, et un effet « bloquant » de type antagoniste (Kaumann 1989). Ce type de ligands, tels que le CGP 12177, ont été nommés agonistes partiels "non conventionnels" car ils se comportent, à faibles concentrations (de l'ordre du nano-molaire), comme antagonistes des récepteurs β_1 et β_2 -AR, et à de plus fortes concentrations (~ 2 - 3 unités log), comme des agonistes. L'action du CGP 12177 a été particulièrement explorée au niveau cardiaque où il exerce des effets chronotropes et inotropes positifs (Kaumann and

Molenaar 1996) et au niveau du tissu adipeux brun où il induit la thermogénèse et l'activation des AC (Preitner et al. 1998, Konkar et al. 2000).

L'implication du récepteur β_1 -AR dans ces effets « agonistes » du CGP 12177 a été initialement écartée, car ces effets étaient relativement résistants au propranolol, un antagoniste des récepteurs β_1 et β_2 -AR (Kaumann and Molenaar 1996) et au CGP 20712A, un antagoniste sélectif du récepteur β_1 -AR (Malinowska and Schlicker 1996). La résistance au propranolol était une propriété pharmacologique assimilée au récepteur β_3 -AR. Cependant, l'idée de l'implication de ce récepteur dans les effets du CGP 12177 a été écartée suite à des évidences telles que la préservation de son effet stimulant au niveau du cœur de souris déficientes en récepteurs β_3 -ARs (Kaumann et al. 1998) et également au niveau du tissu adipeux de ces souris (Preitner et al. 1998, Konkar et al. 2000). En revanche, le rôle du récepteur β_1 -AR dans les effets agonistes du CGP 12177 a été confirmé par l'utilisation de souris déficientes en récepteurs β_1 -AR et/ou β_2 -AR. Ainsi, l'effet agoniste à fortes concentrations de CGP 12177 est aboli dans le tissu adipeux brun de souris déficientes en récepteurs β_1 -AR, (Konkar et al. 2000) et dans le cœur de souris déficientes en récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR, alors que cet effet cardiaque est préservé chez les souris déficientes en récepteurs β_2 -AR uniquement (Kaumann et al. 2001). L'ensemble de ces études supportent l'existence de deux états de conformation du récepteur β_1 -AR : un premier état actif dit de haute affinité, reconnu par les catécholamines et existant en état d'équilibre avec l'état inactif sur lequel agissent les antagonistes classiques; et un deuxième état dit de faible affinité sur lequel certains ligands tels que les aryloxypropanolamines (CGP 12177, LY 362884) agissent comme agonistes à de fortes concentrations et dont l'effet résiste aux antagonistes classiques β -ARs. Une étude a par la suite montré que d'autres antagonistes β -ARs pouvaient se comporter comme agonistes via ce 2^{ème} état ou site de liaison du récepteur β_1 -AR humain (Carvedilol) ou via les deux sites de liaison (alprenolol, pindolol) (Baker et al. 2003).

A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires responsables de l'existence de ces différents états de conformation du récepteur β_1 -AR restent à élucider. Certains mécanismes ont été suggérés, tels qu'une conformation spécifique à certains ligands (Seifert et al. 2001), une conformation dépendant du niveau de phosphorylation du récepteur ou de sa dimérisation (Salahpour et al. 2000), ou encore une association avec des protéines particulières d'échafaudage, telle que l'AKAP79/150 (Fraser et al. 2000). Plus récemment, un analogue fluorescent du CGP 12177, nommé BODIPY-TMR-CGP, a été développé afin d'explorer directement les interactions récepteur-ligand et ce 2^{ème} état de conformation du récepteur β_1 -

AR (Gherbi et al. 2014). A l'aide de cet outil, un mécanisme de coopérativité négative au sein d'un homodimère du récepteur β_1 -AR a été proposé comme responsable de l'apparition de second état conformationnel de faible affinité (Gherbi et al. 2015).

C. Localisation cavéolaire des récepteurs β -ARs

1. Les cavéoles

La membrane plasmique est une structure dynamique. Composée principalement de phospholipides, elle constitue une barrière entre les milieux intracellulaire et extracellulaire mais représente également une structure riche en protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Cependant, la membrane plasmique n'est pas homogène, sa fluidité dépendant de sa composition en lipides et de sa structure. C'est ainsi que certaines protéines et lipides peuvent être regroupés au sein de microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques « *lipid rafts* ». Ces derniers forment des portions de la membrane plasmique moins fluides et enrichies, notamment, en cholestérol et sphingolipides.

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètre. Observées pour la première fois en 1955 (Yamada 1955), elles forment des microdomaines au sein des rafts lipidiques enrichis en une protéine, la cavéoline. Ainsi, la présence de cette protéine au sein de la membrane plasmique permet la formation de « petites caves » en forme d'oméga inversé "Ω", appelées cavéoles (**Figure 13**).

La cavéoline est une protéine d'environ 22 kDa exprimée au niveau des membranes des cellules (Glenney and Soppet 1992). Ce sont des protéines semi-transmembranaires enchâssées au niveau de la face cytoplasmique de la bicouche lipidique grâce à une hélice α en épingle et dont les deux extrémités C- et N-terminales sont cytoplasmiques (Head et al. 2014) (**Figure 13**). Les cavéolines sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique où elles commencent à s'oligomériser entre elles pouvant ainsi former des complexes supérieurs à 400 kDa. Cette oligomérisation est importante pour l'incorporation de la cavéoline dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Fridolfsson et al. 2014). Une cavéoline peut fixer 1 à 2 molécules de cholestérol et des études ont estimé qu'une cavéole contenait environ 144 molécules de cavéolines et plus de 20000 molécules de cholestérol (Parton and Simons 2007). De ce fait, des agents hypocholestérolémiants sont couramment utilisés pour détruire les cavéoles. Le plus connu et le plus couramment utilisé est la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) qui, en se combinant au cholestérol, le détache des membranes cellulaires (Christian et al. 1997, Hailstones et al. 1998). En l'absence de cholestérol dans les membranes, la

cavéoline ne peut plus s'assembler en multimères, il en résulte une disparition des cavéoles au niveau de la membrane plasmique.

D'autres protéines, comme la cavin, stabilisent le complexe au sein de la membrane pour former la cavéole (Fridolfsson et al. 2014). La cavéoline peut également interagir avec de nombreuses protéines, telles que des récepteurs, des canaux, des enzymes, grâce à un domaine hautement conservé, le *caveolae scaffolding domain* (**Figure 13**).

Il existe 3 isoformes de cavéoline, la Cav-1, la Cav-2 et la Cav-3, codées par 3 gènes distincts. Les isoformes 1 et 2 sont ubiquitaires, généralement co-exprimées dans la plupart des cellules avec des taux d'expression élevés dans les CEs, les adipocytes, les fibroblastes et les CMLs. La Cav-3, quant à elle, est spécifique du tissu musculaire strié (squelettique et cardiaque) et du muscle lisse (Williams and Lisanti 2004).

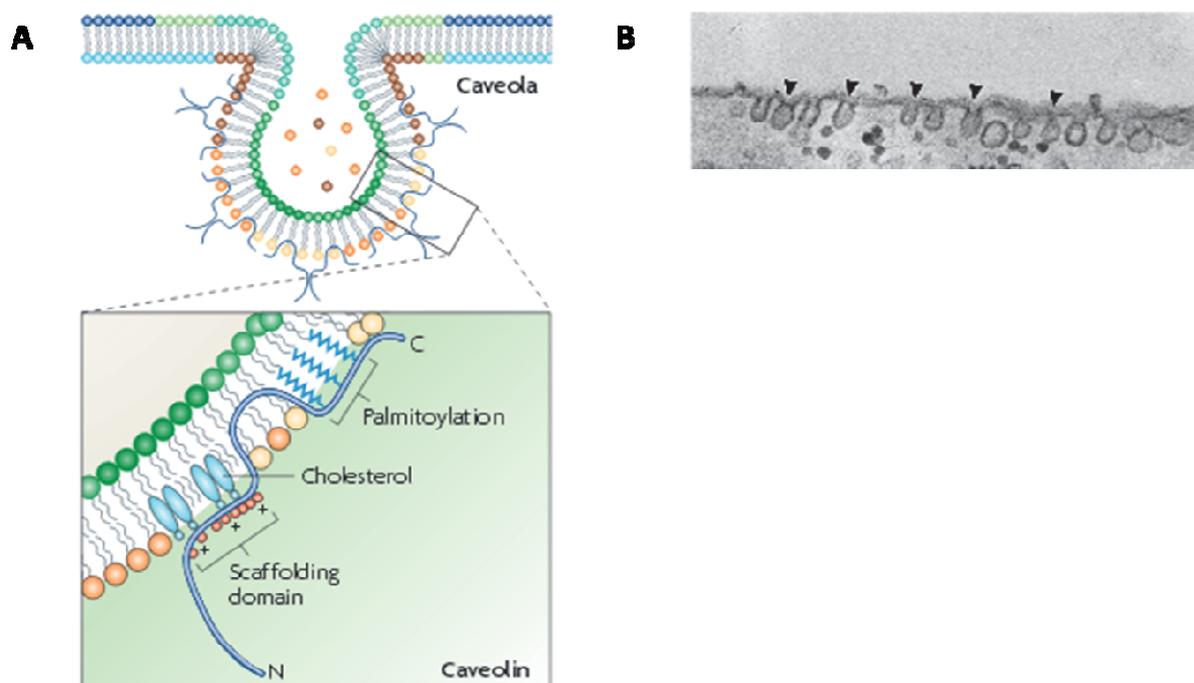


Figure 13 : Structure des cavéoles.

A. Représentation schématique d'une cavéole au niveau de la membrane plasmique d'après (Parton and Simons 2007) **B.** Exemple de cavéoles en forme de U au niveau de la membrane plasmique de CMLs, visualisées par microscopie électronique (Thyberg 2000).

2. Rôle des cavéoles dans la signalisation β -adrénergique

Il a été rapporté que différentes protéines, notamment les RCPGs (tels que les récepteurs à l'ET, à la bradykinine, à l'acétylcholine, et les récepteurs β -ARs), les sous unités α et β des protéines G associées, certaines isoformes d'AC, l'isoforme 2 de la kinase des récepteurs couplés aux protéines G (GRK2 : *G-protein coupled receptor kinase 2*), et la sous-unité catalytique de la PKA, pouvaient être localisées au niveau des cavéoles. Cette localisation cavéolaire de ces composants peut être dépendante ou non de l'activation d'un récepteur (Okamoto et al. 1998).

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 β_2 -AR implique les structures cavéolaires, alors que celle du récepteur β_1 -AR est plus diffuse (Rybin et al. 2000, Steinberg 2004). Une étude de Nikolaev et son équipe, 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 β_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). Une étude récente a confirmé ces résultats en montrant que l'activité de la PKA induite suite une stimulation β_2 -AR dans les cardiomyocytes de lapin est confinée à la membrane plasmique et au RS, alors que dans les cardiomyocytes de lapins IC, cette stimulation β_2 -AR induit une forte activité PKA qui atteint les myofilaments cardiaques. Cette propagation du signal β_2 -AR est associée à une diminution de l'expression de la Cav-3 témoignant encore une fois de l'importance des structures cavéolaires dans la signalisation β -AR (Barbagallo et al. 2016).

Dans les CMLVs, l'existence d'une telle compartimentation membranaire des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs est moins claire. Ostrom *et al.* ont montré, par fractionnement membranaire sur gradient de sucrose et par détection immunochimique des protéines, que dans les CMLVs d'aorte de rat en culture, le sous-type β_1 -AR est principalement exprimé dans les fractions membranaires non-cavéolaires, et le sous-type β_2 -AR 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 β -AR. En revanche, ce qui est bien décrit et a fait l'objet de plusieurs études, est la composition membranaire des CMLVs en cavéoles qui

peut être différente selon le phénotype des cellules. En effet, il a été montré que le nombre de cavéoles à la surface de CMLs d'artères de rat est réduit lors du changement du phénotype cellulaire du contractile au synthétique, malgré une expression inchangée de la cavéoline (Thyberg et al. 1997). Cette variation d'expression des cavéoles en fonction du phénotype cellulaire semble être importante dans la fonction cellulaire, notamment dans la régulation de l'excès de lipoprotéines qui pourrait ainsi expliquer pourquoi les cellules synthétiques au niveau de l'intima des artères, contrairement aux CMLs contractiles, donnent naissance à des cellules spumeuses au cours de l'athérosclérose. Une seconde étude a pu confirmer les différences observées dans l'expression des cavéoles et dans le transport du cholestérol entre les CMLs synthétiques et contractiles (Thyberg 2000).

D. Désensibilisation

Les récepteurs β -ARs sont régulés par un mécanisme de rétrocontrôle négatif appelé "désensibilisation". Ce phénomène survient lors d'une stimulation importante et/ou prolongée par les catécholamines. Cette désensibilisation est caractérisée, d'une part, par une réduction de l'affinité des récepteurs β -ARs pour les catécholamines endogènes (adrénaline et noradrénaline) ou les agonistes β -adrénergiques et d'autre part, par une diminution de la transduction entre le ligand et l'activation de l'AC (découplage rapide entre le récepteur β -AR, la protéine Gs et l'AC). Si la stimulation adrénérgique est très intense, il peut y avoir internalisation des récepteurs β -ARs avec diminution de leur nombre à la surface membranaire "down régulation".

La désensibilisation du récepteur implique sa phosphorylation au niveau de la région C-terminale par des sérine/thréonine kinases, en l'occurrence la PKA ou la GRK. Ces deux kinases donnent lieu à deux types de désensibilisation : la désensibilisation hétérologue et la désensibilisation homologue.

i) La désensibilisation hétérologue implique la PKA qui phosphoryle les résidus sérine et thréonine des boucles cytoplasmiques du domaine C-terminal des récepteurs β -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). Elle est dite hétérologue car elle ne requiert pas la fixation de l'agoniste sur le RCPG et permet ainsi la désensibilisation du récepteur par d'autres ligands (Freedman and Lefkowitz 1996). La preuve directe de la désensibilisation des RCPGs par la PKA a été apportée par l'emploi d'inhibiteurs de la PKA (Lohse et al. 1990) ou

par l'expression de récepteurs mutés sur les sites consensus de phosphorylation (Hausdorff et al. 1989).

ii) La désensibilisation homologue, quant à elle implique la kinase GRK. Cette protéine est codée par sept gènes (1 à 7) (Stoffel et al. 1997) 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 récepteurs β -ARs (GRK2 et 3) et celui de la GRK4 (GRK4, 5 et 6).

La phosphorylation des récepteurs β -ARs par les GRKs est initiée uniquement après liaison spécifique du ligand à son récepteur. Ce découplage fonctionnel est qualifié de ligand-dépendant. Ce processus s'effectue en deux étapes : la phosphorylation sélective du récepteur lié à l'agoniste, suivie par la liaison d'une protéine arrestine, dont le rôle principal est de découpler physiquement le récepteur et la protéine G (**Figure 14**). Les GRK phosphorylent les RCPGs sur leurs résidus sérine et thréonine dans la boucle 3 et la queue C-terminale. La seule phosphorylation par les GRKs a peu d'effet direct sur le couplage récepteur-protéine G car la fonction principale des GRKs dans la désensibilisation des récepteurs β -ARs est d'augmenter l'affinité du récepteur pour les β -arrestines.

In vitro, la phosphorylation du récepteur β_2 -AR par GRK2 augmente l'affinité du récepteur pour la β -arrestine par 10 à 30 fois (Lohse et al. 1992). La β -arrestine participe également à l'internalisation des récepteurs en interagissant avec les molécules de clathrine. Celles-ci favorisent la formation de vésicules endocytosiques permettant ainsi leur recyclage à la membrane après déphosphorylation ou leur dégradation (Post et al. 1999).

Contrairement aux récepteurs β_1 et β_2 -ARs, les récepteurs β_3 -ARs ne possèdent pas de sites de phosphorylation pour la PKA ou la GRK, et semblent donc réfractaires à la désensibilisation homologue ou hétérologue (Rozec and Gauthier 2006).

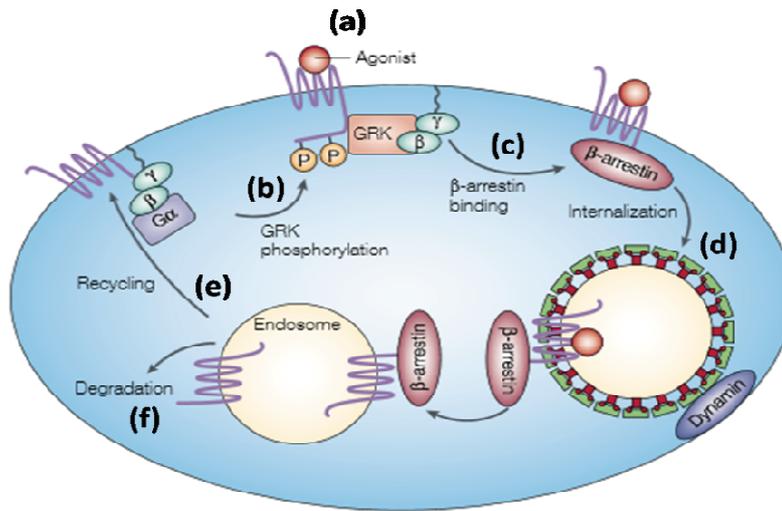


Figure 14 : Cycle des récepteurs β -adrénergiques. Modifié (Pierce et al. 2002).

La liaison du ligand à son récepteur active les protéines-G (a). Les *G-protein coupled Receptor Kinase* "GRK" phosphorylent le récepteur (b). A ce moment, le récepteur est fonctionnellement découplé des protéines G et son affinité augmente pour la β -arrestine (c). Le complexe récepteur- β -arrestine est capable de se lier à la clathrine pour permettre l'endocytose du récepteur (d). Dans les endosomes, les phosphatases garantissent le recyclage du récepteur pour autoriser son retour à la membrane (e), mais il peut aussi être dirigé vers les lysosomes et être dégradé (f).

E. Rôle des récepteurs β -ARs dans la fonction contractile vasculaire

Les récepteurs β -ARs jouent un rôle majeur dans la physiologie vasculaire, notamment dans le contrôle du tonus musculaire des vaisseaux. Cependant, leur implication dans la régulation de processus physiologiques vasculaires a connu d'importants remaniements au cours des dernières décennies notamment par l'identification du rôle de l'endothélium dans le contrôle du tonus contractile et l'identification du récepteurs β_3 -AR. Au niveau vasculaire, la stimulation des différents sous types de récepteurs β -ARs conduit à une vasodilatation, le récepteur β_2 -AR étant classiquement décrit comme prédominant.

Les travaux de Lands et de ses collaborateurs (Lands et al. 1967) ont suggéré que les récepteurs β -ARs des vaisseaux périphériques étaient du sous-type β_2 -AR. Des études ultérieures utilisant des agonistes et antagonistes sélectifs des sous-types β_1 - et β_2 -AR ont montré que la relaxation du muscle lisse vasculaire résultait de l'activation des deux sous-

types de récepteurs β -ARs et que la participation de chaque sous-type dépendait du lit vasculaire et de l'espèce animale (O'Donnell and Wanstall 1984, Begonha et al. 1995). Le récepteur β_2 -AR représente le sous-type prédominant dans la plupart des lits vasculaires. Néanmoins, le sous-type β_1 -AR serait le sous-type prédominant vasodilatateur dans certains vaisseaux tels que l'artère coronaire (O'Donnell and Wanstall 1985) et l'artère cérébrale (Edvinsson and Owman 1974).

La contribution d'un troisième sous-type de récepteurs β -AR dans la vasorelaxation vasculaire a été suggérée par plusieurs études. En effet, cette composante de la relaxation induite par l'isoprénaline et résistante au propranolol, un antagoniste β -AR, a notamment été observée dans l'aorte (Oriowo 1995) et l'artère mésentérique (Sooch and Marshall 1997) et a été attribuée historiquement à une stimulation des récepteurs dits atypiques. L'implication du récepteur β_3 -AR dans ces effets a été ensuite confirmée par l'utilisation d'agonistes β_3 -AR sélectifs (Trochu et al. 1999, Rozec et al. 2005, Dessy et al. 2005). Ainsi, les trois sous-types de récepteurs β -AR participent à l'effet vasorelaxant β -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.

Les 3 sous-types de récepteurs β -ARs sont présents dans les grosses artères, ou artères de conductance telle que l'aorte, avec une prédominance du sous-type β_2 (Oriowo 1995, Brawley et al. 2000a). La relaxation induite par une stimulation non sélective des récepteurs β -ARs par l'application de l'isoprénaline persiste en présence d'antagonistes β_1 - et β_2 -AR (Gray and Marshall 1992, Oriowo 1995, Sooch and Marshall 1997), des études ont également montré que des agonistes sélectifs β_3 -ARs (BRL 37344, SR 58611A) provoquent une vasorelaxation insensible au blocage des sous-types β_1 - et β_2 -AR mais inhibée par un antagoniste β_3 -AR (Trochu et al. 1999), ce qui confirme le rôle fonctionnel du sous-type β_3 dans cette vasorelaxation. La participation des récepteurs β -ARs endothéliaux dans cette relaxation β -adrénergique reste une question controversée. Ainsi, certaines études ont montré que la suppression de l'endothélium ou l'application d'inhibiteurs de la NOS n'avaient aucune influence sur la relaxation à l'isoprénaline dans l'aorte thoracique de rat (Konishi and Su 1983, Satake et al. 1996), alors que d'autres études menées sur la même préparation tissulaire ont démontré que la suppression de l'endothélium réduisait, soit totalement, soit partiellement, la relaxation induite par l'isoprénaline (Grace et al. 1988, Kamata et al. 1989, Gray and Marshall 1992, Delpy et al. 1996, Trochu et al. 1999, Ferro et al. 1999, Brawley et al. 2000a, Brawley

et al. 2000b). L'ensemble de ces études suggèrent que l'effet relaxant de l'isoprénaline implique une composante dépendante et une autre indépendante de l'endothélium (Brawley et al. 2000b).

L'ensemble de ces études montrent bien que les récepteurs β -ARs sont impliqués dans la relaxation vasculaire mais la contribution de chacun des sous-types dans cette fonction reste controversée. L'utilisation d'approches génétiques, telles que les souris *knock-out* pour les récepteurs β_1 - et/ou β_2 -AR permet d'obtenir des résultats précis sur la fonction de chacun des sous-types de récepteurs. L'étude de Chruscinski (Chruscinski et al. 2001) utilisant cette approche a été réalisée sur des artères de différents lits vasculaires et a pu montrer que c'est le récepteur β_1 -AR qui joue un rôle prédominant dans la vasorelaxation β -AR. Dans la plupart des lits vasculaires étudiés (artère mésentérique, pulmonaire et fémorale), le récepteur β_1 -AR est le seul impliqué dans la vasorelaxation. En revanche, dans les grosses artères (aorte et artère carotide), les deux sous-types de récepteurs β -ARs sont impliqués. D'une manière intéressante, l'isoprénaline ne provoque aucune vasorelaxation chez les souris double KO, suggérant ainsi la non-implication du récepteur β_3 -AR dans la relaxation de ces vaisseaux murins.

F. Implications physiopathologiques des récepteurs β -ARs au niveau vasculaire

1. HTA systémique

L'HTA essentielle est une pathologie multifactorielle pour laquelle le processus pathologique reste peu élucidé. L'importance de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression artérielle est bien établie. Ainsi, l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et la diminution de la biodisponibilité du NO est bien décrite au cours de l'HTA que ce soit chez l'animal (Fu-Xiang et al. 1992) ou chez l'Homme (Panza et al. 1993, Treasure et al. 1993).

En revanche, la contribution des récepteurs β -ARs dans la vasodilatation dépendante du NO endothélial au cours de cette pathologie est très peu étudiée et reste encore un sujet à controverse. En effet, la vasodilatation induite par la stimulation β -adrénergique endothéliale est réduite, *in vitro*, dans un modèle d'aorte de rats spontanément hypertendus, les rats SHR (*Spontaneously hypertensive rats*) (Arribas et al. 1994). Cependant, une mesure plethysmographique du flux sanguin en réponse à une vasodilatation induite par l'isoprénaline n'a pas révélé de différence *in vivo* entre des sujets sains et des patients hypertendus (Cockcroft et al. 1994).

Par ailleurs, une diminution globale de la réponse β -AR au cours de l'HTA a été démontrée chez l'Homme (Michel et al. 1990) et dans divers modèles animaux (Michel et al. 1990, Feldman 1987). Néanmoins, certaines études ont montré que la relaxation β -AR de l'aorte thoracique et des artères mésentériques de rats hypertendus est inchangée (Borkowski et al. 1992, Boonen et al. 1993) voire augmentée (Carvalho et al. 1987). Ces résultats controversés peuvent être expliqués par le fait que la relaxation induite par les récepteurs β -ARs peut dépendre du stade de la pathologie (Borkowski et al. 1992), de l'agent pharmacologique utilisé pour induire la contraction (Boonen et al. 1993, Carvalho et al. 1987) et du niveau de pré-contraction des artères (Carvalho et al. 1987, Konishi and Su 1983). Il est également important de souligner que dans ces études, la stimulation des récepteurs β -ARs est réalisée par l'application de l'isoprénaline, un agoniste non sélectif de ces récepteurs, ne permettant pas de déterminer la contribution relative des différents sous-types des récepteurs β -ARs dans cette relaxation.

D'un point de vue thérapeutique, les antagonistes β -ARs sont largement utilisés dans le traitement de l'HTA et étaient recommandés comme traitement de 1^{ère} intention jusqu'à récemment (Williams et al. 2004). En effet, une méta-analyse incluant 13 études cliniques contrôlées et randomisées comparant un traitement par antagoniste β -ARs avec d'autres antihypertenseurs a révélé que leur utilisation est associée à une augmentation du risque métabolique et du risque d'accident vasculaire cérébral (Lindholm et al. 2005). L'avantage des antagonistes β -ARs de 3^{ème} génération est actuellement discuté pour limiter ces risques. En effet, ces molécules diminuent la pression artérielle par réduction des résistances vasculaires périphériques tout en maintenant une fréquence cardiaque normale (Messerli and Grossman 2004, Pedersen and Cockcroft 2007). Les avantages d'une vasodilatation périphérique résident dans la diminution de la pré-charge et de la poste-charge cardiaques et la suppression des effets secondaires sur le métabolisme des lipides et du glucose, mais aussi une possible réversion du remodelage artériel (Messerli and Grossman 2004, Pedersen and Cockcroft 2007, Toda 2003). Ainsi, ces antagonistes β -ARs de 3^{ème} génération aux propriétés vasodilatatrices pourraient se révéler comme molécules à privilégier dans le traitement de l'HTA.

2. Athérosclérose

Les récepteurs β -ARs peuvent jouer un rôle dans le phénomène d'athérosclérose, mais celui-ci n'est pas complètement élucidé et reste controversé selon les études. Une première étude réalisée sur des artères coronaires humaines a montré que la vasodilatation induite par les récepteurs β -ARs était indépendante de l'endothélium et qu'elle était altérée dans les artères présentant de l'athérosclérose (Berkenboom et al. 1987). En revanche, une étude réalisée sur des artères coronaires de lapin a montré que la vasodilatation induite par les récepteurs β -ARs endothéliaux augmentait dans l'athérosclérose (Lu et al. 1995). Il a été également montré que la migration des CMLVs, processus pathologique pouvant contribuer à la resténose et à la formation de la néo-intima, était inhibée par la voie de l'AMPc et particulièrement suite à l'activation des récepteurs β -ARs (Johnson et al. 2006). Une autre équipe a montré que certains antagonistes β -ARs capables d'induire la production de NO tel que le nipradilol contrairement à d'autres antagonistes β -ARs et donneurs de NO présentent un effet anti-athérosclérotique par la restauration de la biodisponibilité du NO (Thakur et al. 2002). La contradiction de ces résultats peut être due à différents facteurs, et notamment une variabilité inter-espèces : dans, l'expression des différents sous-types de récepteurs β -ARs, leur localisation cellulaire (endothélium et/ou muscle lisse) et leur fonction relative, ainsi que leur sensibilité à la pathologie.

3. Insuffisance cardiaque (IC)

L'IC cardiaque est l'une des causes les plus fréquentes de mortalité et de morbidité dans le monde. Chaque année, environ 500 000 nouveaux cas sont diagnostiqués aux États-Unis et deux millions de nouveaux cas dans le monde, conduisant à une prévalence de plus de 22 millions dans le monde entier. Cette pathologie affecte 10 personnes par 1000 âgées de plus de 65 ans, 78% des patients ont eu au moins deux hospitalisations par an, conduisant à un coût annuel de 10-38 milliards de dollars (Kemp and Conte 2012). 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. Les manifestations cliniques majeurs d'IC sont la dyspnée, la fatigue, l'intolérance à l'effort, et les œdèmes pulmonaires et périphériques en cas d'IC globale.

a. Physiopathologie de l'IC

L'insuffisance cardiaque est définie par l'incapacité du cœur à assurer le débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes dans des conditions de remplissage ventriculaire normales. Les causes d'IC sont multiples et de nombreux facteurs de risque d'IC sont connus, tels que l'HTA, le diabète, la maladie coronarienne, l'obésité, l'apnée du sommeil, la maladie valvulaire cardiaque, et l'infarctus du myocarde. Il existe deux types d'IC, l'IC à fraction d'éjection altérée caractérisée par une dysfonction systolique, et l'IC à fraction d'éjection préservée, caractérisée par une dysfonction diastolique (Kanwar et al. 2016).

L'IC à fraction d'éjection altérée est liée à des anomalies de l'éjection ventriculaire, associées à une réduction de la fonction contractile cardiaque. Afin de palier à ce déficit, l'organisme met en jeu des systèmes neurohormonaux de compensation pour restaurer un débit cardiaque suffisant, dont les plus importants sont le SNA sympathique, le système rénine-angiotensine-aldostérone, le système arginine-vasopressine, et les peptides natriurétiques, qui exercent des effets cardiaques bénéfiques à court terme, effet inotrope et chronotrope positifs. L'activation chronique de cette voie peut contribuer au déclenchement d'un deuxième mécanisme d'adaptation précoce, un épaissement du ventricule gauche (hypertrophie cardiaque compensée) qui entraîne une augmentation de la force de contraction, pour faire face à l'augmentation de la surcharge de travail de la pompe cardiaque. Ces processus compensateurs sont également responsables d'altérations vasculaires, notamment une augmentation des résistances vasculaires périphériques qui est la conséquence d'un déséquilibre entre les agents vasoconstricteurs/prolifératifs et les agents vasodilatateurs/antiprolifératifs en faveur d'une vasoconstriction (Zelis and 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, ces mécanismes adaptatifs deviennent délétères à long terme en augmentant les pressions de remplissage cardiaque, en générant des œdèmes et en favorisant un remodelage cardiaque.

Au niveau moléculaire, cette hyperactivité du système neurohormonal conduit à une altération de la voie de signalisation β -ARs (El-Armouche and Eschenhagen 2009) (voir paragraphe suivant : III.F.3.b) et à une cardiotoxicité, caractérisée par une apparition d'une fibrose interstitielle, et d'une apoptose (Lympelopoulos et al. 2013). Une étude a montré que la stimulation adrénergique conduit à une élévation de l'AMPC, provoquant une surcharge

calcique et par voie de conséquence une diminution de la viabilité des cardiomyocytes (Mann et al. 1992).

Cette meilleure connaissance de la physiopathologie de l'IC a permis de proposer les antagonistes β -AR comme traitement de cette pathologie. Ainsi, l'utilisation chronique des antagonistes β -ARs permet d'améliorer la fonction ventriculaire et la qualité de vie du patient, de réduire le nombre d'hospitalisations pour aggravation de l'IC et d'augmenter la survie.

L'IC est bien évidemment par définition une pathologie affectant majoritairement les cardiomyocytes. Cependant, de nombreuses données récentes suggèrent que cette maladie affecte de façon importante la paroi vasculaire et en particulier l'endothélium des artères coronaires (Wang et al. 1994, Sun et al. 2000) et des artères de résistance périphériques (Varin et al. 1999, Varin et al. 2000). Le stimulus physiologique majeur de l'expression de la eNOS et de la production du NO est le "*shear stress*" (Harrison et al. 2006). L'une des conséquences de l'altération de la fonction ventriculaire gauche au cours de l'IC et de la réduction du flux sanguin dans les artères de résistance et de conductance est la diminution de ce "*shear stress*" exercé sur la couche de CEs provoquant ainsi une diminution de la production endothéliale de NO et une réduction de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Néanmoins, les données sur la production basale de NO au cours de l'IC sont controversées. En effet, certains chercheurs, utilisant comme indicateur de la production de NO basal, la réponse à des inhibiteurs de la eNOS sur le tonus contractile vasculaire, ont montré une augmentation de cette production (Drexler and Lu 1992, Habib et al. 1994), qui pourrait résulter de l'augmentation de l'expression de la NOS inductible chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée (Haywood et al. 1996). D'autres études n'ont pas montré de différence, voire ont montré une baisse de la production basale de NO chez des patients souffrant d'IC (Kubo et al. 1994, Mohri et al. 1997). Une autre cause majeure de la diminution de la biodisponibilité du NO au niveau vasculaire est les ERO, plus particulièrement l'anion superoxyde qui interagit rapidement avec le NO pour former l'anion peroxynitrite, un oxydant puissant (Harrison 1997). Une augmentation de la libération des ERO, particulièrement l'anion superoxyde, a été observée dans différents modèles animaux d'IC (Arimura et al. 2001, Bauersachs et al. 1999, Bauersachs et al. 2001). Par ailleurs, les patients IC présentent des niveaux élevés de peroxydes lipidiques, témoignant ainsi de l'élévation du stress oxydatif (Belch et al. 1991, Keith et al. 1998), qui pourrait donc également participer à la dysfonction endothéliale dans ces conditions pathologiques.

b. Altérations de la voie β -AR / AMPc au cours de l'IC

L'une des caractéristiques majeures de l'insuffisance cardiaque est l'altération de la voie de signalisation β -AR, en effet plusieurs études ont rapporté une désensibilisation de cette voie avec notamment une diminution de l'expression du récepteur β_1 -AR et un découplage fonctionnel des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs de la protéine G (Bristow et al. 1986, Bristow et al. 1993). Une augmentation de l'expression et de l'activité des protéines GRKs a également été rapportée au cours de cette pathologie chez l'Homme et dans différents modèles animaux d'IC (Lympopoulos et al. 2013). La principale conséquence de cette altération β -AR est la diminution de la réponse inotrope positive aux catécholamines (Feldman et al. 1987).

Concernant les PDEs, des altérations de leur expression, leur distribution et/ou de leur activité ont également été décrites au sein du cœur hypertrophié, une étude réalisée sur un modèle animal d'hypertrophie ventriculaire gauche induite par une constriction de l'aorte abdominale chez le rat a montré une augmentation de l'activité des PDEs dans le ventricule gauche du groupe de rat malades, et particulièrement une augmentation de l'activité hydrolytique de la PDE1 et de la PDE2 (Yanaka et al. 2003), une diminution de l'activité hydrolytique des PDE-AMPc totale, et de l'activité de la PDE3 et de la PDE4, ainsi qu'une diminution de l'expression protéique de la PDE3A, de la PDE4A et de la PDE4B a été démontrée dans les cardiomyocytes isolés du ventricule gauche d'un modèle animal d'hypertrophie cardiaque par constriction de l'aorte thoracique chez le rat (Abi-Gerges et al. 2009). Une altération de l'expression de ces enzymes a également été rapportée au stade de l'IC, en effet une étude réalisée sur des souris *Knock Out* PDE4D, a montré que cette déficience était associée à des altérations fonctionnelles telles qu'une diminution de la fraction d'éjection et de la contractilité cardiaques (Lehnart et al. 2005) une autre étude a montré une diminution de l'expression et de l'activité de la PDE3A dans le cœur de patients souffrant d'IC (Ding et al. 2005)

Au niveau vasculaire, peu d'études ont exploré la voie de signalisation β -AR au cours de l'IC. Il a été néanmoins observé une diminution de la vasorelaxation β -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). Celle-ci peut être liée à une diminution de la densité des récepteurs β -ARs (Kiuchi et al. 1993, Gaballa et al. 2001), elle-même associée à une élévation de l'expression de la β -ARK1 (*Beta adrenergic kinase 1*) aortique et carotidienne dans un modèle de rats IC après infarctus du myocarde (Gaballa et al. 2001), témoignant ainsi d'une désensibilisation possible des récepteurs β -ARs.

Toutefois, l'impact de l'IC sur le rôle fonctionnel des PDEs vasculaires reste peu connu. Une étude explorant l'activité de la PDE3 et de la PDE4 dans l'aorte de rat Dahl sensible au sel a montré une augmentation de l'activité PDE3, sans modification de l'activité de la PDE4 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).

OBJECTIFS

L'objectif principal de mon travail de thèse était de caractériser le rôle différentiel des récepteurs β -ARs et des principales familles de PDEs dans l'organisation de la signalisation intracellulaire de l'AMPc dans les CMLVs, et d'évaluer les altérations potentielles de cette voie de signalisation en situation pathologique. Mes travaux ont été réalisés sur deux modèles expérimentaux complémentaires : (1) un modèle cellulaire, des CMLs en culture isolées à partir d'aorte de rat sain et adoptant un phénotype synthétique ; (2) un modèle intégré, l'aorte de rat isolée à partir d'animaux souffrant d'IC.

Dans la 1^{ère} étude, nous avons évalué l'influence de la densité cellulaire sur la voie de signalisation β -ARs/AMPc/PDEs des CMLVs, et comparé deux états de confluence. Nous avons notamment étudié la contribution différentielle des deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -AR dans la production de l'AMPc ainsi que le rôle respectif de la PDE3 et de la PDE4 dans l'hydrolyse de ce second messager, dans ces deux conditions de culture cellulaire.

La technique d'imagerie de FRET a été utilisée pour mesurer *in situ* en temps réel la production d'AMPc. Des approches biochimiques (RT-PCR, dosages ELISA et dosages d'activité enzymatique) et une étude de compétition de liaison spécifique nous ont permis de compléter la caractérisation phénotypique de ces cellules.

La seconde étude avait pour but d'évaluer l'impact de l'IC sur l'expression, l'activité et le rôle fonctionnel des principales familles de PDEs-AMPc dans la régulation du tonus vasculaire basal et de la réponse relaxante suite à une stimulation β -AR. L'approche fonctionnelle de réactivité vasculaire en cuves à organe isolé a été couplée à des études biochimiques (RT-PCR, western-blot, dosages ELISA et dosages d'activité enzymatique) auxquelles j'ai plus particulièrement contribué.

MATERIEL ET METHODES

I. Modèles expérimentaux

A. Modèle animal d'insuffisance cardiaque (IC)

Toutes les expériences ont été réalisées conformément à la directive européenne [2010/63](#) relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et à sa transposition dans le droit français ([décret 2013-118 et cinq arrêtés datés du 1er février 2013](#)). Plus spécifiquement, l'autorisation du projet a été délivrée par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur après avis du comité d'éthique local (CEEA n° 26).

Les animaux ont été hébergés au sein de la plateforme « AnimEx » de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry), plateforme d'hébergement et d'exploration fonctionnelle du petit animal, agréé par le ministère de l'Agriculture. 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.

1. Conception du modèle

Notre modèle d'induction de l'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 par Valérie Domergue sur la plate-forme « AnimEx » de l'IPSIT.

L'intervention chirurgicale a été réalisée sur des rats mâles Wistar (Elevage Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) âgés de 3 semaines (poids \approx 60 g), anesthésiés par un mélange kétamine à 50 mg/kg (Imalgene[®], MERIAL, Lyon, France) et xylazine à 10 mg/kg (Rompun[®], Bayer Santé Animale, La Garenne-Colombes, France) et placés 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 en aval du ventricule gauche. 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 du modèle dépend de l'étape critique du serrage du clip : il doit être suffisant pour induire une surcharge de pression sans pour autant conduire au décès de l'animal. Ainsi, la fermeture du clip à l'aide d'une pince (Small curved 15 cm appliers for hemoclip plus reference 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 car la constriction se met en place au cours du développement de l'animal. En parallèle, les

rats contrôles (SHAM) du même âge ont subi la même procédure chirurgicale sans mise en place du clip.

En post-opératoire, un analgésique, le buprénorphine (Buprecare[®], AXIENCE, Pantin, France) a été administré à la dose de 0,05 mg/kg/jour pendant 3 jours.

2. Validation du modèle

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 à ultra-sons 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 indésirables que pourraient provoquer l'anesthésique sur la fonction cardiaque, tels que la diminution de la fréquence 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 ($FR = [(Dtd-Dts)/Dtd] \times 100$) 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 :

$$\text{Masse ventriculaire gauche} = 1,04 \times [(Dtd+SIV+PP)^3 - (Dtd)^3].$$

Les rats ont été sacrifiés 22 semaines après la chirurgie pour prélever l'aorte et réaliser les différentes expériences. Lors de l'étape de dissection, le poids du corps, du cœur, des poumons, des reins, du foie ont été mesurés puis normalisés à la longueur du tibia. La constatation d'une augmentation du poids du cœur et de celui des poumons (mesures présentées dans la section résultats) 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.

B. Modèle de CMLs aortiques de rat en culture

1. Isolement des CMLs aortiques

Les CMLs ont été isolées et mises en culture selon un protocole adapté d'après (Vallot et al. 2000). La mise en culture des CMLs vasculaires nécessite, d'une part, la séparation de la média, contenant ces CMLs, de l'intima et l'adventice, les 2 autres couches de la paroi vasculaire, puis d'autre part, la dissociation de ces cellules entre elles.

Pour obtenir un nombre suffisant de cellules en fin de dissociation, chaque expérience de dissociation est réalisée à partir de 3 aortes thoraciques. Des rats Wistar mâles, âgés de 6 semaines (180-200 g) sont anesthésiés avec du pentobarbital sodique (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, Cergy Pontoise, France) additionné d'un mélange antibiotique/antimycotique (100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 0,25 µg/ml amphotéricine B; GIBCO), constituant le "**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'obtenir une population de CMLs la plus homogène possible. Les tissus gras et conjonctifs sont soigneusement éliminés.

Élimination de l'endothélium :

L'aorte est ouverte longitudinalement de façon à exposer la couche endothéliale de la face interne. Celle-ci est enlevée par grattage avec une pince à disséquer. L'aorte est alors transférée dans une nouvelle boîte de pétri, et disposée de telle façon que la face contenant les CMLs soit contre la paroi de la boîte et la couche correspondant à l'adventice à la surface au contact du milieu.

Élimination de l'adventice :

Celle-ci est réalisée grâce à un premier traitement enzymatique. Les aortes sont placées pendant 45 minutes, à l'incubateur (95% O₂-5% CO₂, 37°C), dans une solution enzymatique de collagénase de type II (150 U/ml; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) diluée dans le milieu A. L'adventice est alors retirée mécaniquement, sous une loupe binoculaire, puis la média est transférée dans une nouvelle boîte contenant du milieu A à 37°C.

Dissociation des CMLs :

Le tissu musculaire est découpé en petits morceaux, 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 1300 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 CMLs dans le milieu A enrichi en sérum de veau fœtal (20% FBS, *Fetal bovine serum*; Gibco), constituant le "**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 CMLs isolées. Enfin, le tube de CMLs isolées est centrifugé (3 minutes à 1300 rpm), le culot est remis en suspension dans le milieu B et transféré à l'incubateur dans un flacon de culture cellulaire (25 cm²) préalablement traitée avec 5 µg/cm² de collagène de type I afin de permettre l'adhésion des CMLs.

2. Culture des CMLs aortiques

Les cellules sont tout d'abord maintenues dans le milieu B (milieu enrichi avec 20% FBS) pendant 48 heures afin de favoriser leur adhésion. Par la suite, le milieu est remplacé par le milieu de culture utilisé en routine (Milieu A additionné de 10% de FBS) qui est changé tous les deux à trois jours jusqu'à confluence des CMLs. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont repiquées et réensemencées dans un nouveau flacon de culture cellulaire (75 cm²). Pour cela, les cellules sont rincées avec du tampon PBS/Ca²⁺, Mg²⁺ (PBS : *Phosphate buffered saline*) afin d'éliminer le sérum et 2 ml de trypsine-EDTA (EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique) sont ensuite ajoutés au flacon qui est incubé pendant 2 à 3 minutes à 37°C afin de favoriser l'action de l'enzyme et le décollement des cellules. La réaction est arrêtée en ajoutant 8 ml de milieu de culture, les cellules sont transférées dans un tube, comptées à l'aide d'une cellule de Malassez puis réparties dans de nouveaux flacons de culture cellulaire.

Toutes les expériences ont été réalisées avec des CMLs en culture entre P2 et P6, qui sont ensemencées dans les boîtes de culture à deux densités cellulaires différentes :

- **Faible densité** (3.10^3 cellules/cm²): cet ensemencement permet d'obtenir des cellules isolées après 60 heures de culture.
- **Haute densité** (3.10^4 cellules/cm²): cet ensemencement permet d'obtenir des cellules confluentes après 60 heures de culture.

Pour les expériences de FRET, des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre sont utilisées. Elles 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 $\approx 2,5$ cm²). Ces mêmes boîtes sont utilisées pour les expériences de validation de la destruction des cavéoles par un marquage à la filipin III. Pour les autres expériences de biochimie et de biologie moléculaire (études de liaison spécifique, RT-qPCR, mesure des taux des nucléotides cycliques par une technique immuno-enzymatique, et dosage d'activité des PDEs-AMPC), les cellules sont ensemencées dans des boîtes de pétri en verre de 70 cm² (SCHOTT France, Clichy, France) afin de récolter la quantité de CMLs nécessaire pour ces expériences.

Congélation des CMLs :

Les CMLs pouvant être utilisées entre P2 et P6, il est possible de conserver des cellules dans l'azote liquide. Nous congelons environ 10^6 cellules par aliquot, dans du milieu B supplémenté de 10% de DMSO.

3. Phénotypage des CMLs aortiques de rat

Cent mille cellules sont ensemencées dans des plaques 12 puits contenant des lamelles en verre de 18 mm de diamètre, et incubées 24 heures à 37°C pour permettre leur adhésion. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, fixées pendant 15 minutes avec du PBS froid supplémenté avec 4% de paraformaldéhyde (PFA), puis perméabilisées avec du PBS enrichi de 0,2% de Triton X-100 pendant 5 minutes. Afin de neutraliser les aldéhydes libres qui peuvent être auto-fluorescents, les cellules sont incubées avec 50 mM de NH₄Cl pendant 30 minutes. Les sites non spécifiques sont bloqués dans du PBS supplémenté de 5% d'albumine de sérum bovin (BSA : *Bovin serum albumin*) pendant 45 minutes sous agitation lente (10 rpm/min). L'incubation avec l'anticorps primaire (dilué dans 500 µl de PBS additionné de 1% de BSA) est réalisée pendant la nuit, à 4°C sous agitation lente.

Pour vérifier le phénotype musculaire lisse des CMLs aortiques, les anticorps dirigés contre les protéines suivantes sont utilisés :

- α -actine du muscle lisse à 2,5 mg/ml (Acris antibodies, AP16262PU-N, Herford, Allemagne).
- Calponine à la dilution 1/200 (Santa Cruz Biotechnology, sc-28545, Dallas, TX, USA).
- Transgelin à la dilution 1/50 (Santa Cruz Biotechnology, sc-50466, Dallas, TX, USA).

Les cellules sont ensuite incubées, sous agitation lente et dans l'obscurité (pour protéger la sonde couplée à l'anticorps), avec l'anticorps secondaire approprié pendant 1 heure à température ambiante. Pour chacun des anticorps secondaires, un contrôle négatif est réalisé au moyen d'un puits contenant 500 μ l de PBS avec 1% de BSA (sans anticorps primaire).

Enfin, une incubation de 5 minutes sous agitation lente avec 4 μ M de Hoechst est réalisée afin de marquer les noyaux.

Entre chaque étape d'incubation, trois lavages au PBS ont été effectués.

Les lames, montées sur une goutte de milieu de montage Mowiol, sont stockées à l'obscurité, à 4°C, jusqu'à leur visualisation au microscope confocal TCS SP8 - gated STED Leica à la plateforme « MIPSIT » de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry).

II. Agents pharmacologiques

Tableau 3 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et leur concentration.

Les différents agents pharmacologiques qui se présentent sous forme de poudre ont été remis en solution dans différents solvants : acide ascorbique 0,1% (Iso), DMSO (BAY-60-7550, Cil, Filipin III, Ro, IBMX et MIMX), eau (Bétaxolol, Cch, CGP, ICI, L-85, M β CD, L-NAME, phentolamine et SNP), éthanol (Propranolol).

Agent pharmacologique	Propriété pharmacologique	Concentration	Fournisseur
BAY-60-7550	Inhibiteur de la PDE2	100 nM	Cayman Chemical
Bétaxolol	Antagoniste β_1 -adrénergique	1 pM à 100 μ M	Sigma Aldrich
Carbachol (Cch)	Agoniste des récepteurs muscariniques et nicotiniques	1 nM à 10 μ M (<i>cumulatif</i>)	Sigma Aldrich
CGP-20712A (CGP)	Antagoniste β_1 -adrénergique	100 nM 10 pM à 100 μ M	Sigma Aldrich
Cilostamide (Cil)	Inhibiteur de la PDE3	1 μ M	Tocris Bioscience
Filipin III	Molécule fluorescente capable de lier le cholestérol	0,05 mg/ml	Sigma Aldrich
ICI 118,551 (ICI)	Antagoniste β_2 -adrénergique	5 nM 0,1 nM à 10 μ M	Sigma Aldrich
[¹²⁵I]-Iodo-Cyanopindolol ([¹²⁵I]-ICYP)	Antagoniste β -adrénergique radioactif	145 pM	PerkinElmer
Isoprénaline (Iso)	Agoniste β -adrénergique	10 ou 100 nM 0,01 nM à 30 μ M (<i>cumulatif</i>)	Sigma Aldrich
L-858051 (L-85)	Activateur des ACs	10 ou 100 μ M	Biomol International
Méthyl-β-cyclodextrine (MβCD)	Chélateur de cholestérol	10 mM	Sigma Aldrich
Nω-nitro-L-arginine-méthyl ester (L-NAME)	Inhibiteur de NOS (NO Synthase)	300 μ M	Sigma Aldrich
Phentolamine	Antagoniste α -adrénergique	10 μ M	Sigma Aldrich
Propranolol	Antagoniste β -adrénergique	10 μ M	Sigma Aldrich
Prostaglandine F_{2a} (PGF_{2a})	Agoniste des récepteurs aux prostanoides FP	1 nM à 30 μ M (<i>cumulatif</i>)	Pfizer
Ro-20-1724 (Ro)	Inhibiteur de la PDE4	10 μ M	Calbiochem
Nitroprussiate de sodium (SNP)	Donneur de NO	1 μ M	Sigma Aldrich
3-isobutyl-1-méthylxantine (IBMX)	Inhibiteur non sélectif des PDEs	100 μ M ou 1 mM	Sigma Aldrich
8-méthoxyméthyl-3-isobutyl-1-méthylxanthine (MIMX)	Inhibiteur de la PDE1	10 μ M	Calbiochem

III. Réactivité vasculaire

A. Isolement de l'aorte de rat

L'animal est anesthésié au pentobarbital par injection intra-péritonéale à la dose de 60 mg/kg, il est ensuite pesé et placé en décubitus dorsal pour effectuer la thoracotomie. Après avoir extrait le cœur, l'aorte thoracique est rapidement prélevée et placée immédiatement dans une solution physiologique de Krebs froide (+4°C), dont la composition est détaillée dans le **tableau 4**. La crosse aortique est éliminée, l'aorte est ensuite débarrassée du tissu conjonctif et adipeux l'entourant et segmentée en plusieurs anneaux de 2 mm de long environ. Dans certains cas, un léger grattage est appliqué à la face interne des anneaux à l'aide d'une pince afin de léser l'endothélium. Ces anneaux dépourvus d'endothélium fonctionnel sont identifiés comme "ENDO⁻", par opposition aux anneaux non grattés appelés "ENDO⁺". Les segments d'aorte sont ensuite montés dans le système d'exploration fonctionnelle dont les cuves contiennent la solution physiologique de Krebs à 37°C oxygénée en continu par un mélange gazeux 95% O₂ - 5% CO₂.

Pour les expériences de biochimie et de biologie moléculaire, les tissus sont rapidement congelés dans de l'azote liquide.

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

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

B. Mesure de la réactivité vasculaire : système de cuves à organe isolé

L'anneau est placé dans la cuve à l'aide de deux crochets : un crochet fixe permettant de maintenir l'anneau dans la cuve et un second mobile reliant l'anneau à un capteur de force. L'acquisition et le traitement des signaux sont réalisés par PowerLab/8SP piloté par un logiciel LabChart Pro version 7.1 (ADInstruments, Paris, France). Ce système permet alors de suivre au cours du temps la force (en g) développée par la paroi du vaisseau (**Figure 15**).

Les anneaux sont passivement étirés par paliers de 0,5 g jusqu'à leur force de repos optimale de 2 g, reproduisant la tension physiologique subie par les parois des vaisseaux et permettant d'obtenir une réponse contractile optimale. Au début de chaque expérience, l'intégrité des vaisseaux est 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; **Tableau 4**). Les anneaux qui développent une contraction inférieure à 1,5 g ne sont pas conservés pour la suite du protocole expérimental. L'intégrité fonctionnelle de l'endothélium est évaluée par la capacité des anneaux pré-contractés au KCl 60 mM à se relâcher en réponse au carbachol (Cch, 10 μ 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.

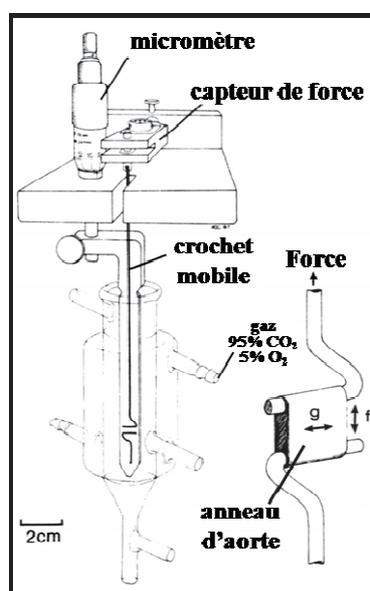
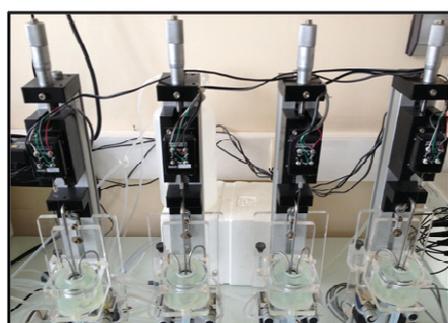


Figure 15: Représentation du système de cuves à organe isolé
(Adapté de (Angus and Wright 2000))

Suite à l'évaluation de l'intégrité des tissus, les anneaux sont équilibrés pendant 60 minutes en changeant la solution de Krebs toutes les 15 minutes, puis deux protocoles différents sont réalisés. Dans la première série d'expériences, l'enregistrement de la réponse contractile des anneaux d'aorte à des concentrations cumulatives (1 nM à 30 µM) de l'agent vasoconstricteur prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}: agoniste sélectif des récepteurs aux prostanoides FP) est réalisé.

Dans la seconde série d'expériences, les anneaux aortiques sont pré-contractés avec une concentration unique de PGF_{2α}, 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 sont réalisées dans les artères prétraitées en présence d'agents pharmacologiques suivant les voies de signalisation étudiées.

C. Analyse des données

Les réponses contractiles, exprimées en grammes, correspondent à la différence par rapport au tonus de base. Les réponses vasorelaxantes sont exprimées en pourcentage de la pré-contraction évoquée par la PGF_{2α}.

La concentration produisant 50% de la réponse maximale (CE₅₀) 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 (pD₂). Toutes les données sont exprimées en moyenne ± ESM, où « n » représente le nombre de rats.

IV. Mesure de la pression artérielle chez le rat par la technique du manchon caudal.

A. Principe et protocole

Il s'agit d'une mesure pléthysmographique de la pression artérielle chez le rat éveillé par *tail-cuff method* qui consiste à déterminer la contre-pression minimale capable d'arrêter le flux sanguin artériel par gonflage d'un manchon autour de la queue de l'animal. Ce principe de mesure est également appelé "*Volume pressure recording* ou VPR". Cette méthode non-invasive permet d'examiner des animaux dont le système cardio-vasculaire n'est pas déprimé par un produit anesthésique. Ce système a été décrit et mis au point par John E. Rogers et

James P. Rogers (Visitech Systems, Inc, Apex, NC, USA). Dans nos expériences, nous avons utilisé le système CODA-6 (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Le système CODA a déjà été validé par une étude le comparant à une méthode de télémétrie (Feng et al. 2008)

Les rats SHAM et IC étant sacrifiés au cours de la 22^{ème} semaine suivant l'intervention chirurgicale permettant l'induction de l'IC, la PA a été mesurée chez ces animaux au cours de la 21^{ème} semaine. Afin d'acclimater les animaux au système de mesure et de diminuer ainsi leur stress qui peut influencer les valeurs de PA enregistrées, 3 mesures sur 3 jours différents ont été réalisées pour chaque animal. Afin de réduire au maximum le stress de l'animal, les mesures sont réalisées dans une pièce calme, ventilée avec une température avoisinant les 20°C. L'exigence d'un environnement chauffé pour les animaux est essentielle pour des mesures précises de la PA. Pour fournir les conditions adéquates, l'animal, une fois placé dans le système de contention approprié, est posé sur une plaque chauffante et recouvert d'une couverture chauffante, ce qui permet de produire une vasodilatation périphérique.

B. Analyse des données

Trois paramètres sont mesurés : la pression artérielle systolique, la pression artérielle diastolique et la pression artérielle moyenne. A chaque journée de mesure, 20 enregistrements consécutifs sont réalisés pour chaque animal et uniquement les 10 dernières valeurs sont prises en compte dans le calcul de la moyenne (les 10 premières mesures permettant à l'animal de s'acclimater). Les valeurs moyennes des 3 jours de mesure sont par la suite moyennées pour chaque animal et enfin une moyenne et une erreur standard de la moyenne (ESM) sont calculées pour chaque groupe d'animaux (SHAM et IC).

V. Mesure des concentrations de nucléotides cycliques.

A. Mesure des concentrations d'AMPc et de GMPc, par une technique immuno-enzymatique.

1. Principe

Le dosage des nucléotides cycliques AMPc et GMPc est basé sur la technique de dosage compétitif d'immuno-absorption par enzyme liée (*Enzyme-linked immuno assay*, ELISA). Les puits de la plaque ELISA utilisée sont recouverts d'un anticorps spécifique des IgG de souris sur lequel vient se fixer un anticorps monoclonal de souris, spécifique de l'AMPc ou du GMPc. Le nucléotide cyclique (AMPc ou GMPc) contenu dans l'échantillon biologique va

alors se lier d'une manière compétitive à l'anticorps monoclonal en présence d'une quantité déterminée d'AMPC ou de GMPc conjugué à une peroxydase. L'excès de nucléotides cycliques conjugués à l'enzyme est éliminé suite à un lavage de la plaque et l'ajout du substrat permet d'obtenir une coloration dont l'intensité est inversement proportionnelle à la quantité des nucléotides cycliques contenus dans l'échantillon analysé.

2. Préparation des extraits tissulaires et cellulaires

Les nucléotides cycliques ont été extraits à partir d'aortes intactes de rats (SHAM et IC) et de CMLs en culture en utilisant le même tampon de lyse contenant : 0,1 M HCl et 1% Triton X-100. Cependant, le protocole de lyse diffère selon le matériel biologique utilisé :

- Les anneaux aortiques, sont dans un premier temps équilibrés dans la solution de Krebs pendant 1 heure (dans l'incubateur, à 37°C) puis traités avec les inhibiteurs sélectifs de PDEs (1 µM de Cilostamide pour la PDE3 ou 10 µM de Ro-20-1724 pour la PDE4) ou avec le véhicule (0,03% DMSO), pendant 30 minutes. Comme contrôle positif, certains anneaux aortiques sont traités avec l'inhibiteur non-sélectif des PDEs (100 µM IBMX) additionné de L-858051 (10µM L-85) pendant 15 minutes (contrôle positif de la production d'AMPC) ou de sodium nitroprusside (1 µM SNP) pendant 10 minutes (contrôle positif de la production de GMPc). L'inhibiteur de la NOS, le N ω -nitro-L-arginine-methyl ester (300 µM L-NAME) est rajouté dans la solution de Krebs des anneaux aortiques dépourvus d'endothélium "ENDO-", afin de s'affranchir totalement de la voie du NO dans cette condition. Après traitement, les tissus sont directement collectés dans des tubes contenant le tampon de lyse puis congelés dans de l'azote liquide afin de prévenir la dégradation des nucléotides cycliques. Le jour de l'expérience, les tissus sont décongelés sur glace, homogénéisés au moyen d'un broyeur d'échantillons biologiques (Precellys[®] 24, Bertin, Paris, France) et le broyat est ensuite transféré dans un tube Eppendorf.

- Les CMLs, après 48h de culture dans des boites de Pétri, sont détachées avec de la trypsine, comptées sur une cellule Mallasez puis centrifugées. Le culot est remis en suspension dans le tampon de lyse à 4°C puis transféré dans un tube contenant des billes en céramique (OZYME, Montigny-Le-Bretonneux, France) et homogénéisé avec le même broyeur d'échantillons (Precellys[®] 24). Le broyat est ensuite transféré dans un tube eppendorf.

A partir de cette étape, le protocole est le même pour les extraits tissulaires et cellulaires. Les tubes contenant les lysats sont centrifugés à 12000 g, pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les nucléotides cycliques est récupéré et utilisé pour le dosage.

3. Dosage immuno-enzymatique

La mesure des concentrations de nucléotides cycliques est réalisée avec un kit immuno-enzymatique pour l'AMPc ou le GMPc (New East Biosciences, King of Prussia, PA, USA).

La mesure de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre (Infinite[®] M200, TECAN, Lyon, France) à la longueur d'onde de 450 nm. Une gamme étalon de différentes concentrations d'AMPc et de GMPc est réalisée et la droite de standardisation obtenue permet alors de calculer la concentration d'AMPc et de GMPc contenue dans chaque échantillon.

4. Analyse et expression des résultats

- Pour les extraits tissulaires d'aortes de rats : La mesure a été effectuée en l'absence (véhicule : DMSO) ou en présence d'inhibiteurs sélectifs de la PDE3 ou de la PDE4. Ainsi, la concentration des nucléotides dans les anneaux aortiques traités aux inhibiteurs de PDEs est exprimée en pourcentage du niveau basal en présence du véhicule.

- Dans les extraits cellulaires de CMLs : La quantité d'AMPc est déterminée dans chaque échantillon cellulaire puis normalisée à la quantité de protéines mesurée dans chaque échantillon (pmol d'AMPc/ μ g de protéines).

B. Mesure du taux d'AMPc intracellulaire par imagerie *in situ* par transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET)

1. Principe de fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). En effet, lorsque la molécule absorbe un photon, elle change de niveau d'énergie électronique et passe de l'état fondamental S_0 à l'état excité S_1 . Le retour de la molécule excitée à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières. L'une d'entre elles est l'émission d'un photon, c'est le phénomène de fluorescence (**Figure 16**). Chaque fluorophore est caractérisé par ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission. En excitation monophotonique, les photons émis ont toujours une longueur d'onde plus grande que les photons absorbés. Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, décrit par la loi de Stokes, est essentiel pour la séparation et la détection de la lumière de fluorescence délivrée par le fluorophore (**Figure 16**).

Le principe de fluorescence est utilisé dans les microscopes à fluorescence et les microscopes confocaux à balayage laser.

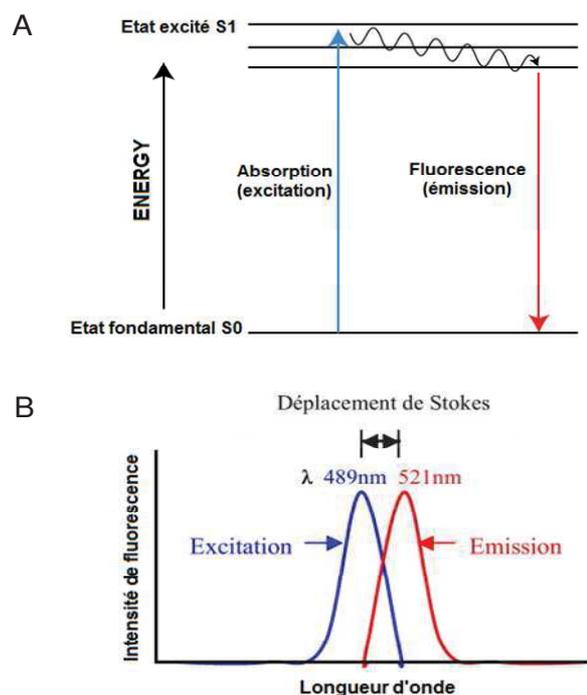


Figure 16 : Diagramme de Jablonski simplifié (A) et déplacement du spectre d'émission de la fluorescence (B). (Szepetiuk et al. 2012)

2. Principe de la technique FRET

Le principe du FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) a été décrit par Förster en 1948. Il s'agit d'un processus par lequel l'énergie est transférée, de façon non radiative, 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. Un 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, la distance entre les fluorophores considérés ($<100 \text{ \AA}$) et une orientation appropriée des dipôles de transition électronique (**Figure 17**). Les méthodes permettant de mesurer l'efficacité de ce transfert sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude des interactions entre macromolécules. 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.

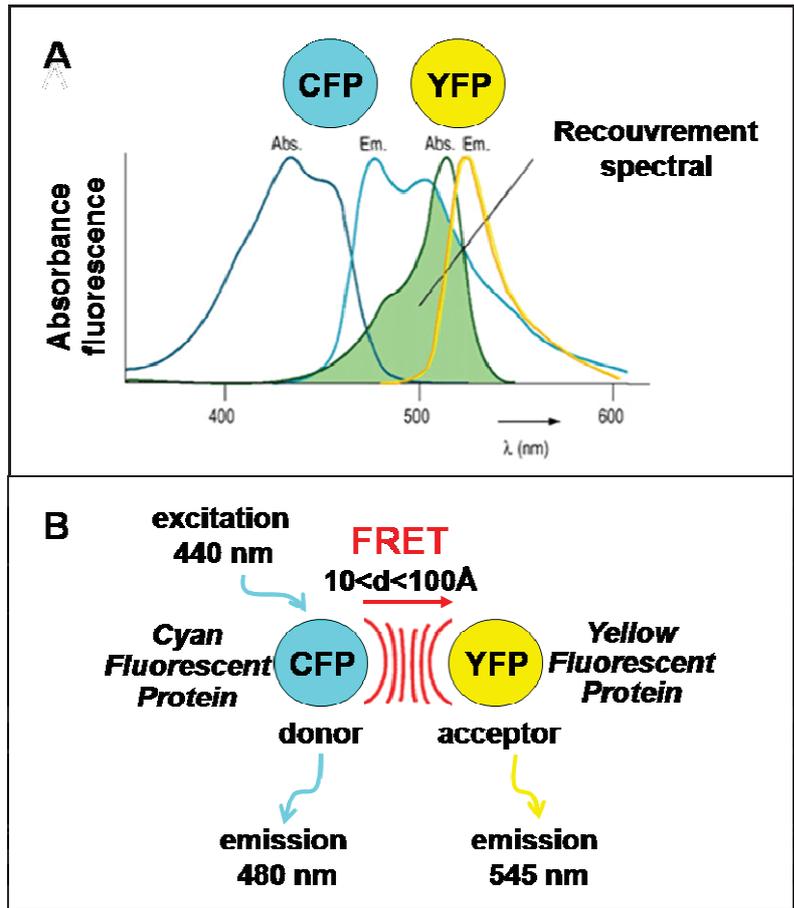


Figure 17 : Les conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une YFP).

Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur (A) et lorsque ces fluorophores présentent une orientation et une distance ($<100 \text{ \AA}$) favorables (B).

3. La sonde FRET "Epac2-camps"

La sonde FRET utilisée, nommée Epac2-camps, code pour un domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac, plus précisément de l'isoforme 2B, flanqué du fluorophore YFP (*Yellow fluorescent protein*) sur l'acide glutamique 285 et du fluorophore CFP (*Cyan fluorescent protein*) sur l'acide glutamique 443 (Nikolaev et al. 2004). Cette sonde permet de mesurer les taux d'AMPc intracellulaire.

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 messenger au niveau du domaine de liaison de la sonde Epac2-camps induit un changement conformationnel de la protéine et un

éloignement des deux fluorophores. Ceci conduit à l'arrêt du phénomène de FRET (**Figure 18**). Le rapport « fluorescence émise par CFP/fluorescence émise par YFP » (CFP/YFP) est donc proportionnel à la concentration en AMPc.

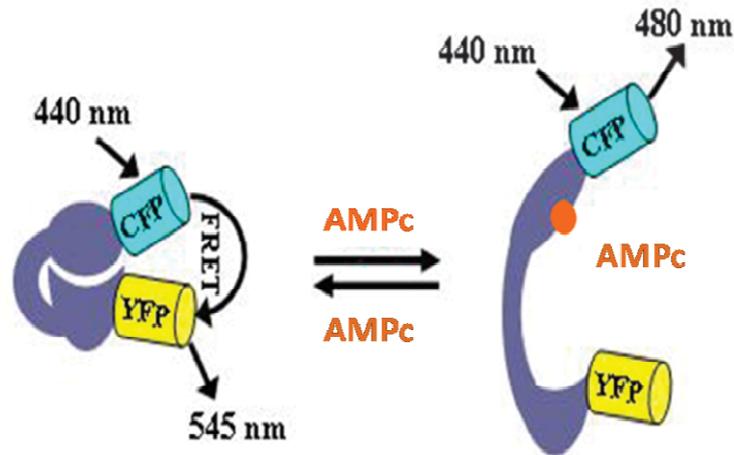


Figure 18: Représentation du phénomène de FRET de la sonde Epac2-camps.
Adapté de (Nikolaev et al. 2005)

L'augmentation de l'AMPc induit un changement conformationnel de la sonde et un éloignement des fluorophores CFP et YFP. Ceci conduit à l'arrêt du phénomène de FRET.

4. Installation microscopie 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). Les cellules fluorescentes sont sélectionnées et placées à l'embouchure d'un système de perfusion externe contenant dans chaque capillaire, une solution d'intérêt. 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 se fait toutes les 5 secondes. Toutes les images sont stockées sur le disque dur.

5. Expression de la sonde FRET Epac2-camps

Les CMLs sont ensemencées dans les boîtes de culture à deux densités cellulaires différentes (Voir paragraphe I.B.2 des Matériel et Méthodes). La sonde FRET Epac2-camps est exprimée grâce à une infection adénovirale réalisée 12 heures après l'ensemencement. Le milieu de culture des cellules est alors remplacé par du milieu contenant l'adénovirus. Les expériences de FRET sont réalisées 48h plus tard.

La quantité d'adénovirus utilisée dépend de la capacité d'infection de celui-ci. 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. Dans nos expériences, nous avons utilisé une MOI de 500-1500 pfu/cellule sur les cellules ensemencées à faible densité et une MOI de 300 pfu/cellule sur les cellules ensemencées à haute densité.

6. Destruction des structures cavéolaires et validation par un marquage à la filipin III

Dans certaines expériences de FRET, les cellules à haute densité sont traitées avec un agent chélateur de cholestérol, la méthyl- β -cyclodextrine (10 μ M M β CD, solubilisée dans du ringer) pendant 1 heure à 37°C afin de détruire les structures cavéolaires. Pour la condition contrôle, les cellules sont incubées dans les mêmes conditions dans du ringer.

Afin de valider l'effet de ce traitement, un marquage à la filipin III a été réalisé de la manière suivante : Le milieu de culture est changé le lendemain de l'ensemencement des cellules, puis après 48 heures de culture, le milieu de culture est éliminé, et les cellules sont rincées avec du PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Les cellules sont par la suite traitées avec 10 mM de M β CD durant 1 heure, à 37°C. Pour la condition contrôle, les cellules sont incubées dans les mêmes conditions dans du ringer. Les cellules sont par la suite rincées avec du PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ puis fixées par 4% de PFA pendant 15 minutes à température ambiante. Une fois fixées, les cellules sont incubées 30 minutes avec 50 mM NH_4Cl afin de neutraliser le PFA. Elles sont ensuite marquées par la filipin III à 0,05 mg/ml (préparée dans du PBS contenant 10% de FBS) durant 2 heures à température ambiante. Les cellules sont enfin rincées avec du PBS, puis observées en microscopie à fluorescence en utilisant un filtre UV (340-380 nm) ainsi qu'un miroir dichroïque 430LP (Long Pass). Les images sont acquises puis stockées sur un disque dur. L'analyse d'image est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ qui permet de mesurer

la fluorescence sur chaque cellule sélectionnée, la fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité de cholestérol dans la cellule. Une diminution du niveau de fluorescence refléterait alors une déplétion du cholestérol et une destruction des structures cavéolaires.

7. Protocole expérimental de FRET

Tout d'abord, le milieu de culture des CMLs est remplacé par une solution physiologique de Ringer dont la composition est détaillée dans le **tableau 5** et dans laquelle les cellules sont maintenues tout au long de l'expérience. Les différents agents pharmacologiques utilisés (**Tableau 3**) sont préparés dans le Ringer.

Tableau 5: Composition de la solution de Ringer utilisée lors des expériences de FRET.

Composé	Concentration (en mM)
HEPES	10
NaCl	121,6
Glucose	5
Na pyruvate	5
NaHCO₃	4,013
NaH₂PO₄	0,8
KCl	5,4
CaCl₂	1,8
MgCl₂	1,8
pH	7,4

Afin d'évaluer l'implication des sous-types de récepteurs β -ARs et des familles de PDEs dans la régulation des signaux AMPc, une stimulation brève à l'isoprénaline (10 ou 100 nM, 15 secondes) en absence ou en présence des inhibiteurs de PDEs et/ou des antagonistes des récepteurs β_1 ou β_2 -AR, est réalisée. Chaque inhibiteur est appliqué de façon continue avant (pendant 4 minutes pour les inhibiteurs de PDEs et 15 min pour les antagonistes β -ARs) et après le pulse d'isoprénaline.

8. Analyse des données

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 $CFP/YFP \pm ESM$. 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 19**). La moyenne ($\pm ESM$) des paramètres cinétiques est calculée pour chaque condition expérimentale.

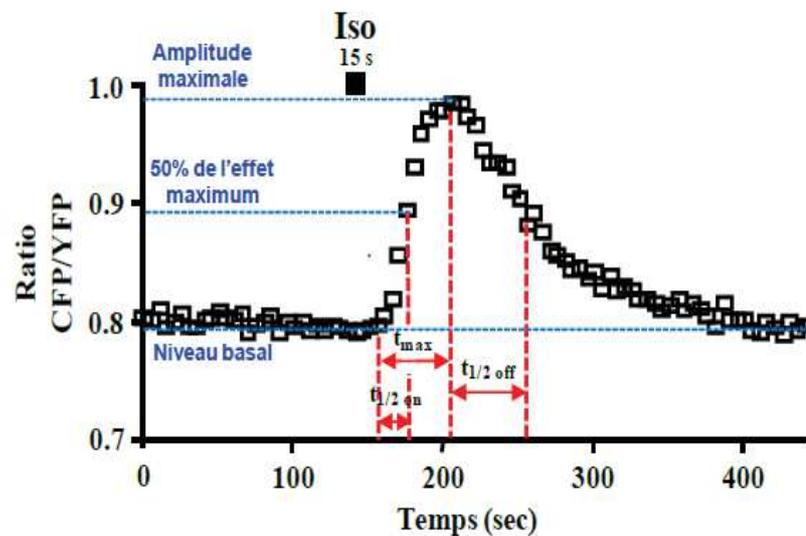


Figure 19 : Paramètres cinétiques des signaux AMPc en réponse à une stimulation β -adrénergique transitoire (pulse d'isoprénaline de 15 sec)

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

A. Extraction et dosage des ARNs totaux

Les anneaux aortiques prélevés des rats SHAM et IC et conservés à -80°C sont pesés, broyés et homogénéisés dans 1 ml de TRIZOL[®] (mrcgene, Cincinnati, Ohio, USA) à l'aide d'un l'homogénéisateur de tissus (Procellys[®] 24, Bertin, Paris, France). Les CMLs sont recueillies par application de la trypsine, puis centrifugées. Le culot cellulaire est rincé avec du PBS puis homogénéisé dans 1 ml de TRIZOL[®] à l'aide de l'homogénéisateur de tissus.

L'homogénat est incubé 5 min à température ambiante, puis 200 µl de chloroforme y sont ajoutés. Les tubes sont alors manuellement et vigoureusement agités et incubés pendant 3 min à température ambiante. Par la suite, ils sont centrifugés à 10000 g pendant 15 min à 4°C. Cette étape permet de séparer par solubilisation différentielle les acides nucléiques des protéines, les ARN étant insolubles dans le phénol contenu dans le TRIZOL[®]. La phase aqueuse contenant les ARN est prélevée puis transférée dans un tube. Les ARN sont précipités par ajout de 500 µl d'isopropanol et incubés à -20°C sur la nuit. Le précipité est récupéré par centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot d'ARN est lavé deux fois avec 200 µl d'éthanol 75% (v/v) et centrifugé à 12000 g pendant 5 min à 4°C à chaque lavage. Au final, l'éthanol surnageant est éliminé et les tubes sont laissés ouverts à température ambiante pendant 15 min pour permettre l'évaporation de l'éthanol. Le culot est ensuite repris dans 15 µl d'eau ultrapure dépourvue de nucléases (*DNase-RNase free*, Invitrogen, St Aubin, France). La solubilisation des ARN extraits est optimisée par la congélation des échantillons à -80°C pendant une heure.

Les ARN extraits sont dosés en duplicat par mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm avec un spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf[®], Montesson, France), après dilution au 1/100 dans de l'eau *DNase-RNase free*. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg/µl d'ARN. Un ratio de mesure de densité optique DO_{260nm} / DO_{280nm} compris entre 1,7 et 2 traduit une qualité d'extraction correcte (peu de contamination par des protéines).

B. Transcription inverse des ARN

Il s'agit de la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN. Pour cela, des amorces poly-T et/ou un mélange aléatoire d'hexamères sont utilisés. Ces amorces sont capables de s'hybrider respectivement soit à l'extrémité poly A soit à la séquence

correspondante de l'ARNm (matrice). Cela constitue le point d'ancrage pour la transcriptase inverse qui va synthétiser le brin d'ADN complémentaire de l'ARN matrice en utilisant les désoxyribonucléotides. La transcription inverse est réalisée à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant le kit iScript DNA synthesis (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Trois incubations successives à différentes températures sont réalisées dans un thermocycleur CFX 96 (BioRad) : 5 min à 25°C, puis 30 min à 42°C et enfin 5 min à 85°C. Les ADNc sont ensuite conservés à -80°C. Des réactions contrôles « RT₀ » réalisées en omettant la reverse transcriptase, sont effectuées en parallèle et seront utilisées pour vérifier l'absence de contamination de la réaction de PCR par amplification de l'ADN génomique.

C. PCR quantitative en temps réel

La PCR en temps réel est une méthode très sensible, rapide et permettant une quantification relative fiable d'un ADNc. Contrairement à la PCR classique (où l'on évalue par densitométrie le produit de PCR final sur un gel), la PCR en temps réel permet de mesurer le produit formé à chaque cycle d'amplification.

Cette technique repose sur le principe d'une PCR classique, qui est une méthode d'amplification génique *in vitro* créée par K. Mullis (prix Nobel de chimie; 1993). Elle permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN connue à partir d'une faible quantité d'amorces complémentaires (20-25 nucléotides). Cette procédure est constituée de cycles répétés de dénaturation de l'ADN par la chaleur, d'hybridation des amorces à leurs séquences complémentaires, et d'extension de ces amorces hybridées par l'ADN polymérase. Le produit obtenu peut ensuite servir de matrice au cycle suivant.

La courbe de croissance du produit au cours d'une PCR comprend 3 phases : une phase initiale de bruit de fond, une phase d'allure exponentielle et une phase de plateau où la vitesse de réaction est amortie par l'épuisement du substrat, la dénaturation de l'enzyme et l'accumulation de produits inhibiteurs. L'analyse de la mesure en temps réel permet d'accéder à la portion de la réaction où l'amplification est d'allure exponentielle. Celle-ci contient l'information quantitative puisqu'elle obéit à la loi mathématique suivante reliant la quantité de produit formé à la quantité initiale de matrice.

$$N_n = N_0 (1+E)^n$$

N_n : nombre de molécules d'amplicon formées au cycle n .

N_0 : nombre initial de copies de la séquence à amplifier.

E : efficacité de la PCR.

n : nombre de cycles de PCR.

Le SYBR Green I (contenu dans le Kit *SSO Fast™ Eva Green® supermix*, Roche Diagnostics, Meylan, France) est utilisé comme fluorophore afin de détecter les produits de PCR synthétisés. Cette molécule a pour propriété de devenir fluorescente lorsqu'elle lie l'ADN double brin (ou ADN non dénaturé). La fluorescence émise mesurée pendant l'étape d'élongation est proportionnelle à la quantité de produit formé. Le paramètre mesurée est la valeur du cycle seuil ou C_t « cycle threshold » à partir duquelle le niveau de fluorescence devient détectable. Celui-ci est représentatif du nombre de copies initial dans l'échantillon d'ADNc. La valeur du C_t est inversement proportionnelle au logarithme de la quantité de séquence amplifiable.

Cette technique est réalisée en utilisant le *LightCycler®* (Roche Diagnostics); à la plateforme de transcriptomique et protéomique « TRANS-PROT » de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry).

Les réactions de PCR ont été effectuées dans des plaques 96 puits dans un milieu réactionnel composé d'ADNc, des amorces sens et anti-sens, de SYBR-Green, de dNTP (mélange des quatre désoxyribonucléotides) et de la Taq-polymérase.

Ce milieu réactionnel est soumis à des paliers de températures successifs : une étape d'activation de la Taq polymérase de 30 secondes à 95°C, puis 45 cycles constitués chacun de 2 étapes : une première étape, dite de « dénaturation » (5 secondes à 95°C). Elle permet de déshybrider les brins d'ADN, de décrocher les polymérases encore liées et d'homogénéiser le milieu réactionnel. La seconde étape d'hybridation-élongation (20 secondes à 60°C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider à la matrice d'ADN et aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire à partir des dNTPs libres dans le milieu. A la suite des 45 cycles, un protocole permet de réaliser une courbe de fusion. Celui-ci consiste à passer de 45°C à 75°C, par pallier de 0,1°C. Ce protocole permet de vérifier l'unicité du produit de la réaction PCR.

L'efficacité "E" de la PCR, de chaque couple d'amorce est déterminée à l'aide d'une gamme de dilutions d'ADNc d'un échantillon choisi au hasard parmi les échantillons à étudier. La valeur de E est calculée par le logiciel du *LightCycler®* d'après la droite de

régression des valeurs de Ct obtenues pour chacune de ces dilutions. Une PCR de bonne qualité est caractérisée par une efficacité comprise entre 90 et 110%. Les gènes de normalisation *TBP*, *RPL32* et *Ywhaz* (**Tableau 6**) ont été choisis pour leur stabilité d'expression entre les différentes conditions expérimentales étudiées, cette stabilité d'expression a été évaluée avec le logiciel GeNorm (<https://genorm.cmgg.be/>).

D. Choix des amorces

La spécificité des amorces pour la séquence à amplifier est une condition importante pour toutes les variantes de PCR. Les amorces utilisées au cours de cette étude ont été conçues au moyen du logiciel Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) et leur spécificité a été vérifiée par le logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/Blast.cgi>). Les amorces « sens » et « anti-sens » ont été choisies au sein de 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 PDEs, des récepteurs β -ARs, des marqueurs du phénotype cellulaire ainsi que des gènes de références, utilisées dans cette étude sont rapportées dans la **Tableau 6**.

Tableau 6: Amorces utilisées pour la PCR quantitative.

Col1a1 : Collagène de type 1, Col3a1 : Collagène de type 3, NM-MHC : *Non-muscle myosin heavy chain* (Chaîne lourde de myosine non musculaire), Pb : paire de bases, RPL 32 : Ribosomal protein L32, Tagln : *Transgelin*, SM-MHC : *Smooth-muscle myosin heavy chain* (Chaîne lourde de myosine du muscle lisse), TBP : Tata box binding protein, Yhwaz : 14-3-3 protein zeta/delta.

Gènes	N° d'accension GeneBank	Amorces sens 5'→3' antisens 3'→5'	Taille de l'amplicon (Pb)	Température d'hybridation (°C)
<u>Isoformes de PDEs</u>				
PDE1A	NM_030871	GAAGTTTCGCAGCATTGTCC GCAGGATATGTCAAACCAACC	96	60
PDE1B	NM_022710	TGCAGTCCACAACCTGTCTCA CCCAGTTCAAAGAGAAGACA	65	60
PDE1C	NM_031078	GCAGTGCAAGCTGGGATATT TTACAGCCGGTGGATAGCTC	82	60
PDE2A	NM_001143847	CTGTGCTGGCTGCACTCTAC GAGGATAGCAATGGCCTGAG	77	60
PDE3A	NM_017337	ACCTCCCTGCCCTGCATAC CCTCTCTTGTGGTCCCATTTC	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	GACCCTGTCTTCTCTGTTGA AACCGTCTCAGGATCACACC	99	60
PDE4D	NM_001113328	GCCAGCCTTCGAAGTGAAG ATGGATGGTTGGTTGCACAT	98	60
PDE7A	NM_031080	TTGGAATTTTGATATCTTTCTGTTG CTCAATCAATCCATGAAGACTAAA	97	60
PDE7B	NM_080894	GGCCATGCACTGTTACTTGA CCAGAGGTGTGAGGAAGCTC	56	60
PDE8A-1	NM_198767	CGGAGGTTTTTCAGGAAATGA GGCCAACCTGGCTTGAAGAT	69	60
PDE8A-2	NM_198767	TGAGGTCTAGACAGCGATGG CACATGCCCTGTAGAATCCA	189	60
PDE8B	NM_199268	GCCTCATTCGTTGACACACA GGCGATTCTGTAGGCTTGG	98	60
<u>Récepteurs β-ARs</u>				
Rc β ₁ -AR	NM_012701	GCTGCAGACGCTACCA GCGAGGTAGCGGTCCAG	212	60
Rc β ₂ -AR	NM_012492	CACAGCCATTGCCAAGTTCG CGGGCCTTATTCTTGGTCAGC	287	60

Marqueurs du phénotype cellulaire				
Tagln	NM_031549	GATGGAACAGGTGGCTCAAT TGGGATCTCCACGGTAGTGT	179	60
NM-MHC	NM_013194	GGGAGACTCCACAGACCTCA TCTTCTTCAGGGCCATGTTC	155	60
SM-MHC	NM_001170600	TGGTGGAAAACGGAAAGAAG CACAGAAGAGGCCCGAGTAG	183	60
Col1a1	NM_053356	CTCAAGATGTGCCACTCTGACT CTCCATGTTGCAGTAGACCTTG	99	60
Col3a1	NM_032085	GATGGAACCCCTGGATCAGA GCACCAGGAGAACCATTTTC	89	60
Gènes de référence				
RPL32	NM_013226	GCTGCTGATGTGCAACAAA GGGATTGGTGACTCTGATGG	115	60
TBP	NM_001004198	CGGTTTGCTGCAGTCATCAT GTGCACACCATTTTCCAGAA	82	60
Ywhaz	NM_013011	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA GAAGCATTGGGGATCAAGAA	127	60

Remarque : Pour la PDE8A, deux amorces différentes ont été utilisées, l'amorce PDE8A-1 pour la première étude "Rôle des PDEs-AMPC dans la réactivité vasculaire au cours de l'IC" et l'amorce PDE8B-2 pour la seconde étude "Influence de la confluence cellulaire sur la voie de signalisation de l'AMPC dans les CMLVs".

E. Expression des résultats

La quantification du niveau d'expression des différents gènes a été réalisée à partir du calcul du « *threshold cycle* » (C_t ou cycle-seuil), comme expliqué plus haut. De façon à intégrer les variabilités dues aux manipulations (telle que le pipetage) et/ou d'efficacité de la transcription inverse, les résultats de l'amplification d'un gène d'intérêt sont comparés à l'amplification d'un gène de référence ou « gène de ménage » dont l'expression dans les cellules ou tissus est supposée ne pas varier en fonction des conditions expérimentales. Dans la plupart des cas, plusieurs gènes de référence sont utilisés pour la normalisation des résultats de PCR. L'utilisation du logiciel GeNorm propose un algorithme permettant de sélectionner les gènes de référence les plus stables. Cet algorithme est basé sur le calcul de la moyenne géométrique des valeurs de C_t des gènes de référence. Les gènes de référence apparaissant comme les plus stables sont donc analysés par PCR dans chaque échantillon en parallèle des gènes d'intérêt et les C_t obtenus sont utilisés comme un facteur de normalisation.

Les résultats obtenus sont exprimés comme suit : Le cycle seuil (Ct) du gène d'intérêt est soustrait de la moyenne des Ct du groupe contrôle (cellules ensemencées à faible densité, *LD-RASMCs*) du même gène pour calculer $(1+E)^{\Delta Ct}$ suivant la méthode du $2^{\Delta Ct}$. Le même calcul est appliqué pour la moyenne géométrique des Ct pour les gènes de ménage. L'expression relative de l'ARNm est ensuite définie par le calcul du ratio suivant :

$$(1+E)^{\Delta Ct \text{ (gène d'intérêt)}} / (1+E)^{\Delta Ct \text{ (gènes de ménage)}}. \text{ Où } E = \text{efficacité de la PCR.}$$

VII. Etude de l'expression et de l'activité des phosphodiésterases

A. Western Blot

La technique de Western Blot permet la détection, l'identification et la quantification de protéines spécifiques au sein d'un échantillon biologique. Au cours de notre étude, nous avons utilisé cette technique dans le but de détecter différentes isoformes de PDEs (PDE3A, PDE3B, et PDE4B) et de comparer leur expression entre l'aorte de rats contrôles (SHAM) et l'aorte de rats IC. Des aortes isolées à partir de souris invalidées pour le gène codant pour la PDE4B (PDE4B^{-/-}) (Jin and Conti 2002) et les souris sauvages correspondantes ont été utilisées comme contrôle de la spécificité de l'anticorps pour cette protéine.

1. Préparation des extraits protéiques

L'extraction des protéines à partir des anneaux aortiques de rats et de souris est réalisée avec le broyeur d'échantillons biologiques Precellys[®] 24 dans le tampon de lyse contenant [Tris-HCl (pH 8) 50 mM, déoxycholate de sodium 0,5% (v/v), NaCl 150 mM, dodécylsulphate de sodium (SDS) 0,1% (v/v), triton x-100 1% (v/v), cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche Diagnostics)]. Le lysat tissulaire est récupéré sur glace durant 30 minutes puis centrifugé (12000 g, 10 minutes, 4°C). Le surnageant contenant l'ensemble des protéines cellulaires est alors récupéré, aliquoté et congelé à -80°C.

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé avec un *kit* de dosage colorimétrique *SMART™ Micro BCA Protein Assay* (iNtRON Biotechnology, Paris, France), celui-ci contient un réactif de révélation "l'acide bicinchoninique" et une solution BSA à 2 mg/ml. Le principe repose sur la réduction des ions Cu²⁺ en Cu⁺ par les protéines en milieu alcalin. Deux molécules d'acide bicinchoninique interagissent avec un ion Cu²⁺ pour former un complexe violet. La mesure de

l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre (Infinite[®] M200) à la longueur d'onde de 560 nm. Une gamme étalon de différentes concentrations de BSA est réalisée en duplicate et la droite de standardisation obtenue permet alors de calculer la concentration protéique de l'échantillon.

3. Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. 50 µg de protéines totales sont diluées dans un tampon de charge Laemmli [contenant : β-mercaptoéthanol 2,5% (m/v), glycérol 5% (v/v), bleu de bromophénol 0,001% (m/v), Tris-HCl (pH 6,8) 62,5 mM], et incubées 5 minutes à 95°C. Les protéines sont alors dénaturées et chargées négativement par le SDS et le β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont déposés sur le gel d'électrophorèse constitué :

- d'un premier gel de concentration, constitué de : acrylamide 5% (m/v), Tris (pH 6,8) 127 mM, SDS 0,1% (m/v), TEMED 0,1% (v/v), persulfate d'ammonium 0,1% (v/v).
- et d'un second gel de séparation à 8% d'acrylamide, constitué de : acrylamide 8% (m/v), Tris (pH 8,8) 375 mM, SDS 0,1 % (m/v), TEMED 0,04 % (v/v), persulfate d'ammonium 0,1% (v/v).

Les échantillons sont concentrés dans le premier gel sous l'action d'un champ électrique de 80 V pendant 30 minutes, puis séparés dans le second gel sous l'action d'un champ électrique de 120 V pendant 1h30, dans un tampon de migration [contenant : Tris Base 25 mM, glycine 190 mM, SDS 0,1%]. Un marqueur de poids moléculaires est déposé et migre en même temps que les échantillons.

4. Transfert des protéines sur membrane

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) qui servira de support pour l'immunomarquage. La membrane est préalablement activée par du méthanol et équilibrée par un tampon de transfert [contenant : Tris base 25 mM, glycine 190 mM, méthanol 20% (v/v)]. Chargée positivement, elle est mise au contact du gel et retient donc les protéines chargées négativement. Le transfert est effectué pendant 1h30 à 4°C sous l'action d'un champ électrique de 120 V.

5. Immunomarquage et révélation

La membrane est saturée 1 heure avec 5% (m/v) de lait dissout dans un tampon TBS-Tween [tampon TTBS : Trizma-HCl 0,153 M, NaCl 1,36 M, Tween 0,1% (v/v)]. Cette étape

permet de saturer les sites non occupés de la membrane et de prévenir la fixation non spécifique d'anticorps. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt : une nuit à 4°C pour la PDE3A, la PDE3B, et la PDE4B et 2 heures à température ambiante pour la β -actine. Après 3 lavages de 10 minutes au TTBS, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié, couplé à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP). L'anticorps anti- β -actine, étant déjà couplé à une peroxydase, ne nécessite pas d'utilisation d'anticorps secondaire avant la révélation.

Les protéines d'intérêt sont mises en évidence par chimioluminescence. Les membranes sont incubées dans l'obscurité pendant 5 minutes avec le substrat de la peroxydase (Kit Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Ce substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux qui est restitué en une image numérique par un analyseur d'image équipé d'une caméra CCD ChemiDocTM (BioRad).

6. Anticorps utilisés

Anticorps	Animal hôte	Dilution	Provenance
Anti-PDE3A	Lapin	1/10000	Dr Chen Yan (université de Rochester, NY, USA)
Anti-PDE3B	Lapin	1/1000	Dr Emilio Hirsch (université de Turin, Italie)
Anti-PDE4B	Lapin	1/10000	Dr Marco Conti (université de Californie, CA, USA)
Anti β -actine	Poulet	1/20000	Santa Cruz Biotechnology (sc-47778, Dallas, TX, USA)
Anti IgG lapin	Âne	1/10000	Santa Cruz Biotechnology (sc-2313, Dallas, TX, USA)

7. Analyse et quantification

L'intensité des différentes bandes est quantifiée par densitométrie à l'aide du logiciel Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad). Le rapport des intensités des bandes protéine d'intérêt/ β -actine est calculé pour chaque condition (SHAM et IC), et un pourcentage de variation de l'intensité par rapport au contrôle (groupe de rats SHAM) permet de déterminer le niveau d'expression de la protéine d'intérêt dans les deux groupes d'animaux. Au moins 3

Western Blot différents sont réalisés pour chaque condition et une moyenne \pm ESM est déterminée.

B. Dosage d'activité des PDEs-AMPC

1. Principe

L'activité d'hydrolyse de l'AMPC par les PDEs est mesurée par dosage radioenzymatique suivant une adaptation de la méthode décrite par Thompson et Appleman (Thompson and Appleman 1971). La méthode est basée sur l'hydrolyse du 3',5'AMPC en 5'-AMP par les PDEs, qui est ensuite transformé en nucléoside par la 5'-nucléotidase contenue dans du 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 3',5'AMPC tritié dans la réaction permet de quantifier l'activité des PDE-AMPC qui est proportionnelle à la radioactivité mesurée dans les fioles.

2. Préparation des extraits protéiques

Les protéines totales sont extraites à partir d'aortes de rats SHAM et IC, ou de CMLs en culture. Les extraits protéiques tissulaires et cellulaires sont obtenus avec le même tampon de lyse [composition (en mM) : NaCl 150, Hepes 20 (pH 7,4), EDTA 2, NP-40 0,5%, et un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics)], au moyen du broyeur d'échantillons biologiques (Precellys[®] 24) et de billes en céramique.

Les extraits tissulaires sont obtenus par homogénéisation de 3 ou 4 anneaux d'aorte dans 200 μ l de tampon de lyse.

Les extraits cellulaires sont réalisés après 48h de culture des CMLs : 6 boîtes de culture de cellules à faible densité regroupées (~ 2120000 cellules) et une boîte de culture de cellules à haute densité (~ 3940000 cellules). Le culot cellulaire obtenu après détachement des cellules des boîtes de culture avec de la trypsine et centrifugation est remis en suspension dans 500 μ l de tampon de lyse.

Les lysats obtenus sont ensuite transférés dans un tube eppendorf maintenu sur glace pendant 30 minutes, puis centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant l'ensemble des protéines est récupéré et la concentration protéique de chaque échantillon est mesurée comme décrit dans la partie VI.A.2 des Matériels et Méthodes.

3. Protocole de dosage de l'activité PDEs-AMPC

L'activité PDE-AMPc a été mesurée sur les extraits protéiques (20 µg de protéines issues des anneaux aortiques et 25µg de protéines issues des CMLs en culture) dans des tubes contenant un volume réactionnel de 200 µL [comprenant : 10 mM Tris-HCl (pH8), 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoéthanol, 1 µM d'AMPc froid et 10⁵ cpm de [³H]-AMPc (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)]. Après 25 minutes d'incubation à 33°C, la réaction est arrêtée par ajout de 200 µl d'une solution contenant 200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA (pH 8), suivi d'une incubation dans un bain marie bouillant pendant 1 minute. Le produit de réaction, le 5'-AMP, est ensuite hydrolysé par l'incubation du mélange réactionnel avec 50 µg de venin de serpent (*Crotalus atrox*; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 20 minutes à 33°C. L'adénosine résultante est séparée par chromatographie d'échange d'anions en utilisant 2 ml de résine AG1-X8 (BioRad) et récupérée dans des fioles contenant du liquide de scintillation. La quantification est réalisée à l'aide d'un compteur à scintillation à (BECKMAN COULTER, Villepinte, France).

Deux séries de tubes ne contenant pas de protéines sont préparées :

- la première, 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. Cette mesure est réalisée afin de calculer le pourcentage d'hydrolyse pour chaque tube.
- la seconde, pour déterminer le « blanc » : la radioactivité est mesurée sur l'éluant après séparation sur les colonnes de résine échangeuse d'anions. Cette valeur de radioactivité est par la suite soustraite pour chaque mesure réalisée.

La quantité de protéines utilisée dans ce dosage est déterminée par le pourcentage d'hydrolyse du nucléotide en absence d'inhibiteur qui doit être compris entre 7 et 15% suivant ce calcul :

- % d'hydrolyse = [(X-blanc) / (radioactivité totale - blanc) x 100], où X=radioactivité de l'éluant de l'échantillon contrôle.

4. Analyse des résultats

Afin de minimiser les fluctuations et d'apprécier la reproductibilité des mesures, chaque tube est réalisé en triple. Une fois l'activité enzymatique calculée (selon les équations ci-dessous), une moyenne des trois valeurs est calculée :

- Activité enzymatique (*pmol/min/cellule*) = [(% d'hydrolyse x quantité du substrat AMPc) / (temps d'incubation x nombre de cellules)]

- Activité enzymatique (*pmol/min/mg de protéines*) = [(% d'hydrolyse x quantité du substrat AMPc) / (temps d'incubation x quantité de protéines)]

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 PDEs. L'activité d'hydrolyse résiduelle observée en présence d'inhibiteur de PDEs a été exprimée en pourcentage de l'activité PDE-AMPc totale correspondant à l'activité PDE en absence d'inhibiteur.

VIII. Etudes de liaison spécifique sur les récepteurs β -ARs.

A. Principe des études de liaison spécifique par compétition

Les techniques de liaison spécifique (ou *binding*) ont été initialement développées pour déterminer l'affinité de ligands pour des sites de liaison ou récepteurs donnés. Ces techniques peuvent être également adaptées pour caractériser les récepteurs exprimés sur une préparation tissulaire, cellulaire ou membranaire, en utilisant des ligands connus de ces récepteurs.

Dans notre étude, nous avons réalisé des expériences de liaison spécifique par compétition (ou déplacement) afin de caractériser l'expression des sous-types β_1 - et β_2 -AR dans les CMLs d'aorte de rat en culture. Ces expériences sont réalisées en présence d'une concentration fixe d'un ligand radioactif, le [125 I]-Iodo-Cyanopindolol ([125 I]-ICYP), ligand non sélectif des récepteurs β -ARs et dont l'affinité pour ces récepteurs est connue. Le déplacement de la liaison du [125 I]-ICYP à ces récepteurs est évalué par ajout de concentrations croissantes d'un ligand compétiteur sélectif soit du sous-type β_1 -AR, le CGP ou le bétaxolol, soit du sous-type β_2 -AR, l'ICI.

L'analyse de la courbe de déplacement du [125 I]-ICYP par ces ligands sélectifs des sous-types β_1 - et β_2 -AR, permet de déterminer les valeurs de CI_{50} (concentration du ligand qui déplace 50% du ligand radiomarqué) et de calculer la constante d'inhibition K_i de ce ligand, qui traduit son affinité pour un récepteur donné, et également d'évaluer l'abondance relative des différents sous-types de récepteurs β -ARs dans la préparation cellulaire.

B. Obtention des préparations cellulaires

Dans un premier temps, nous avons mis au point le protocole expérimental sur des lignées cellulaires de cellules HEK (*Human Embryonic Kidney*) surexprimant soit le récepteur β_1 -AR soit le récepteur β_2 -AR, ces lignées sont utilisées en routine dans le laboratoire du Dr Ralf Jockers (Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes). Les cellules ont été cultivées dans des plaques de culture - 6 puits, à confluence, elles sont recueillies à la pipette dans le milieu de culture utilisé pour les CMLs et diluées de façon à avoir la quantité de cellules nécessaire pour chaque condition (~14750 cellules pour les cellules HEK surexprimant le récepteur β_1 -AR et 50000 cellules pour les cellules HEK surexprimant le récepteur β_2 -AR). Dans ces conditions, les expériences de liaison par compétition sont donc réalisées sur cellules intactes en utilisant le CGP et l'ICI comme compétiteur sélectif du récepteur β_1 -AR et du récepteur β_2 -AR, respectivement (**Figure 20**).

Pour les CMLVs, les expériences de *binding* ont été réalisées sur des préparations membranaires préparées comme suit : après 48 heures de culture en boîte de pétri, les CMLs d'aorte de rat sont rincées avec du PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ puis grattées mécaniquement à l'aide d'un grattoir à cellules dans 1 ml de milieu de culture des CMLs, et recueillies dans un tube conique de 50 ml. Les cellules de 24 boîtes de culture de cellulesensemencées à *faible densité* et de 3 boîtes de culture de cellulesensemencées à *haute densité* sont regroupées dans chaque tube. Le contenu du tube est ensuite complété avec du milieu de culture pour avoir un volume de suspension cellulaire égal à 45 ml. La suspension cellulaire est répartie dans 3 tubes coniques de 50 ml puis broyée à l'aide d'un homogénéiseur-disperseur de cellules (ULTRA-TURRAX®T25 digital, IKA). Une légère centrifugation, réalisée afin d'atténuer la mousse formée après le broyage des cellules, est suivie d'une centrifugation à 50000 g, pendant 45 minutes à 4°C. Le culot obtenu est repris dans le volume nécessaire de milieu de culture pour les protocoles à réaliser, ce qui constitue la préparation membranaire. Afin d'avoir une quantité de matériel biologique suffisante pour chaque expérience, 6 culots cellulaires sont regroupés pour chaque condition expérimentale.

Sur ces préparations membranaires, nous avons dans un premier temps réalisé des expériences de liaison par compétition en utilisant le CGP et l'ICI comme compétiteur sélectif du récepteur β_1 -AR et du récepteur β_2 -AR, respectivement. Comme, les résultats obtenus n'étaient pas concluants, nous nous sommes rabattus sur un autre ligand sélectif du récepteur β_1 -AR, le bétaxolol. Ce ligand est couramment utilisé dans la littérature pour la réalisation des expériences de liaisons spécifiques par compétition afin de déterminer les proportions des sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Bristow et al. 1986).

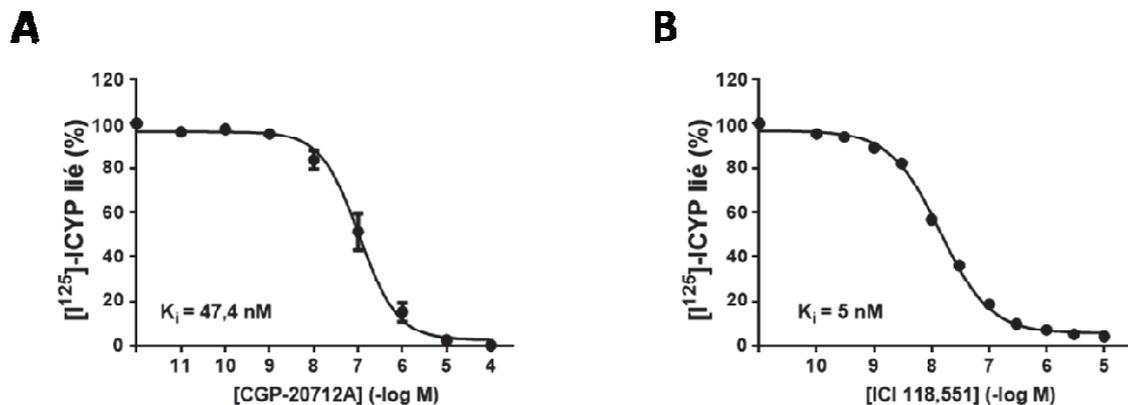


Figure 20 : Expériences de liaison spécifique par compétition du [125 I]-ICYP sur des cellules HEK surexprimant le récepteur β_1 - ou β_2 -AR.

A : Courbe de compétition du [125 I]-ICYP avec l'antagoniste des récepteurs β_1 -AR (CGP-20712A, CGP) sur des cellules HEK surexprimant le récepteur β_1 -AR. **B** : Courbe de compétition du [125 I]-ICYP avec l'antagoniste des récepteur β_2 -AR (ICI 118,551, ICI) sur des cellules HEK surexprimant le récepteur β_2 -AR.

C. Protocole expérimental de l'étude de compétition du [125 I]-ICYP par les ligands des récepteurs β_1 - ou β_2 -AR

1- Etape de compétition des sites de liaison :

La réaction se fait dans un volume final de 250 μ l contenant :

- 100 μ l de préparation membranaire pour les CMLs ou de suspension cellulaire pour les cellules HEK.
- 50 μ l de ligand radiomarqué, l' [125 I]-ICYP (activité spécifique = 2200 Ci / mmol) ; ce volume correspond à une concentration de 145 pM, valeur proche de la constante de dissociation (K_D) du [125 I]-ICYP pour les récepteurs β -ARs (Hoffmann et al. 2004, Mader 1992) et concentration située dans le même ordre de grandeur que celle utilisée dans la littérature pour ce type d'expériences.
- 100 μ l de ligand sélectif d'un des deux sous-types de récepteurs β -ARs, le CGP (à la concentration finale de 10^{-11} M à 10^{-4} M), ou le bétaxolol (à la concentration finale 10^{-12} M à 10^{-4} M) pour le récepteur β_1 -AR et l'ICI (à la concentration finale 10^{-10} M à 10^{-5} M) pour le

récepteur β_2 -AR. Des solutions mères de ces ligands ont été préalablement préparées dans le milieu de culture des CMLs.

En parallèle, deux autres séries de tubes sont préparées :

- Pour mesurer la liaison totale du [125 I]-ICYP aux récepteurs β -ARs, les préparations et suspensions cellulaires sont incubées avec le [125 I]-ICYP seul, du milieu de culture y est alors ajouté afin d'obtenir un volume réactionnel final de 250 μ l.
- Pour mesurer la liaison non spécifique du [125 I]-ICYP, les préparations et suspensions cellulaires sont incubées avec le [125 I]-ICYP en présence de propranolol, ligand froid non sélectif des récepteurs β -ARs, utilisé à forte concentration (10^{-5} M).

Afin de minimiser les fluctuations et d'apprécier la reproductibilité des mesures, chaque condition expérimentale est réalisée en duplicat ou triplicat.

Les tubes sont alors incubés dans un bain marie à 25°C pendant 2 heures.

2- Etape de filtration et quantification de la radioactivité :

Une fois l'incubation terminée, la réaction est arrêtée par ajout de 4 ml de PBS dans chaque tube. Le contenu de chaque tube est ensuite filtré à travers une membrane qui va retenir toutes les particules dont la taille est supérieure à 0,7 μ m (Filtre en microfibre de verre, Grade GF/F, Whatman[®]), à l'aide d'un collecteur d'échantillons 1225 (Millipore[®]). La radioactivité contenue dans les membranes est mesurée à l'aide d'un compteur à rayons γ .

D. Analyse des résultats

Pour les expériences réalisées avec le bétaxolol, l'analyse des données a été réalisée, par le Pr François Dauphin (EA 4259, Université de Caen Normandie), à l'aide de programmes spécifiques d'ajustement de courbes par régression non-linéaire appelés EBDA (Equilibrium Binding Data Analysis) et LIGAND de Munson et Rodbard (Munson and Rodbard 1980), modifiés par McPherson (McPherson 1985). Ces programmes sont utilisés pour estimer et calculer les paramètres pharmacologiques de la liaison spécifique à partir des expériences de compétition.

Les données brutes (en désintégration par minute, dpm) sont d'abord analysées par le programme EBDA qui calcule le coefficient de Hill (nH), permettant de vérifier si la théorie de la loi d'action de masse est respectée, à savoir l'existence d'un seul site de liaison par

récepteur, et donne les premières estimations des différents paramètres pharmacologiques de liaison. Ce logiciel EBDA permet également de convertir la radioactivité mesurée en dpm en concentrations molaires, qui sont ensuite utilisées par le programme LIGAND pour l'analyse finale et le calcul des valeurs de densité de récepteurs (B) et d'affinité du bétaxolol (K_i). Par la suite, l'application du test statistique de Fisher, inclus dans le programme LIGAND, permet de comparer ces valeurs entre le modèle à un site de liaison et le modèle à deux sites de liaison. Cette démarche analytique a été également appliquée pour la réalisation d'une co-analyse des différentes expériences de la même condition expérimentale. Ceci a pour avantage d'augmenter fortement le pouvoir statistique de chaque analyse individuelle, ce qui est essentiel pour la caractérisation de plusieurs populations de sites de liaison avec des affinités très proches et/ou une proportion déséquilibrée entre les deux sites de liaison (de haute et de basse affinité), par exemple 10% / 90% (McPherson et al. 1985). A cet égard, les données brutes ont été mises à l'échelle sur la base des niveaux de la liaison totale du [125 I]-ICYP (en l'absence de bétaxolol, B_0), puis analysées à l'aide des paramètres de correction (ratios B_0) comme valeurs fixes.

Quant aux données des expériences réalisées avec le CGP et l'ICI, elles ont été analysées avec le logiciel GraphPadPrism 6. Le % de liaison spécifique est calculé pour chaque point expérimental selon l'équation suivante :

% de liaison spécifique = Liaison spécifique / Liaison spécifique totale.

$$= \frac{[(\text{radioactivité mesurée (cpm)} - \text{radioactivité mesurée en présence de propranolol (cpm)}) / (\text{Radioactivité mesurée en absence de ligand (cpm)} - \text{radioactivité mesurée en présence de propranolol (cpm)})], \text{ cpm} : \text{Coup Par Minute}}{1}$$

Les valeurs de % de liaison spécifique sont utilisées pour créer des courbes de compétition à l'aide du logiciel GraphPadPrism 6. Pour les expériences réalisées avec les cellules HEK, une valeur de CI_{50} (concentration du ligand qui déplace 50% du ligand radiomarqué) a été estimée pour chaque courbe de compétition en utilisant l'équation de Boltzmann puis la constante d'inhibition (K_i) est calculée selon l'équation suivante :

$$K_i = IC_{50} / 1 + ([^{125}I\text{-ICYP}] / K_d)$$

La moyenne des K_i a été ensuite calculée pour les cellules HEK sur-exprimant le récepteur β_1 -AR.

Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm ESM

RESULTATS

I. Influence de la densité cellulaire sur la voie de signalisation de l'AMPC dans les CMLVs

A. Introduction

L'AMPC est un second messenger ubiquitaire exerçant un rôle vasculoprotecteur, par ses effets relaxants et inhibiteurs de la prolifération et de la migration cellulaires (McDaniel et al. 1994). Ce second messenger est synthétisé par une famille d'enzymes, les adénylates cyclases, suite à l'activation de récepteurs couplés aux protéines Gs, notamment les récepteurs β -adrénergiques. Les trois sous-types de récepteurs β -ARs (β_1 , β_2 et β_3) participent à l'effet vasorelaxant, cependant, leur localisation cellulaire (endothéliale et/ou musculaire lisse) et leur contribution dans les voies de signalisation impliquées varient en fonction du lit vasculaire (Flacco et al. 2013). L'implication de ces récepteurs dans la vasorelaxation est bien établie (Guimaraes and Moura 2001), en revanche, très peu d'études se sont intéressées à leur expression et à leur fonction dans les CMLVs en culture. Mader et al, ont montré que les deux sous-types de récepteurs β_1 et β_2 -ARs étaient exprimés dans les CMLs d'aorte de rat avec une proportion de 13% et 87 %, respectivement (Mader 1992). Une diminution de la production de l'AMPC suite à une stimulation β -AR a été observée lors du passage des CMLs aortiques (Crass Iii et al. 1992). Cette diminution n'est plus observée lorsque l'AC est directement activée par l'application de la forskoline, suggérant ainsi une modulation phénotypique en amont de l'AC (Crass Iii et al. 1992). Concernant l'implication de ces récepteurs dans la migration des CMLVs, l'un des processus pathologiques impliqué dans la formation d'une néo-intima (observée notamment dans l'athérosclérose et la resténose après angioplastie), des travaux ont montré que ce processus était inhibée par la voie de l'AMPC et notamment suite à l'activation des récepteurs β -ARs (Johnson et al. 2006).

Les niveaux intracellulaires d'AMPC sont finement régulés par sa dégradation par les phosphodiesterases, enzymes dégradant les nucléotides cycliques, AMPC et GMPc, limitant ainsi leur diffusion cellulaire et contribuant à leur compartimentation cellulaire. Actuellement, une centaine d'isoformes de PDEs ont été identifiées et classées en 11 familles. Dans la CMLV, 3 familles principales de PDEs hydrolysant l'AMPC (PDE-AMPC) ont été décrites comme étant actives, la PDE1, la PDE3 et la PDE4 (Palmer and Maurice 2000, Johnson-Mills et al. 1998, Zhai et al. 2012) et l'expression d'ARNm codants différentes isoformes a été rapporté (Zhai et al. 2012). Il est à présent reconnu que la diversité moléculaire des PDEs

participe à la formation de complexes subcellulaires de signalisation et à leur spécificité fonctionnelle (Leroy et al. 2008, Fischmeister et al. 2006, Zhai et al. 2012).

Lors de leur mise en culture *in vitro* ou lors de lésions vasculaires *in vivo*, les CMLVs peuvent subir un changement phénotypique avec le passage d'un phénotype quiescent/contractile à un phénotype prolifératif/synthétique. Ce processus est associé à un changement de l'expression et de l'activité des PDE-AMPC (Dunkerley et al. 2002, Zhai et al. 2012). Cependant, les conditions de culture peuvent affecter le phénotype cellulaire et, notamment, le maintien des CMLVs à haute densité favoriserait un état différencié, non prolifératif (Chamley-Campbell and Campbell 1981, Vallot et al. 2000). Par ailleurs, il a été décrit, dans un autre modèle cellulaire, les cellules HEK, que les voies de signalisation couplées au récepteur β_2 -AR pouvaient être modulées par la confluence cellulaire (Kaya et al. 2012).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la densité cellulaire sur la voie de signalisation β -AR/AMPC/PDEs dans un modèle de cellules musculaires lisses d'aorte de rat (CMLVs) en culture. Le premier objectif était de déterminer les concentrations d'AMPC en condition basale et après stimulation des récepteurs β -ARs, ainsi que la contribution relative des deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la production de ce second messenger, dans deux conditions d'ensemencement cellulaires différentes (un ensemencement à faible densité ou haute densité, correspondant, respectivement, à des cellules sub-confluentes ou confluentes). Nous avons également évalué le rôle des principales familles de PDEs-AMPC, la PDE3 et le PDE4, dans l'hydrolyse de l'AMPC dans ces deux conditions expérimentales. Pour réaliser ces expériences, nous avons appliqué une technique d'imagerie de fluorescence FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), à l'aide d'une sonde basée sur la protéine Epac sensible à l'AMPC, Epac2-camps, permettant un suivi spatio-temporel des concentrations d'AMPC dans les cellules vivantes intactes (Nikolaev et al. 2005). Cette caractérisation fonctionnelle a été associée à des expériences biochimiques afin d'évaluer la densité membranaire des deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs et de déterminer le profil d'expression des différentes isoformes de PDEs-AMPC (par RT-PCR quantitative) et d'activité de la PDE3 et de la PDE4 (par dosage radio-enzymatique) des CMLVs ensemencées aux deux différentes densités.

B. Résultats: *Article 1 "Influence of cell density on cAMP pathway of vascular smooth muscle cells"*

M Belacel-Ouari, L Zhang, F Hubert, R Assaly, R Gerbier, R Jockers, F Dauphin, R Fischmeister, B Manoury, V Leblais.

Article en cours de soumission.

Influence of cell density on the cAMP signalling pathway in vascular smooth muscle cells

Authors: M Belacel-Ouari¹, L Zhang¹, F Hubert^{1,*}, R Assaly^{1,*}, R Gerbier², R Jockers², F Dauphin³, R Fischmeister¹, B Manoury¹, V Leblais¹.

¹ UMR-S 1180, INSERM, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

² INSERM, U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris, France

³ EA 4259, Université de Caen Normandie, Caen, France

* Current addresses for: F H, UMR-S 910, INSERM, Aix-Marseille University, Medical School La Timone, Marseille, France ; and R A, Unité «Handicap Neuromusculaire : Physiopathologie, Biothérapie et Pharmacologie appliquées - End-icap », PELVIPHARM, Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, Université Paris-Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France.

Correspondence to: V Leblais, UMR-S 1180, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J-B Clément 92296 Châtenay-Malabry, France.

E-mail: veronique.leblais@u-psud.fr; Tel: +33-1.46.83.59.06; Fax: +33-1.46.83.54.75.

ABSTRACT

The influence of cell confluence on the β -adrenoceptor (β -AR)/cAMP/phosphodiesterase (PDE) pathway was investigated in cultured rat aortic smooth muscle cells (RASMCs).

Cells were plated either at low density (LD: 3.10^3 cells/cm²) or high density (HD: 3.10^4 cells/cm²) corresponding to non-confluent or confluent cells, respectively, on the day of experiment.

β -AR-stimulated cAMP was monitored in real-time using the fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cAMP sensor, Epac2-camps. A brief application (15 s) of the β -AR agonist isoprenaline (Iso) induced a typical transient FRET signal, reflecting cAMP production followed by its rapid degradation. The amplitude of this response, which increased with the concentration of Iso (10 or 100 nM), was higher in HD than in LD cells, whatever the Iso concentration used. However, activation of adenylyl cyclase by L-858051 (100 μ M) induced a similar saturating response in both LD and HD cells. A β_1 -AR antagonist (CGP 20712A, 100nM) reduced the Iso (100 nM) response in HD but not LD cells, whereas a β_2 -AR antagonist (ICI 118,551, 5nM) reduced this response in both conditions. Competitive [¹²⁵I]-ICYP binding experiments with betaxolol, a β -AR ligand, identified two binding sites in HD cells, corresponding to β_1 - and β_2 -ARs with a proportion of 11% and 89%, respectively, but only one binding site in LD cells, corresponding to β_2 -ARs. However, mRNA expression of β_1 - and β_2 -ARs was similar in both cell types. Total cAMP-PDE activity (assessed by a radioenzymatic assay) was increased in HD cells compared to LD cells. This increase was associated with a rise in mRNA expression of five cAMP-PDEs isoforms (PDE1A, 3A, 4A, 4B and 7B) in HD cells, and a decrease in basal [cAMP]_i (assessed by an EIA assay). PDE4 inhibition with Ro-20-1724 (10 μ M) strongly prolonged the Iso response in LD and HD cells, whereas PDE3 inhibition with cilostamide (1 μ M) potentiated Iso response only in LD cells. Interestingly, inhibition of PDE4 unmasked an effect of PDE3 in HD cells.

Our results show that in cultured RASMCs, the β -AR/cAMP/PDE signaling pathway is substantially modulated by the cellular density. In HD cells, Iso response involves both β_1 - and β_2 -AR stimulation and is mainly controlled by PDE4, whereas in LD cells, Iso response involves only β_2 -AR stimulation and is controlled by PDE4 and PDE3. The low density state is associated with an absence of membrane expression of the β_1 -AR, a lower cAMP-PDE activity and a higher basal [cAMP]_i. This study highlights the critical role of the cellular environment in controlling the vascular β -AR signaling.

KEY-WORDS

β -adrenoceptor, cAMP, phosphodiesterase, vascular smooth muscle cell, cell density.

ABBREVIATIONS

AC, adenylyl cyclase; a.u., arbitrary units; AUC: area under the curve; β -AR, β -adrenoceptor; cAMP, cyclic AMP; cAMP-PDEs, PDEs hydrolysing cAMP; GPCR, G protein-coupled receptor; PDEs, phosphodiesterases; RASMCs, rat aortic smooth muscle cells; SMC, smooth muscle cell; VSMCs, vascular smooth muscle cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the animal core facility (IPSIT, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France) for efficient animal care. We are thankful to Valérie Nicolas (IPSIT), Patrick Lechêne (UMR-S1180), Florence Lefebvre (UMR-S1180) and Claudine Deloménie (IPSIT) for technical assistance in imaging, FRET experiments, cell isolation and RT-PCR experiments, respectively, and also to Drs Grégoire Vandecasteele and Bertrand Crozatier for helpful discussions.

This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC) - French Society of Cardiology (PhD fellowships to M BO), by the University Paris-Sud (Bonus Attractivité Paris-Sud 2009-2012 to F H and V L) and by the China Scholarship Council (PhD fellowship to L Z).

1. INTRODUCTION

In the vascular system, cyclic AMP (cAMP) is a key physiological second messenger, which inhibits contraction, proliferation and migration of the smooth muscle cells (SMCs) ^{1, 2}. β -adrenoceptors (β -ARs) are G protein-coupled receptors (GPCRs) which primarily signal through Gs proteins to stimulate cAMP synthesis by adenylyl cyclase (AC) isoenzymes. These receptors are classified into three subtypes (β_1 , β_2 and β_3), encoded by 3 different genes ³.

All three β -ARs subtypes are expressed in vessels (in endothelial cells and/or SMCs) and contribute to the regulation of vascular tone, by eliciting a vasodilation responsible for a decrease in peripheral vascular resistance. The β_2 -AR subtype is classically described as the most important in mediating this vasorelaxant effect ⁴. In some vascular beds, functional expression of β_3 -AR is reported to mediate endothelial NO-dependent vasorelaxation and/or neoangiogenesis ^{5 6}.

Several cardiovascular pathologies, e.g. hypertension, myocardial infarction and heart failure are associated with a decrease in the vascular β -AR expression and/or the β -AR-mediated vasorelaxation ⁷⁻¹⁰.

In normal blood vessels, vascular SMCs (VSMCs) exhibit a contractile/quiescent differentiated phenotype. Under pathological remodeling of the vascular wall, a trans-differentiation of VSMCs toward a secretory/proliferative state occurs which is known to play an important role in the development of atherosclerotic lesion and/or postangioplasty neointimal formation ¹¹. This phenotypic modulation is also observed in isolated VSMCs maintained in primary and secondary cultures ¹². However, specific conditions under which the cell seeding is performed may influence this phenotype modulation. Indeed, it has been described that in primary cultures of rat and pig aortic SMCs, the contractile phenotype was maintained when the cells were seeded at a high initial density ^{13, 14}.

The expression and function of β -ARs under phenotypic modulation of VSMCs has been scarcely investigated. In one study performed in cultured aortic SMCs, the authors showed a decrease in cAMP synthesis under β -AR stimulation subsequent to consecutive passages of these cells ¹⁵. This alteration was not observed after direct AC stimulation by forskolin, suggesting a phenotypic modulation upstream of AC activity ¹⁵. Receptor binding studies

showed that both β_1 - and β_2 -ARs were expressed in cultured rat aortic SMCs (RASMCs) after 4 passages, with a proportion of 13% and 87%, respectively ¹⁶.

Intracellular concentration of cAMP ($[cAMP]_i$) is controlled by its production by AC and its degradation by specific enzymes, the 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). These enzymes represent the main route to rapidly lower cAMP levels inside the cells. PDEs constitute a highly diverse superfamily of enzymes including eleven families that differ in their primary structure, catalytic properties, substrate specificity (cAMP *versus* cGMP) and/or affinity, as well as in their mechanisms of regulation ^{17, 18}. PDE families are encoded by several genes, which together generate close to 100 different PDE isoforms by alternative mRNA splicing. VSMCs express a variety of mRNAs encoding cAMP-hydrolysing PDEs (cAMP-PDEs) ^{9, 19, 20}, with PDE1, PDE3 and PDE4 families being the most abundant. Interestingly, the profile of vascular cAMP-PDE activity depends on the SMC phenotype. Indeed, the vascular synthetic phenotype is generally associated with a reduction in PDE3A activity and an increase in PDE1C function ²¹, without any modification in PDE4 activity ²².

While there are evidence that specific culture conditions, including cell density, modulate VSMCs phenotype, the specific influence of cell density on cAMP pathway has, however, not been explored. Interestingly, in HEK cells, cell-cell contact has been shown to modulate the β_2 -AR pathway ²³. Thus, the aim of the present study was to characterize the modulation of β -ARs/cAMP/PDEs pathway by cellular density in RASMCs maintained in culture. Our objective was to determine $[cAMP]_i$ under basal condition or following β -AR stimulation at low or high culture density, and to evaluate the relative contribution of the β_1 - and β_2 -AR subtypes and the two main cAMP-PDE families, PDE3 and PDE4, in the production and hydrolysis of cAMP, respectively. For this purpose, we took advantage of the Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-based imaging technique, using the Epac-based sensor Epac-2-camps which allows cAMP dynamics monitoring in intact living cells ²⁴. This functional characterization was coupled to biochemical assays to quantify the density of the β_1 - and β_2 -AR sub-types (by competition binding experiments) and to evaluate the expression and activity patterns of cAMP-PDE isoforms (by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments and PDE radioenzymatic assay, respectively).

2. MATERIALS and METHODS

2.1 Animals

All animal care and experimental procedures complied with the ARRIVE guidelines and conform to the European Community guiding principles in the Care and Use of Animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament), the local Ethics Committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines, and the French decree no. 2013-118 of February 1st, 2013 on the protection of animals used for scientific purposes (JORF n°. 0032, February 7th, 2013, p2199, text no. 24). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (No. D-92-283, December 13th, 2012).

2.2 Pharmacological agents

Betaxolol hydrochloride, CGP-20712A methanesulfonate salt (CGP), filipin III, ICI 118,551 hydrochloride (ICI), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), (-)-isoprenaline hydrochloride (Iso), methyl- β -cyclodextrin (M β CD) and propranolol were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Cilostamide (Cil) was from Tocris Bioscience (Bristol, UK), iodo-cyanopindolol ([¹²⁵I]-ICYP) from PerkinElmer (Villebon-sur-Yvette, France), L-858051 (L-85) from Biomol International (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), and Ro-20-1724 (Ro) from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK).

As all PDE inhibitors stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich), control experiments were performed in the presence of equivalent concentrations of DMSO, not exceeding 0.03%.

2.3 Cell isolation and culture

RASMCs were isolated from the thoracic medial layer aorta of adult male Wistar rat as previously described²⁰. Cells were routinely seeded in flasks coated with collagen I (rat tail, Corning, Amsterdam, Netherlands) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing antibiotics / antimycotic (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL amphotericin B; GIBCO) and supplemented with 10% fetal bovine serum "Gold" (FBS; GIBCO). All experiments were performed on cells at passage 2 to 6. As shown in **Figure S1**, typical genes being a hallmark of SMC phenotype were expressed in cultured RASMCs. In order to prepare cells for

experiments testing the influence of cell density, cells were seeded on to collagen-coated glass coverslips for FRET experiments or on to collagen-coated glass-bottom Petri dishes for other assays, either at a density of $3 \cdot 10^3$ cells/cm², referred to as the low density (LD) condition, or at a density of $3 \cdot 10^4$ cells/cm², referred to as the high density (HD) condition.

2.4 FRET imaging

The Epac2-camps FRET-based cAMP sensor comprises the single cAMP-binding domain of Epac2 protein fused to an enhanced yellow fluorescent protein (YFP) and an enhanced cyan fluorescent protein (CFP) ²⁴. FRET between CFP and YFP occurs when cAMP does not bind the probe. When an increase in intracellular cAMP concentration ($[cAMP]_i$) occurs, this favors cAMP binding to the Epac2 domain, promoting reversible conformational changes of the sensor, resulting in a decrease in FRET between CFP and YFP ²⁴.

RASMCs were infected with an adenovirus encoding Epac2-camps (MOI 500-1500 or 300 pfu/cell for the LD or HD condition, respectively) in DMEM containing 10% FBS. FRET experiments were performed 48 hours after infection, as previously described ²⁰. All drugs were diluted in Ringer solution ²⁰. Briefly, a transient increase in $[cAMP]_i$ under β -AR stimulation was induced by perfusing the cell with Iso at 10 or 100 nM as a 15 s pulse. To evaluate the effect of pharmacological agents on the dynamics of this response, PDE inhibitors and β -AR antagonists were added 4 and 15 min before the application of Iso, respectively, and maintained throughout the duration of the experiment. In one set of experiments, the direct AC activator L-85 (a water-soluble forskolin analogue) was added and maintained in order to maximally increase $[cAMP]_i$. Then IBMX was subsequently added on a steady state was reached.

In some experiments, cells were beforehand incubated with 10 mM M β CD (or Ringer solution as a control) for 1 hour at 37°C, to extract membrane cholesterol and disrupt caveolae ²⁵. The degree of cholesterol depletion was assessed by staining SMCs with the cholesterol-binding agent filipin III ²⁶. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde during 15 min at room temperature, stained with 0.05 mg/ml filipin III which fluorescently labels unesterified cholesterol and then observed using standard epifluorescence microscopy (Axio Observer.D1, Zeiss).

FRET data were expressed as percentage of the initial ratio of CFP/YFP emitted fluorescence intensities measured just before Iso or L-85 application. Kinetic parameters of the Iso (or L-

85)-induced variations of the 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[®] Office Excel software.

2.5 [¹²⁵I]-ICYP binding experiments

Cells, maintained in culture medium for 48 hours after plating, were washed with cold PBS, and harvested by scraping in 1 ml ice-cold culture medium. Cell suspensions were homogenized with a Polytron homogenizer (Janke & Kunkel Ultra-Turrax T25) three times for 5 s at the maximal setting. The lysate was centrifuged at 450 g for 5 min at 4 °C, and the supernatant was then centrifuged at 50,000 g for 45 min at 4°C. The final pellet was resuspended in cell culture medium. Binding assays were carried out in a final volume of 250 µl, containing cell suspension, 145 pM of the radioligand [¹²⁵I]-ICYP and betaxolol at concentrations ranging from 10⁻¹² M to 10⁻⁴ M. Incubation was carried out for 2 hours at 25°C under shaking and terminated by addition of 4 ml PBS. Then, rapid filtration was performed through Whatman GF/C glass fiber filters previously soaked in PBS containing 0.3% polyethyleneimine (to reduce nonspecific binding) using a compact cell harvester (Millipore[®] 1225 Sampling Vacuum Manifold). Filter-bound radioactivity was measured in a gamma counter. All determinations were performed at least in duplicates. Non-specific binding of [¹²⁵I]-ICYP was determined in the presence of 10 µM propranolol. Specific binding was defined as the difference between total and non-specific binding²⁷.

2.6 Quantitative RT-PCR

Cells, maintained in DMEM containing 10% FBS for 48 hours after plating, were washed twice with cold PBS, detached with 0.05% trypsin containing 0.53 mM EDTA (GIBCO) then centrifuged at 1,300 rpm for 3 minutes. Pellets were homogenized using a tissue homogenizer (Bertin Technologies, Paris, France) in ice-cold TRI reagent (Molecular Research center, Cincinnati, Ohio, USA). Total RNA was extracted using standard procedure²⁰. cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using iScript cDNA synthesis kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Negative controls were performed by omitting the reverse transcriptase. Then, qPCR was performed using a SYBR[®]-Green method on a CFX96 real-time PCR detection system (BioRad), according to the protocol detailed previously²⁰. Sense and anti-sense primers for subtypes of PDE 1 to 8, β_1 and β_2 -AR sub-types, cell phenotype markers (Type 1 collagen, Col1a1; type 3 collagen, Col3a1; non-muscle myosin heavy chain, NM-

MHC; smooth-muscle myosin heavy chain, SM-MHC; transgelin, Tagln) and housekeeping genes (TBP: Tata Box Binding Protein, and Ywhaz: 14-3-3 protein zeta/delta) were tested (**Table 1**). Negative controls were performed without cDNA template to check for exogenous contamination. 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 the targeted gene was subtracted from the average Ct in the LD RASMCs group to calculate $(1+E)^{\Delta Ct}$ according to the $2^{\Delta Ct}$ method. Then, the same process was applied for the geometric mean of Ct for housekeeping genes. The final relative mRNA expression was defined as the following ratio: $(1+E)^{\Delta Ct(\text{targeted gene})} / (1+E)^{\Delta Ct(\text{housekeeping genes})}$.

2.7 Cyclic AMP-PDE activity assay

Cells, maintained in DMEM containing 10% FBS for 48 hours after plating, were washed twice with cold PBS, detached with 0.05% trypsin containing 0.53 mM EDTA (GIBCO), counted with a cell counter chamber (Malassez) and then centrifuged at 1,300 rpm for 3 min. Pellets were homogenized using a tissue homogenizer (Bertin Technologies) in ice-cold lysis buffer (containing: NaCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, NP40 0.5% and protease inhibitors cocktails) 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). Cyclic AMP-PDE activity was measured according to the method described by Thompson and Appleman²⁸, as previously reported²⁰. To evaluate activities of specific PDE families, the assay was performed in the absence or presence of selective PDE inhibitors: 1 µM Cil for PDE3, 10 µM Ro for PDE4 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 cAMP-PDE activity in the absence of inhibitor (Vehicle), defined as the total cAMP-PDE activity.

2.8 Cyclic AMP measurement

Cyclic AMP content was determined by an enzyme immunoassay (monoclonal anti-cAMP EIA kit; NewEast Biosciences, King of Prussia, PA, USA). Cell pellets, prepared as for cAMP PDE activity assay, were homogenized using a tissue homogenizer (Bertin Technologies) in ice-cold lysis buffer (containing: HCl 0.1 M and Triton X-100 1%). Lysates were centrifuged at 12,000 g, for 10 min at 4°C. Supernatants containing cyclic nucleotides

were used for the measurement according to the manufacturer's protocol. Results were expressed in pmol of cAMP per μg of proteins.

2.9 Data analysis and statistics

$[^{125}\text{I}]$ -ICYP binding isotherms were analyzed by computerized nonlinear curve fitting using the EBDA-LIGAND program of Munson and Rodbard ²⁹, modified by McPherson ³⁰. Raw data (dpm) were initially processed by the EBDA program in order to calculate Hill coefficients (nH), to give first estimates of the binding parameters ($[^{125}\text{I}]$ -ICYP binding densities (B) and betaxolol affinity (K_i)) and to create files that are used by the LIGAND program for the final evaluation. Exact values for K_i and B were calculated for each experiment and compared with a partial F test implemented in the LIGAND software between a one-site and a two-site model, as estimated through Eadie Hofstee plots implemented in EBDA. Such a procedure was also applied to a co-analysis of the various experiments for each experimental condition; this possibility has the great advantage to largely increase the power of the individual analysis and is thus pivotal for the characterization of multiple populations of binding sites with a small difference in affinity and/or an unbalanced proportion of high/low affinity (e.g. 10%/90%) ³¹. In this respect, raw data were first scaled on the basis of the levels of $[^{125}\text{I}]$ -ICYP binding densities in the absence of betaxolol (B_0) and then co-analysed with correction parameters (B_0 ratios) as fixed values.

All results were expressed as mean \pm SEM of n cells in FRET imaging experiments and filipin III staining or of N experiments in other assays. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical comparison was performed using a Mann-Whitney test or Student's t-test when appropriate. Differences with P-values <0.05 were considered as statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Characterization of LD and HD RASMCs phenotype

After 48 hours of culture, RASMCs seeded at low (LD) or high (HD) density were at 100% confluence or 20% confluence, respectively.

We compared the expression pattern of cellular phenotype markers in these two groups of cultured RASMCs. Expression of mRNA encoding two contractile markers, the transgelin (Tagln) and SM-MHC proteins^{14, 32}, were not different between the two groups of cells. There was also no difference in the expression of mRNA encoding the type 3 collagen and the NM-MHC, two synthetic phenotype markers^{14, 33}, while type 1 collagen expression, another synthetic phenotype marker, was decreased by about 30% in HD compared to LD RASMCs (**Figure S2**). Overall, these data suggest that the difference in cell density was not associated to a drastic modification of the expression pattern of cellular phenotype markers in cultured LD and HD RASMCs.

3.2 Comparison of cytosolic cAMP signals in response to β -AR stimulation in cultured LD and HD RASMCs

We first determined the basal intracellular cAMP concentration ($[cAMP]_i$) in both LD and HD cells by using an enzyme immunoassay. We observed that the basal $[cAMP]_i$ was $1.54 \times 10^{-2} \pm 0.38 \times 10^{-2}$ pmol/ μ g prot (n=9) in LD RASMCs and $1.07 \times 10^{-2} \pm 0.22 \times 10^{-2}$ pmol/ μ g prot (n=10) in HD RASMCs. These data show that HD cells exhibit 30 % lower basal $[cAMP]_i$ compared to LD cells (P<0.05).

We then evaluated the cAMP production induced by β -AR stimulation in cultured LD and HD RASMCs. Real-time $[cAMP]_i$ was monitored in a single cell expressing the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps by fluorescence imaging. A pulse of Iso at 10 or 100 nM induced a transient increase in CFP/YFP ratio, reflecting the production of cytosolic cAMP upon β -AR stimulation (**Figure 1**). The maximum response induced by 10 nM Iso was significantly higher in HD cells ($16.22 \pm 1.75\%$; n=15) compared to LD cells ($10.85 \pm 0.91\%$; n=41; p<0.01) (**Figure 1A**). Relative to Iso 10 nM, 100 nM Iso was associated with higher cAMP signal, both in HD (+ 66%) and LD (+ 79%) (**Figure 1B**). Interestingly, the maximum response to 100 nM Iso was also significantly higher in HD than LD cells (**Figure 1B**). Independently of Iso concentration, the kinetic parameters of the Iso-induced FRET signals were similar in LD and HD cells, except for a slight modification of the onset phase.

The lower amplitude of the FRET response to Iso in LD cells may be due to the higher basal [cAMP]_i causing saturation of the FRET sensor. To test this hypothesis, we studied the FRET responses to a saturating concentration of L-85 (100 μM), an adenylyl cyclase activator, maintained until steady state was obtained. Then, a non-selective PDE inhibitor, IBMX at 100 μM, was added in the presence of L-85. As shown in **Figure 2**, the relative increase of [cAMP]_i response to L-85 and IBMX was similar in LD and HD RASMCs, suggesting that the FRET-probe was saturated at the same level in the two groups of cells.

3.3 Role of β₁- and β₂-AR sub-types in the cytosolic cAMP signals upon Iso stimulation in cultured LD and HD RASMCs

The specific contributions of β₁- and β₂-AR sub-types in cAMP production elicited by Iso were evaluated in RASMCs incubated in the presence of a selective β₁- or β₂-AR antagonist, CGP 100 nM or ICI 5 nM, respectively, during 15 min before an Iso pulse at 100 nM. These concentrations were previously shown to be selective towards each β-AR sub-type²⁰. In LD RASMCs, the selective β₁-AR antagonist CGP had no effect on Iso response (**Figure 3A**), whereas the selective β₂-AR antagonist, ICI, decreased the amplitude of Iso response by 35%, without affecting its kinetics (**Figure 3B**). In contrast, in HD RASMCs, both CGP and ICI induced a significant decrease in the maximum Iso response by 26% and 74%, respectively, and a shortening of its recovery phase (**Figure 3 C&D**). This suggests that in HD RASMCs, both β₁-and β₂-AR sub-types are involved in the Iso-induced cAMP response, whereas in LD RASMCs, only the β₂-AR sub-type is involved in this response.

One possible explanation for this difference could be that some β-ARs are confined in caveolae in HD cells, and that these functional microdomains would not present in LD cells, precluding efficient response to β-AR stimulation. This hypothesis was evaluated by treating HD RAMSCs with 10 mM MβCD, a cholesterol chelator, prior to Iso stimulation. As shown in **Figure 4A**, cells treated with MβCD exhibited a major decrease in filipin III staining, confirming a decrease in cholesterol membrane content in these cells. However, this MβCD treatment did not alter the cAMP response to 100 nM Iso (**Figure 4B**), suggesting that cholesterol-enriched membrane domains were not crucial for β-AR signaling in HD RASMCs.

To identify and quantify β₁- and β₂-AR expression in the LD and HD RASMCs, we performed competitive [¹²⁵I]-ICYP binding experiments with betaxolol, a selective β₁

competitive antagonist, which exhibits K_i values of 5.01 ± 1.27 nM and 210 ± 49 nM, for β_1 - and β_2 -AR subtypes, respectively³⁴. Testing 21 concentrations of betaxolol ranging from 10^{-12} to 10^{-4} M yielded [¹²⁵I]-ICYP competition curves with a slope factor equal to 1.09 ± 0.5 in membrane preparations derived from LD cells and 0.86 ± 0.1 in similar preparations from HD cells (**Figure 5**).

For LD RASMCs, the best fit for the betaxolol curve was for a "one site" model, with a K_i of 445 ± 11 nM, consistent with the range of its affinity with the β_2 -AR sub-type (**Figure 5**). For HD RASMCs, the best fit was for a "two sites" model, with K_i values of 2.8 ± 1.1 nM and 651 ± 2 nM, in agreement with the high and low affinity of betaxolol for the β_1 -AR and β_2 -AR sub-types, respectively. Respective subtype fractions of this low and high affinity sites were 0.11 and 0.89 (**Figure 5**). These data suggest that both β_1 - and β_2 -AR sub-types were expressed at the membrane of HD RASMCs, whereas the membrane of LD cells display only the β_2 -AR sub-type.

We also evaluated the expression of mRNA encoding β_1 and β_2 -AR sub-types and did not observe any differences between both culture conditions (**Figure S3**). It is noteworthy that the cycle threshold (Ct) for β_2 -AR detection was significantly lower than the β_1 -AR Ct value (28 ± 0.2 versus 33 ± 0.6 , respectively; $P < 0.001$), suggesting that the expression of mRNA encoding β_2 -AR is higher than the expression of mRNA encoding β_1 -AR in RASMCs.

3.4 Role of PDEs in the control of cytosolic cAMP concentrations in cultured LD and HD RASMCs

We first characterized the expression pattern of cAMP-PDE isoforms in cultured LD and HD cells. The expressions of 14 isoforms of cAMP-PDEs (PDE1A, 1B, 1C, 2A, 3A, 3B, 4A, 4B, 4C, 4D, 7A, 7B, 8A and 8B) were analyzed by quantitative RT-PCR. The PCR products of PDE1B, 2A, 4C and 8B were not detected. Among the 10 detectable isoforms, mRNA expressions of PDE1B, 1C, 2A, 3B, 4C, 4D, 7A, and 8B were similar in both groups of cells, (**Figure 6**). However, mRNA expression encoding PDE1A, PDE3A, PDE4A, PDE4B and PDE7B were significantly increased in HD compared to LD RASMCs, whereas mRNA encoding PDE8A was decreased.

We then analyzed the cAMP hydrolysis activity in cultured LD and HD RASMCs, especially the contributions of the two main vascular cAMP-PDEs, namely PDE3 and PDE4. Total cAMP-PDE activity was significantly higher in HD compared to LD RASMCs (50.0 ± 2.9

versus 41.4 ± 2.0 pmol/min/mg prot, respectively; $P < 0.05$) (**Figure 7A**). PDE3 and PDE4 inhibitors significantly reduced the cAMP hydrolytic activity by 37% and 29%, respectively, in LD RASMCs and by 38% and 32%, respectively, in HD RASMCs. The broad-spectrum PDE inhibitor, IBMX, almost completely abolished the total cAMP-PDE activity in both groups of cells (**Figure 7B**). These results show that, whereas the total cAMP-PDE activity was higher in HD RASMCs, relative contributions of PDE3 and PDE4 in controlling basal cAMP hydrolysis were similar in LD and HD RASMCs.

Finally, we evaluated the functional contribution of PDE3 and PDE4 families in regulating the cAMP dynamics to β -AR stimulation. RASMCs were incubated in the presence of selective PDE3 and/or PDE4 inhibitors during 4 min preceding the 10 nM Iso pulse and maintained during the whole recovery period. In LD RASMCs, the PDE3 inhibitor (Cil, 1 μ M) had no effect on the amplitude of Iso response but prolonged slightly its duration with a significant 35% increase in $t_{1/2\text{off}}$ ($P < 0.05$) (**Figure 8A**). The response of Iso in the presence of Cil was not modified by CGP (100 nM), the β_1 -AR antagonist (data not shown). The PDE4 inhibitor (Ro, 10 μ M) delayed the Iso response onset phase (time to peak increased by 62%; $P < 0.01$) and markedly prolonged its recovery phase ($t_{1/2\text{off}}$ increased by 146%; $P < 0.001$) (**Figure 8B**). We also evaluated the effect of the simultaneous inhibition of PDE3 and PDE4, and observed that combined addition of Cil and Ro (Cil + Ro) increased the time to peak of Iso response by 84% ($P < 0.01$) (**Figure 8C**). As the $t_{1/2\text{off}}$ values were not calculable in this condition, we calculated the Area Under the Curve (AUC) by using the GraphPad Prism software. The AUC of Iso response was increased from 4327 ± 665 a.u. ($n = 9$) to 7746 ± 1250 a.u. ($n = 10$) in the presence of Cil+Ro ($P < 0.05$), confirming that Cil+Ro dramatically hampered the recovery phase of the response to Iso. To compare the effect of Ro alone and Cil+Ro, we compared the AUC in the presence of PDE inhibitor from which the matching control AUC obtained with Iso alone was subtracted. We observed that the effect of Cil+Ro was not different from that of Ro alone (“corrected” AUC: 3745 ± 1348 a.u. *versus* 3781 ± 1313 a.u., respectively). These results suggest that in LD RASMCs, both PDE3 and PDE4 contribute to the degradation of cytosolic cAMP generated by β -AR stimulation.

In HD RASMCs, PDE3 inhibition by Cil had no effect on the Iso response except for a slight decrease in the $t_{1/2\text{on}}$ value by 26% ($P < 0.05$) (**Figure 8D**). PDE4 inhibition by Ro did not affect the amplitude of Iso response but significantly delayed its recovery phase by increasing the $t_{1/2\text{off}}$ by 110% ($P < 0.001$; **Figure 8E**). In the presence of Cil+Ro, the Iso response was

significantly increased in duration ($t_{1/2\text{off}}$ increased by 302%), but not in amplitude (**Figure 8F**). The comparison of Iso responses in the presence of Ro alone and Cil+Ro showed that Cil+Ro significantly delayed the recovery phase compared to Ro alone ($t_{1/2\text{off}}$ increased by 91% and “corrected” AUC increased by 130%; $P < 0.001$). These results suggest that, in HD RASMCs, PDE4 plays a prominent role in the degradation of cytosolic cAMP generated by β -AR stimulation and that its inhibition uncovers the hydrolytic activity of PDE3.

4. DISCUSSION

In this study, we characterized the influence of cell density of RASMCs on the β -AR/cAMP/PDE signaling pathway. Our main results can be summarized as follows: (i) In HD RASMCs, both β_1 - and β_2 -ARs are functionally expressed at the membrane and contribute to cAMP synthesis after Iso stimulation. PDE4 plays a prominent role in degrading this cAMP increase. (ii) In LD RASMCs, only the β_2 -AR is involved in the cAMP production after Iso stimulation, since no functional membrane expression of the β_1 -AR could be detected. The β -AR-mediated cAMP response in these cells is controlled by PDE4 but also, to a lesser degree, by PDE3.

This study was carried out on RASMCs maintained in culture between passages 2 and 6 in the presence of FBS and on monomeric collagen coating, two experimental conditions promoting a VSMC synthetic phenotype and proliferation^{14, 35}. Redifferentiation of VSMCs to a contractile phenotype was previously observed in primary cultures grown at confluence or on fibrillary collagen^{14, 33, 36}. Here, we observed that among the phenotype markers studied only the type 1 collagen expression was altered by cell density, with a 30% smaller amount in HD RASMCs, in agreement with the data obtained by Ang *et al.*³³ in primary cultures of rabbit SMCs. However, we did not observe any modification of the SM-MHC expression with cell density, unlike what was observed by Vallot *et al.*¹⁴, suggesting that the synthetic phenotype of RASMCs was not fully reversed in primary cultures of RASMCs maintained at high density during 6 days. Two differences might explain the absence of effect of cell density on SM-MHC expression in our study: firstly, the use of sub-cultured cells undergoing passages, and secondly, the shorter culture time (2-day). Overall, our results show that a high cell density of cultured RASMCs is associated with partial modification of the expression pattern of cellular phenotype markers.

Cyclic AMP controls the contractile tone, the proliferation and the migration of SMCs activities of VSMC that are key factors for vascular homeostasis. The level of intracellular cAMP is set by its synthesis by AC balanced by its degradation by PDEs. We observed that the basal [cAMP]_i was significantly decreased in HD compared to LD RASMCs. A weaker AC activity in HD cells was unlikely as the direct AC activator, L-85, produced a similar cAMP-FRET signal in both cell types. By contrast, the decrease in basal [cAMP]_i in HD cells might be related to the raise in total cAMP-PDE activity observed in this condition. Indeed,

we found an increase in mRNA expression of five cAMP-PDEs isoforms (PDE1A, 3A, 4A, 4B and 7B) in HD cells. Thus, the overexpression of several PDE families in HD cells would lead to an increase in total cAMP hydrolytic activity without affecting the relative contributions of PDE3 and PDE4 families. The main differences in vascular PDE expression generally associated with the switch from contractile to synthetic phenotype are relocalization of PDE1A from cytosol to nucleus³⁷, an increase in PDE1C expression²¹ and a decrease in PDE3A expression²² with minor modification of PDE4. Sustained incubation with cAMP-elevating agents have been shown to increase the expression of PDE3 and PDE4 variants, an effect observed between 4 to 16 hours after treatment^{38,39}. In our study, the increase of PDE3 and PDE4 variant expression observed in RASMCs after 48-hour culture at high density was not associated with an increase, but rather with a decrease, in [cAMP]_i. Thus, the mechanism responsible for these modifications of mRNA expression remains unidentified. PDE7B is a “novel” cAMP-PDE which was reported to be expressed in synthetic RASMCs²⁰. Interestingly, it has been reported that an increase in PDE7B expression occurs in glioblastoma cells in response to direct contact with endothelial cells⁴⁰. Thus, an increase in cell contact might be involved in PDE7B overexpression in HD RASMCs.

We also explored the cAMP responses to a β -AR stimulation in RASMCs by using FRET imaging. The application of a non-selective β -AR agonist, Iso, induced a higher increase in [cAMP]_i in HD than LD cells, independently of the Iso concentration tested. By testing the hypothesis that the difference in Iso response is due to confinement of some β -AR in caveolae, we observed that the Iso response was actually not altered in HD cells treated with M β CD, an agent used to solubilize cholesterol and extract it from membranes, leading to caveolae destruction²⁵. Indeed, we confirmed that M β CD treatment decreased by more than 50% the membrane cholesterol content, a treatment previously shown to mostly disassemble the plasma membrane caveolae of rat aorta smooth muscle⁴¹. Thus, our data support that functional β -ARs do not localize in cholesterol-enriched microdomains of RASMC membrane. This is consistent with previous study showing that β_1 - and β_2 -ARs are substantially present in non-caveolar fractions extracted from cultured RASMCs⁴².

Interestingly, the weaker Iso-induced cAMP response in LD cells appears to be related to the loss of functional β_1 -AR. Indeed, CGP, used at 100 nM to potently block β_1 -ARs without antagonizing β_2 -AR-mediated responses²⁰, significantly reduced the Iso response in HD cells

without affecting the response in LD cells. By contrast, ICI, a selective β_2 -AR antagonist, decreased the amplitude of Iso response in both cell types. These pharmacological data suggest that both β_1 - and β_2 -AR subtypes mediated the Iso response in HD cells, whereas only the β_2 -AR subtype was involved in LD cells. Consistently, competitive [125 I]-ICYP binding experiments with betaxolol, a β -AR ligand with higher affinity for β_1 -AR subtypes, identified two binding sites in HD cells, but only one binding site in LD cells. According to the affinity values calculated for these binding sites (K_i values in the range of nM concentration for the high-affinity site and in the range of 500 nM concentration for the low-affinity site) and those described in the literature³⁴, our data suggest that both β_1 - and β_2 -AR sub-types are expressed at the membrane of HD RASMCs, whereas the membrane of LD cells expresses only the β_2 -AR sub-type. The calculated fractions of β_1 - and β_2 -AR sub-types expressed in HD cells (i.e. 11% and 89%, respectively) support the predominance of β_2 -AR over β_1 -AR sub-type, which is consistent with our results showing higher antagonism of Iso response by ICI than CGP in these cells, as well as with literature reporting a β_2 -AR proportion of 87% in cultured RASMCs¹⁶. Although we did not directly investigate the functional expression of the β_3 -AR sub-type in our study, it is possible that the residual cAMP-response to Iso in the presence of ICI in LD cells might be due to a contribution of this β -AR sub-type. However, [125 I]-ICYP binding experiments did not reveal a third binding site for betaxolol (which exhibits an affinity for the β_3 -AR in the range of μ M concentrations⁴³). This is in agreement with the evidence that β_3 -AR in rat aorta are localized in the endothelial cells⁵.

The loss of functional β_1 -ARs at the membrane of LD cells appears to involve a post-transcriptional mechanism, as mRNA expression of the β_1 -AR (and β_2 -AR) was not significantly different in both conditions. One seducing hypothesis would be that β_1 -AR response may be masked by the activity of a specific PDE isoform. Indeed, upon non selective β -AR stimulation, it appeared that PDE3 differentially controlled cAMP dynamics depending on cell density. However, neither PDE3 inhibition nor non-selective PDE inhibition with IBMX had any effect on cAMP production under selective stimulation of β_1 -AR in LD cells (data not shown). This rules out the possibility that cAMP produced by β_1 -AR stimulation would be readily hydrolyzed by PDEs and therefore not detected. Other factors may be responsible for a downregulation of the β_1 -AR at the membrane of LD cells, such as an alteration of the β_1 -AR translational process or its trafficking to the membrane, or a desensitization of the β_1 -AR leading to internalization of the receptor. Another attractive

explanation would be receptor oligomerization, a process known to affect GPCR trafficking, signaling and pharmacological properties^{44, 45}. Finally, two hypotheses to explain the modification of the β -AR/cAMP signaling pathway according the cell confluence would involve either a soluble factor or the direct cell contact. Interestingly, in HEK cells, cell-cell contact has been shown to modulate the β_2 -AR-mediated ERK phosphorylation²³. This would deserve further investigation.

To conclude, our results show that in cultured RASMCs, the β -AR/cAMP/PDE signaling pathway is substantially affected at various levels by the cellular density. The low density state is associated with a loss of membrane expression of the β_1 -AR, a lower cAMP-PDE activity and a higher basal [cAMP]_i. Thus, this study highlights the critical role of the cellular environment in controlling the vascular β -AR signaling. This might have pathophysiological impact in diseases where vascular remodeling occurs. Furthermore, our results pointed out the importance of specific culture condition in experimental exploration of the β -AR/cAMP/PDE system, and more generally to cell signaling.

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

Target	Accession number	Primers forward 5'→3' reverse 3'→5'	Product size (Bp)	Annealing temperature (°C)
<u>PDE isoforms</u>				
PDE1A	NM_030871	GAAGTTTCGAGCATTGTCC GCAGGATATGTCAAACCAACC	96	60
PDE1B	NM_022710	TGCAGTCCACAACGTCTCA CCCGGTTCAAAGAGAAGACA	65	60
PDE1C	NM_031078	GCAGTGCAAGCTGGGATATT TTACAGCCGGTGGATAGCTC	82	60
PDE2A	NM_001143847	CTGTGCTGGCTGCACTCTAC GAGGATAGCAATGGCCTGAG	77	60
PDE3A	NM_017337	ACCTCCCTGCCCTGCATAC CCTCTCTTGTGGTCCCATT	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	GCCAGCCTTCCAACTGTAAG ATGGATGGTTGGTTGCACAT	98	60
PDE7A	NM_031080	TTGGAATTTGATATCTTCTGTTG CTCAATCAATCCATGAAGACTAAA	97	60
PDE7B	NM_080894	GGCCATGCACTGTTACTTGA CCAGAGGTGTGAGGAAGCTC	56	60
PDE8A	NM_198767	TGAGGTCTAGACAGCGATGG CACATGCCCTGTAGAATCCA	189	60
PDE8B	NM_199268	GCCTCATTCTGTTAGACACA GGCGATTCTGTAGGCTTGG	98	60
<u>β-AR sub-types</u>				
β ₁ -AR	NM_012701	GCTGCAGACGCTCACCA GCGAGGTAGCGGTCCAG	212	60
β ₂ -AR	NM_012492	CACAGCCATTGCCAAGTTCG CGGGCCTTATTCTTGGTCAGC	287	60
<u>Cell phenotype markers</u>				
Col1a1	NM_053356	CTCAAGATGTGCCACTCTGACT CTCCATGTTGCAGTAGACCTTG	99	60
Col3a1	NM_032085	GATGGAAACCCTGGATCAGA GCACCAGGAGAACCATTTTC	89	60
NM-MHC	NM_013194	GGGAGACTCCACAGACCTCA TCTTCTTCAGGGCCATGTTC	155	60
SM-MHC	NM_001170600	TGGTGGAAAACGGAAAAGAAG CACAGAAGAGGCCCGAGTAG	183	60
Tagln	NM_031549	GATGGAACAGGTGGTCAAT TGGGATCTCCACGGTAGTGT	179	60
<u>Housekeeping genes</u>				
TBP	NM_001004198	CGGTTTGCTGCAGTCATCAT GTGCACACCATTTTCCAGA	82	60
Ywhaz	NM_013011	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA GAAGCATTGGGGATCAAGAA	127	60

5. REFERENCES

1. Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, Nishizawa Y. Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol.* 2001;186:1-10
2. McDaniel NL, Rembold CM, Murphy RA. Cyclic nucleotide dependent relaxation in vascular smooth muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 1994;72:1380-1385
3. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological reviews.* 1994;46:121-136
4. Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacological reviews.* 2001;53:319-356
5. Trochu J-N, Leblais V, Rautureau Y, Bévèrelli F, Le Marec H, Berdeaux A, Gauthier C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *British Journal of Pharmacology.* 1999;128:69-76
6. Dessy C, Saliez J, Ghisdal P, Daneau G, Lobysheva, II, Frerart F, Belge C, Jnaoui K, Noirhomme P, Feron O, Balligand JL. Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. *Circulation.* 2005;112:1198-1205
7. Gaballa MA, Eckhart A, Koch WJ, Goldman S. Vascular beta-adrenergic receptor system is dysfunctional after myocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* 2001;280:H1129-1135
8. McGoldrick RB, Kingsbury M, Turner MA, Sheridan DJ, Hughes AD. Left ventricular hypertrophy induced by aortic banding impairs relaxation of isolated coronary arteries. *Clinical science.* 2007;113:473-478
9. Hubert F, Belacel-Ouari M, Manoury B, Zhai K, Domergue-Dupont V, Mateo P, Joubert F, Fischmeister R, Leblais V. Alteration of vascular reactivity in heart failure: Role of phosphodiesterases 3 and 4. *British Journal of Pharmacology.* 2014;171:5361-5375
10. Werstiuk ES, Lee RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2000;78:433-452
11. Rensen SSM, Doevendans PaFM, Eys GJJMv. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal.* 2007;15
12. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis.* 1990;10:966-990
13. Chamley-Campbell JH, Campbell GR. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis.* 1981;40:347-357
14. Vallot O, Combettes L, Jourdon P, Inamo J, Marty I, Claret M, Lompré AM. Intracellular Ca^{2+} handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1225-1235
15. Crass III MF, Borst SE, Scarpace PJ. B-adrenergic responsiveness in cultured aorta smooth muscle cells effects of subculture and aging. *Biochemical Pharmacology.* 1992;43:1811-1815
16. Mader SL. Influence of animal age on the beta-adrenergic system in cultured rat aortic and mesenteric artery smooth muscle cells. *J Gerontol.* 1992;47:B32-B36
17. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:290-314
18. Bobin P, Belacel-Ouari M, Bedioun I, Zhang L, Leroy J, Leblais V, Fischmeister R, Vandecasteele G. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Archives of cardiovascular diseases.* 2016

19. Phillips PG, Long L, Wilkins MR, Morrell NW. Camp phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogs in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288:L103-115
20. Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, Leblais V. B-adrenergic camp signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS ONE*. 2012;7
21. Cai Y, Nagel DJ, Zhou Q, Cygnar KD, Zhao H, Li F, Pi X, Knight PA, Yan C. Role of camp-phosphodiesterase 1c signaling in regulating growth factor receptor stability, vascular smooth muscle cell growth, migration, and neointimal hyperplasia. *Circ. Res*. 2015;116:1120-1132
22. Dunkerley HA, Tilley DG, Palmer D, Liu H, Jimmo SL, Maurice DH. 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*. 2002;61:1033-1040
23. Kaya AI, Onaran HO, Özcan G, Ambrosio C, Costa T, Balli S, Uğur Ö. Cell contact-dependent functional selectivity of β_2 -adrenergic receptor ligands in stimulating camp accumulation and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *J Biol Chem*. 2012;287:6362-6374
24. Nikolaev VO, Gambaryan S, Engelhardt S, Walter U, Lohse MJ. Real-time monitoring of the pde2 activity of live cells hormone-stimulated camp hydrolysis is faster than hormone-stimulated camp synthesis. *J. Biol. Chem*. 2005;280:1716-1719
25. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of lipid research*. 1997;38:2264-2272
26. McCabe JB, Berthiaume LG. N-terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae. *Molecular biology of the cell*. 2001;12:3601-3617
27. Jockers R, Angers S, Silva AD, Benaroch P, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S. B2-adrenergic receptor down-regulation evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J. Biol. Chem*. 1999;274:28900-28908
28. Thompson WJ, Appleman MM. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry*. 1971;10:311-316
29. Munson PJ, Rodbard D. Ligand: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Analytical biochemistry*. 1980;107:220-239
30. McPherson GA. Analysis of radioligand binding experiments. A collection of computer programs for the ibm pc. *Journal of pharmacological methods*. 1985;14:213-228
31. McPherson GA, Molenaar P, Malta E, Raper C. Influence of assay buffer on dissociation constants of drugs at beta-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol*. 1985;119:93-100
32. Keuylian Z, Baaij JHFd, Glorian M, Rouxel C, Merlet E, Lipskaia L, Blaise R, Mateo V, Limon I. The notch pathway attenuates interleukin 1β (il1 β)-mediated induction of adenylyl cyclase 8 (ac8) expression during vascular smooth muscle cell (vsmc) trans-differentiation. *J. Biol. Chem*. 2012;287:24978-24989
33. Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *The Biochemical journal*. 1990;265:461-469
34. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: Coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res*. 1986;59:297-309

35. Ichii T, Koyama H, Tanaka S, Kim S, Shioi A, Okuno Y, Raines EW, Iwao H, Otani S, Nishizawa Y. Fibrillar collagen specifically regulates human vascular smooth muscle cell genes involved in cellular responses and the pericellular matrix environment. *Circ Res.* 2001;88:460-467
36. Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of cdk2 inhibitors. *Cell.* 1996;87:1069-1078
37. Nagel DJ, Aizawa T, Jeon K-I, Liu W, Mohan A, Wei H, Miano JM, Florio VA, Gao P, Korshunov VA, Berk BC, Yan C. Role of nuclear ca^{2+} /calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1a in vascular smooth muscle cell growth and survival. *Circ. Res.* 2006;98:777-784
38. Liu H, Maurice DH. Expression of cyclic gmp-inhibited phosphodiesterases 3a and 3b (pde3a and pde3b) in rat tissues: Differential subcellular localization and regulated expression by cyclic amp. *British Journal of Pharmacology.* 1998;125:1501-1510
39. Tilley DG, Maurice DH. Vascular smooth muscle cell phosphodiesterase (pde) 3 and pde4 activities and levels are regulated by cyclic amp in vivo. *Mol Pharmacol.* 2002;62:497-506
40. Brooks MD, Jackson E, Warrington NM, Luo J, Forys JT, Taylor S, Mao DD, Leonard JR, Kim AH, Piwnica-Worms D, Mitra RD, Rubin JB. Pde7b is a novel, prognostically significant mediator of glioblastoma growth whose expression is regulated by endothelial cells. *PLoS One.* 2014;9:e107397
41. Linder AE, Thakali KM, Thompson JM, Watts SW, Webb RC, Leite R. Methyl-beta-cyclodextrin prevents angiotensin ii-induced tachyphylactic contractile responses in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323:78-84
42. Ostrom RS, Liu X, Head BP, Gregorian C, Seasholtz TM, Insel PA. Localization of adenylyl cyclase isoforms and g protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: Expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol Pharmacol.* 2002;62:983-992
43. Baker JG. The selectivity of β -adrenoceptor antagonists at the human β_1 , β_2 and β_3 adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology.* 2005;144:317-322
44. Lohse MJ. Dimerization in gpcr mobility and signaling. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10:53-58
45. Ferre S, Casado V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse MJ, Milligan G, Pin JP, Guitart X. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: Functional and pharmacological perspectives. *Pharmacological reviews.* 2014;66:413-434

6. FIGURES

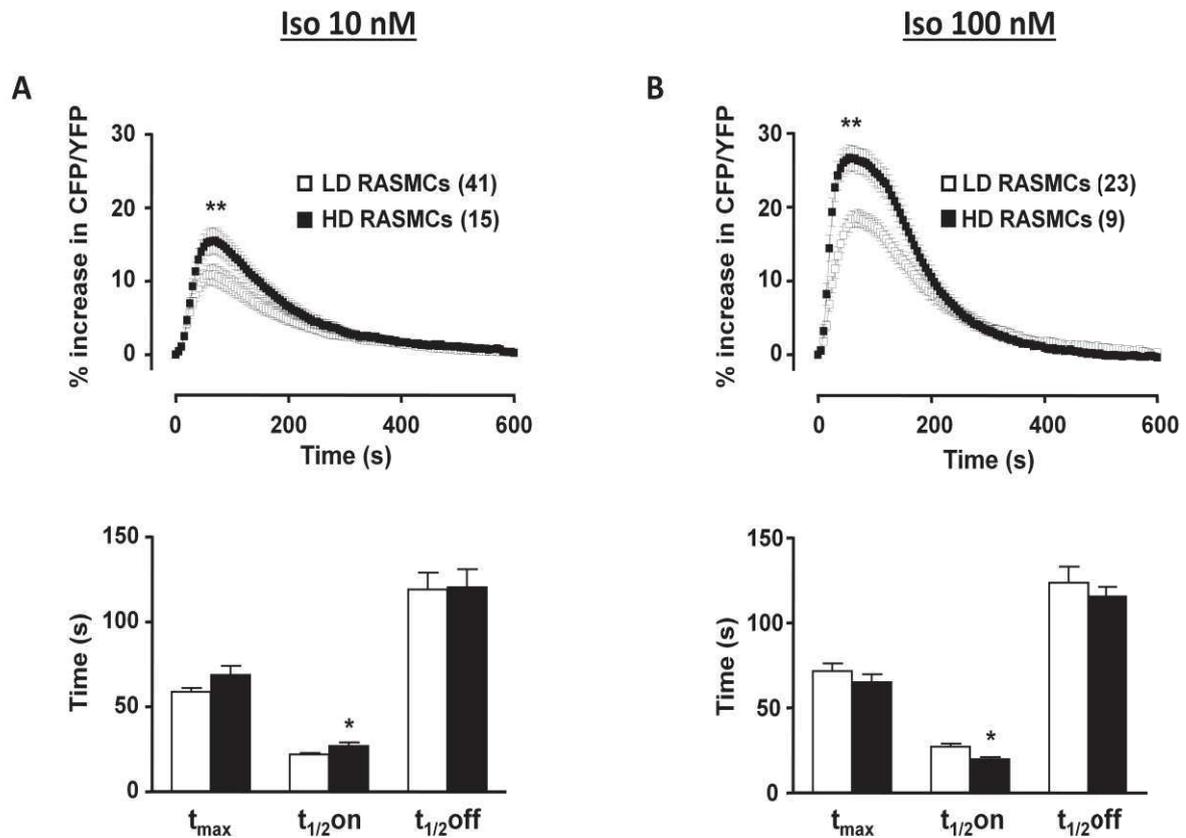


Figure 1. Effect of isoprenaline on β -AR-induced cytosolic cAMP signals in LD and HD RASMCs.

cAMP measurements were conducted in cultured RAMSCs using the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps following a brief application of isoprenaline (Iso, 15 s) on LD cells (\square) or HD cells (\blacksquare). A: 10 nM Iso. B: 100 nM Iso. Top and lower panels represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the associated kinetic parameters, respectively. Data are mean \pm SEM of 9-41 independent cells as indicated. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus LD cells.

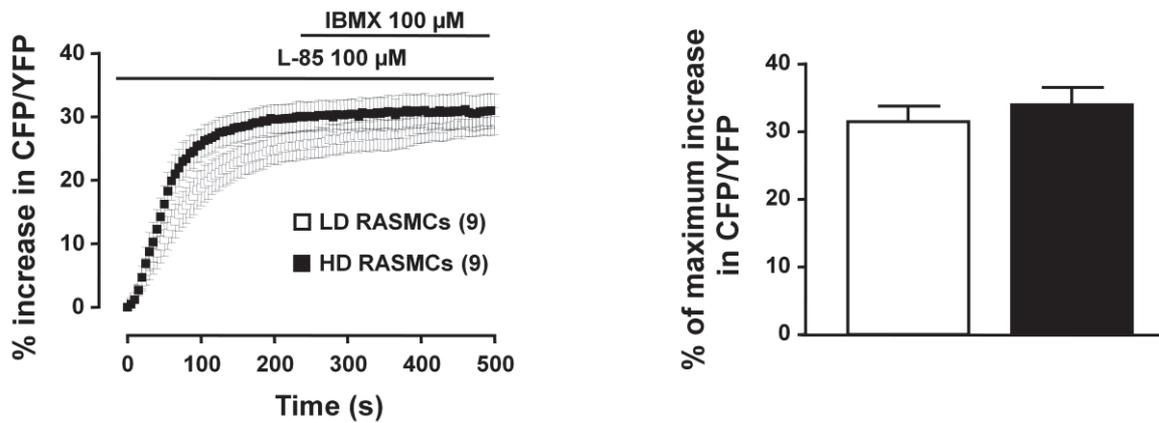


Figure 2. Maximum FRET-based cAMP signal in response to direct AC activation (L-858051, 100 μM) in the presence of a non-selective PDEs inhibitor (100 μM IBMX) in LD and HD RASMCs.

cAMP measurements were conducted in cultured RAMSCs using the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps in response to sustained application of L-858051 (L-85, 100 μM, 500 s). At steady state, a non-selective PDE inhibitor (100 μM, IBMX) was added on top of L-85. The left panel represents the mean variation of CFP/YFP ratio and the right panel the maximum increase in CFP/YFP ratio, measured at 500 s after L-85 addition. Data are mean ± SEM of 9 cellular recordings.

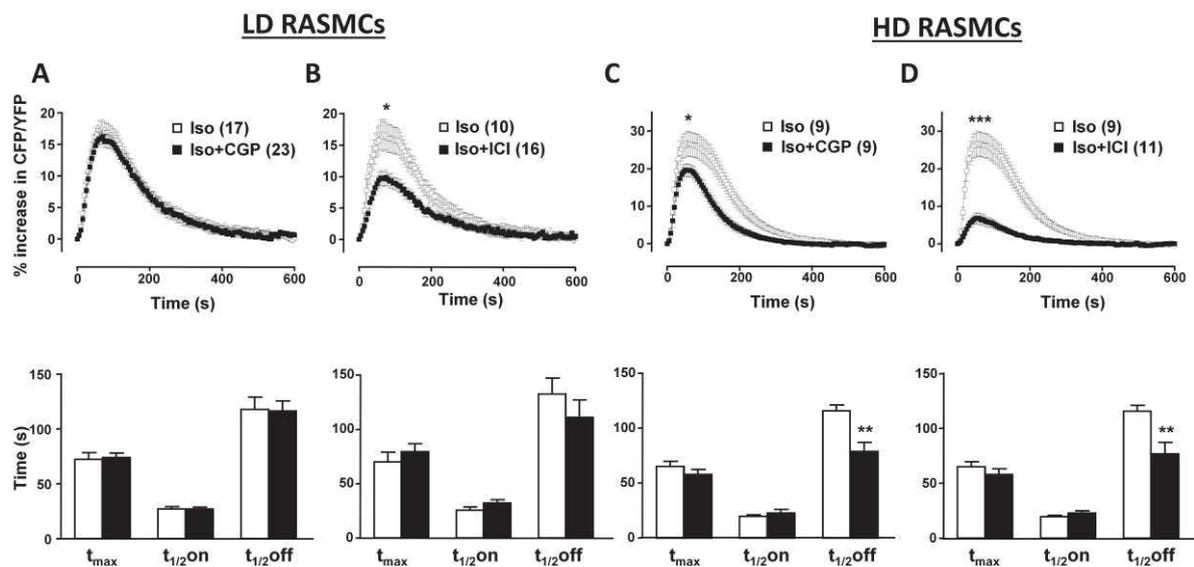


Figure 3. Effect of β_1 -AR and β_2 -AR antagonists on β -AR-induced cAMP signals in LD and HD RASMCs.

cAMP measurements were conducted in cultured RAMSCs using the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps following a brief application of isoprenaline (Iso, 0.1 μ M, 15 s) in the absence (\square) or presence (\blacksquare) of β -AR antagonists. A, C: Effect of the β_1 -AR antagonist (100 nM CGP-20712A, CGP) on Iso response in LD (A) and HD (C) cells, respectively. B, D: Effect of the β_2 -AR antagonist (5 nM ICI 118,551, ICI) on Iso response in LD (B) and HD (D) cells. Top and lower panels represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the corresponding kinetic parameters, respectively. Data are mean \pm SEM of 9-23 independent cells, as indicated. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus Iso alone.

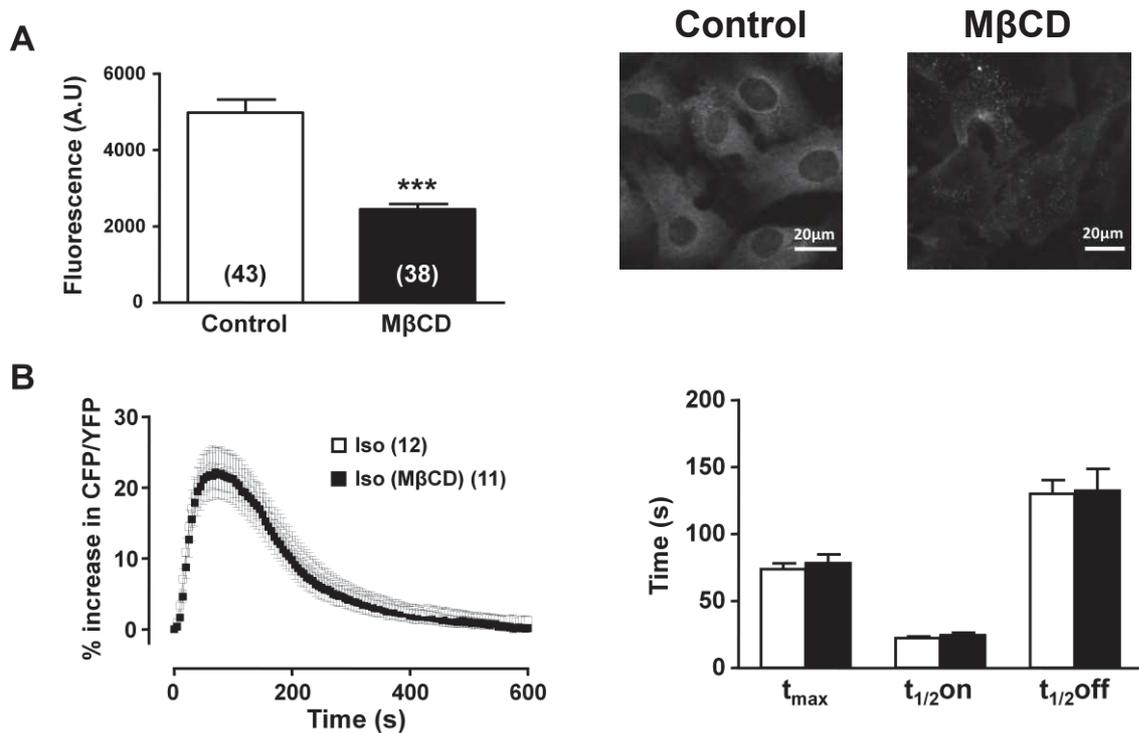


Figure 4. Effect of methyl- β -cyclodextrin treatment (M β CD) on β -AR-induced cytosolic cAMP signals in HD RASMCs.

A: Effect of M β CD treatment (10 mM, 37°C, 1 hour) on RASMCs staining with filipin III. Left histograms represent the mean of fluorescence recorded in cells. On the right, representative pictures of the cells treated (M β CD) or not (control). B: Cytosolic cAMP measurements were conducted in cultured RAMSCs using the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps following a brief application of isoprenaline (Iso, 0.1 μ M, 15 s) on HD cells treated (■) or not (□) with M β CD. Left and right panels represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the corresponding kinetic parameters. Data are mean \pm SEM of 11-43 separate recordings cells as indicated. *** $P < 0.001$ versus control RASMCs.

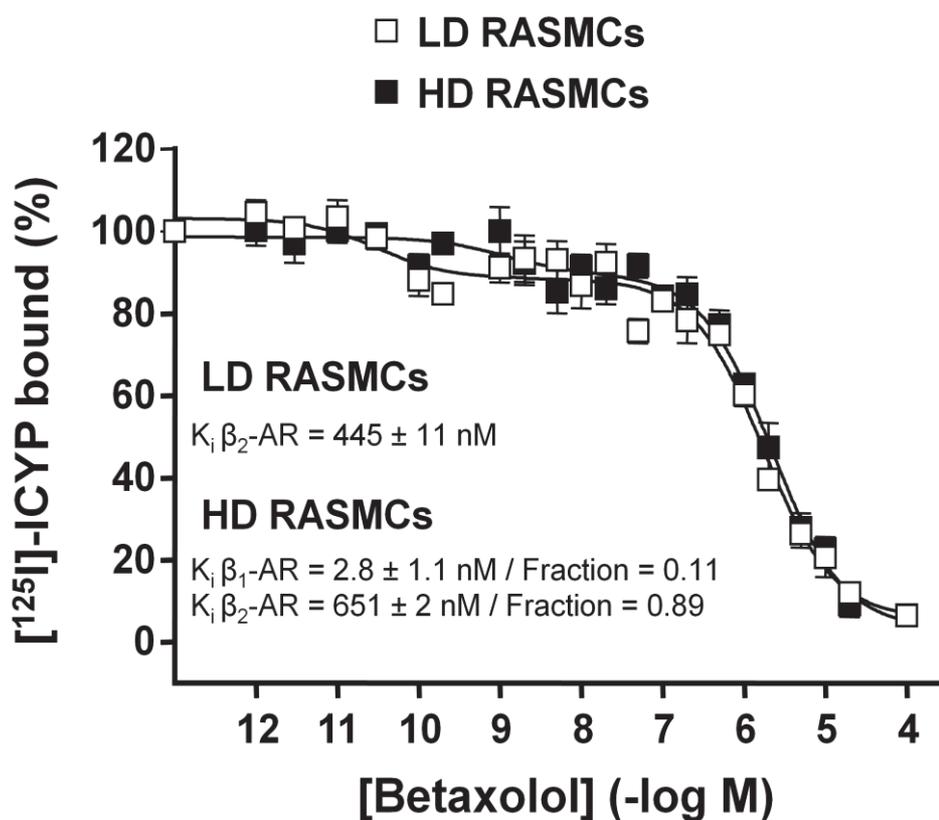


Figure 5. Competition of [¹²⁵I]-ICYP binding with betaxolol in membrane preparations derived from LD and HD RASMCs. Competition of [¹²⁵I]-ICYP binding with betaxolol for LD cells (□) and HD cells (■). Slope factor (Hill number) of the plots were 1.09 ± 0.5 for LD cells and 0.86 ± 0.1 for HD cells. K_i values and fraction of receptors from fit with LIGAND program are given on the figure. Data are mean \pm SEM of 3-6 independent experiments.

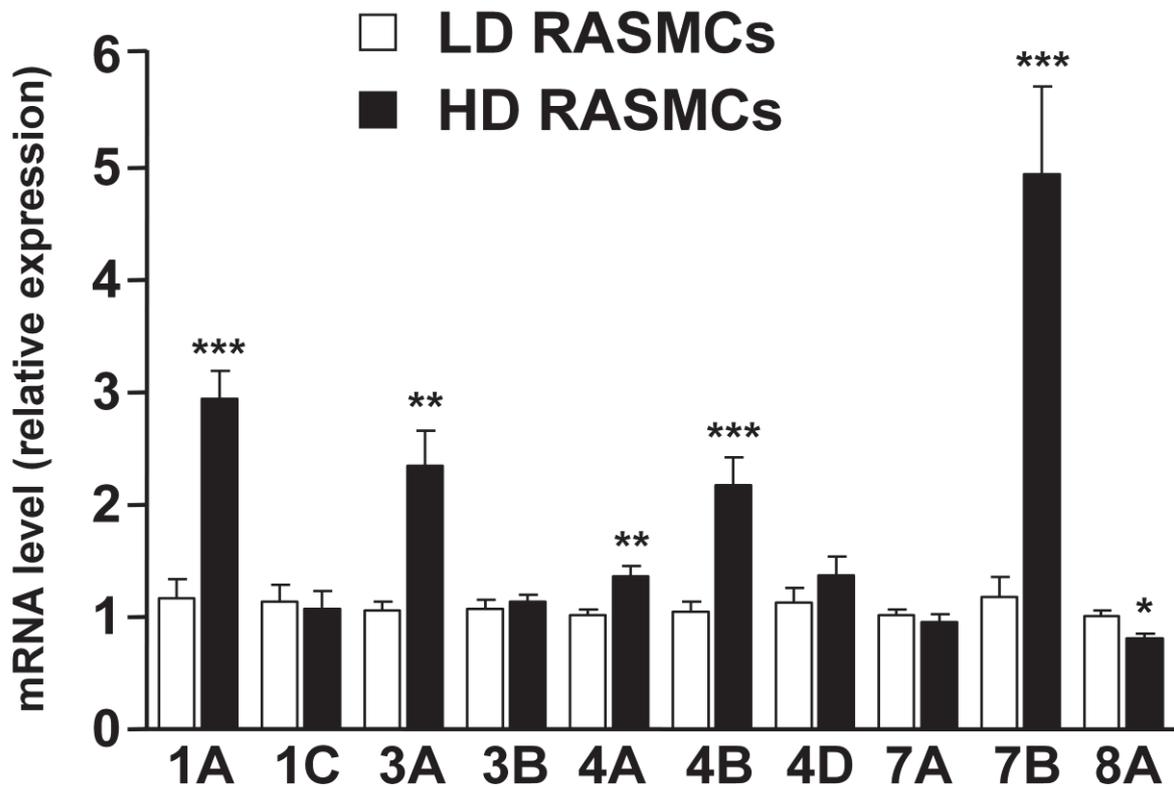


Figure 6. Expression analysis of mRNA encoding cAMP-PDE isoforms in LD and HD RASMCs.

RT-qPCR reactions were carried out on mRNAs isolated from RASMCs. The expression of PDE1A (1A), PDE1C (1C), PDE3A (3A), PDE3B (3B), PDE4A (4A), PDE4B (4B), PDE4D (4D), PDE7A (7A), PDE7B (7B), PDE8A (8A) were analyzed. mRNA quantification was expressed using the $2^{\Delta Ct}$ method as described in materials and methods. Data are mean \pm SEM of mRNA expression relative to that in LD RASMCs. n = 6-23 experiments. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 *versus* LD RASMCs.

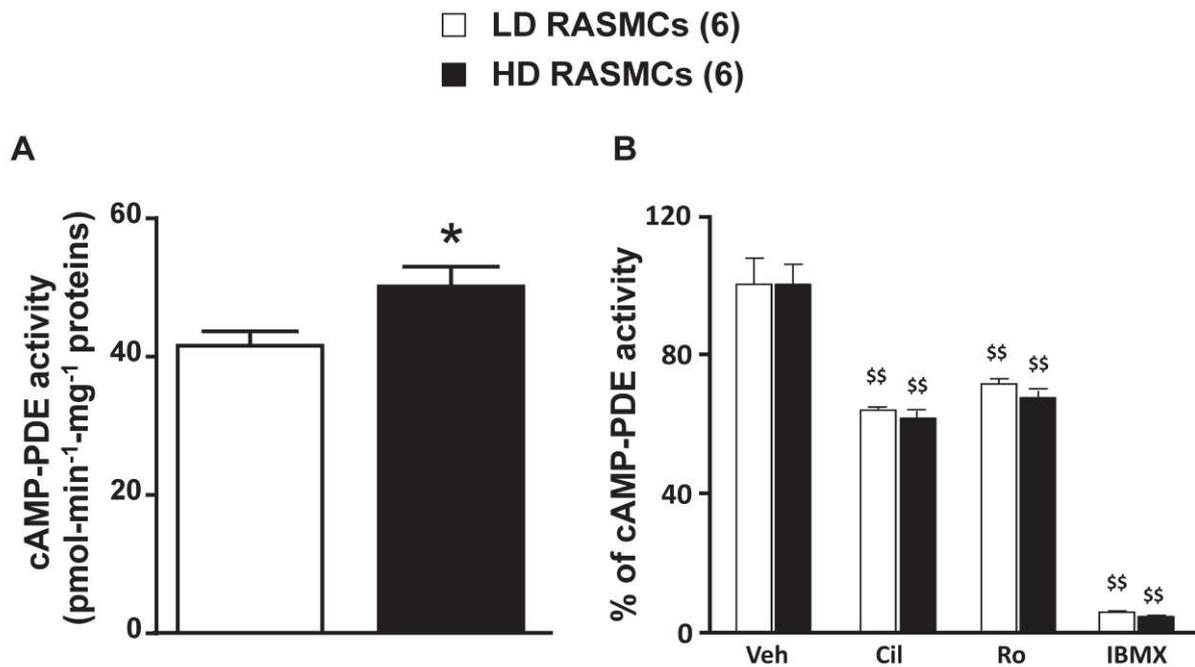


Figure 7. cAMP-PDE activity in LD and HD RASMCs.

A: Total cAMP-PDE activity was determined in the presence of 1 μ M cAMP in lysates of cultured RAMSCs. B: cAMP-PDE activity profile was determined in the absence (vehicle, Veh) or presence of a selective PDE3 inhibitor (cilostamide, Cil, 1 μ M) or PDE4 inhibitor (Ro 20-1724, Ro, 10 μ M) or a non-selective PDE inhibitor (IBMX, 1 mM). Results are expressed in fraction (%) of the total cAMP-PDE activity measured in the absence of inhibitor. Data are means \pm SEM of 6 independent experiments. * $P < 0.05$ versus LD RASMCs. \$\$ $P < 0.01$ versus relevant vehicle.

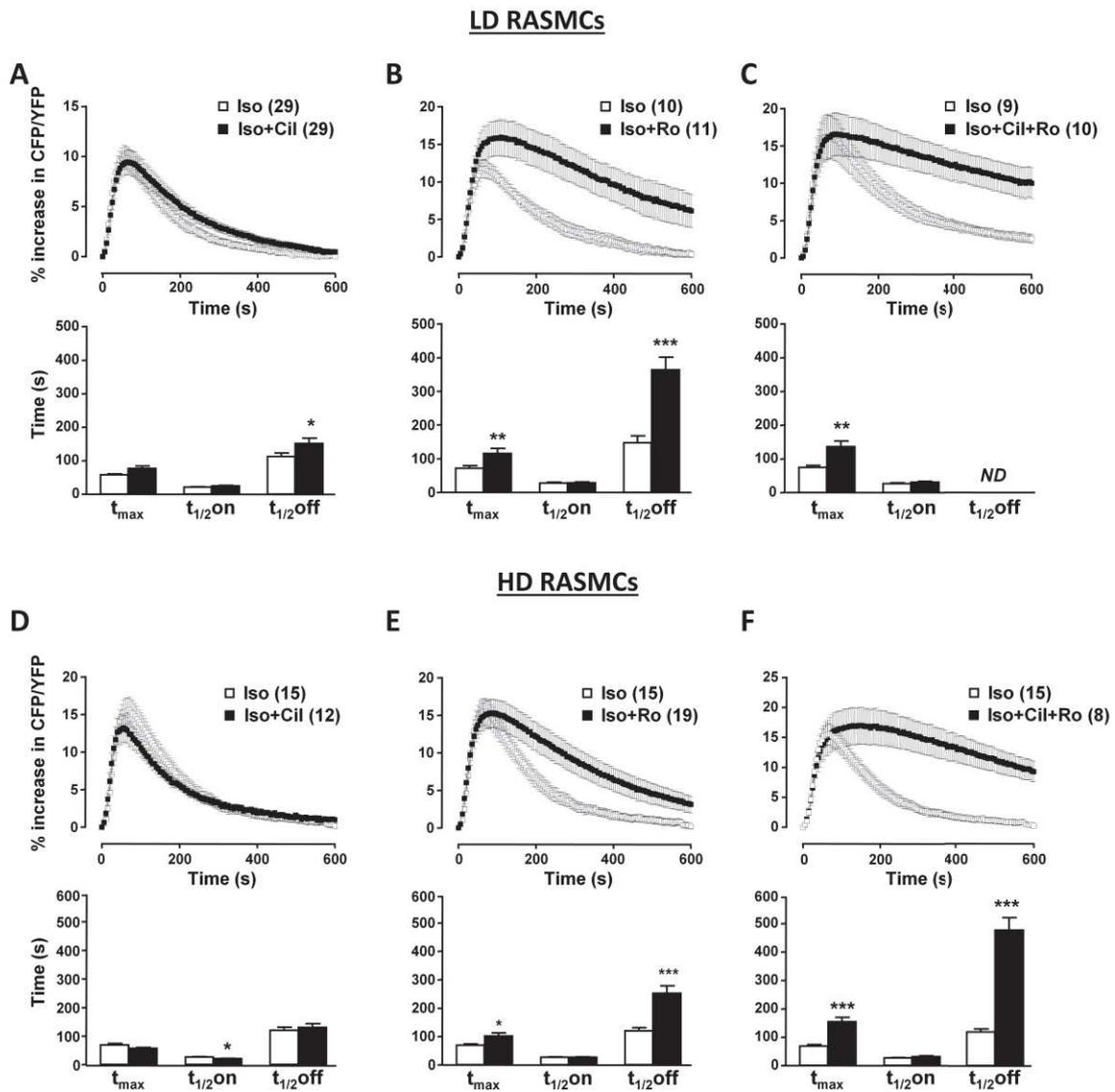


Figure 8. Effect of PDE inhibition on β -AR-induced cytosolic cAMP signals in LD and HD RASMCs.

cAMP measurements were conducted in cultured RAMSCs using the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps following a brief application of isoprenaline (Iso, 10 nM, 15 s) in the absence (\square) or presence (\blacksquare) of selective PDE inhibitor. A, D: Effect of a PDE3 selective inhibitor (1 μ M cilostamide, Cil) on Iso response in LD (A) and HD (D) cells. B, E: Effect of a PDE4 selective inhibitor (10 μ M Ro 20-1724, Ro) on Iso response in LD (B) and HD (E) cells. C, F: Effect of a combination of PDE3 and PDE4 inhibitors (1 μ M Cil and 10 μ M Ro) on Iso response in LD (C) and HD (F) cells. Top and lower panels represent the mean variation of CFP/YFP ratio and the corresponding kinetic parameters, respectively. Data are mean \pm SEM of 8-29 cellular recordings as indicated. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus Iso alone.

7. SUPPLEMENTAL DATA

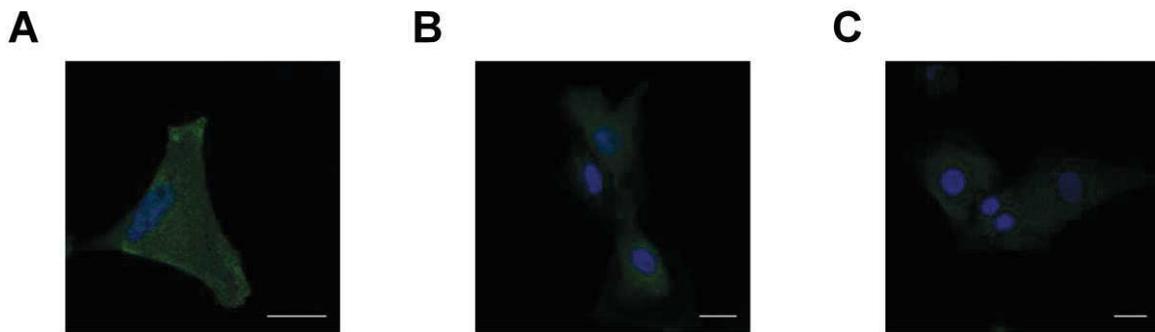


Figure S1. Characterization of the phenotype of cultured RASMCs.

Immunolabeling of cultured RASMCs with antibodies specific for smooth muscle α -actin (A), transgelin (B) and calponin (C), used as markers of the smooth muscle.

Scale bar: 20 μ m.

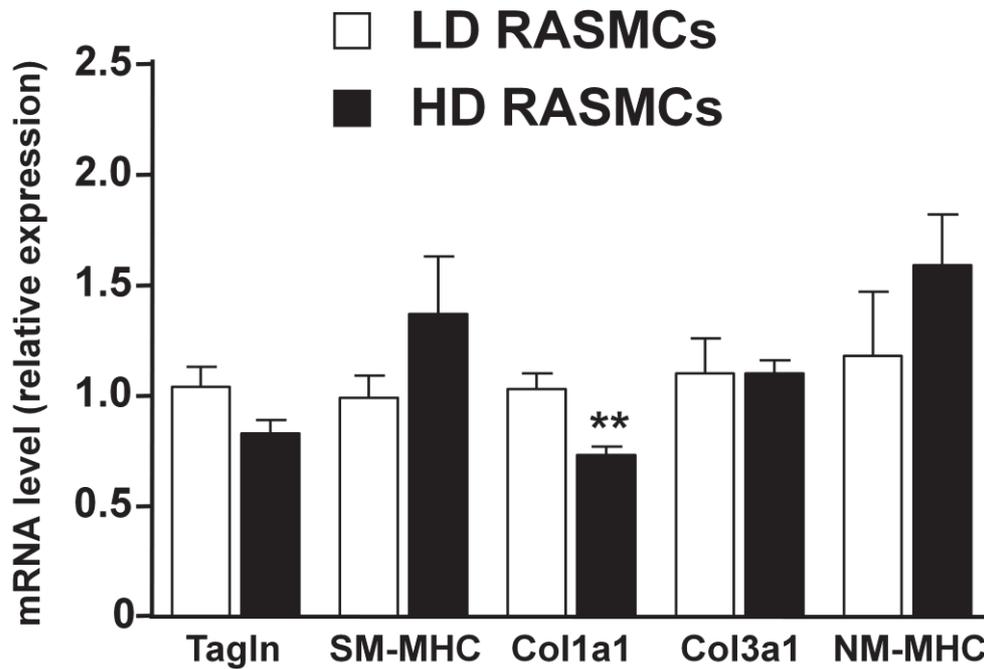


Figure S2. Expression analysis of mRNA encoding cell phenotype markers in LD and HD RASMCs.

RT-qPCR reactions were carried out on mRNAs isolated from RASMCs. Expressions of transgelin (Tagln), smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC), as contractile phenotype markers, and type 1 (Col1a1), type 3 (Col3a1) collagen, non-muscle myosin heavy chain (NM-MHC), as synthetic phenotype markers, were analyzed. mRNA quantification was expressed using the $2^{\Delta Ct}$ method as described in materials and methods. Data are mean \pm SEM of mRNA expression relative to that in LD RASMCs. n = 12-14 experiments. ** P<0.01 *versus* LD RASMCs.

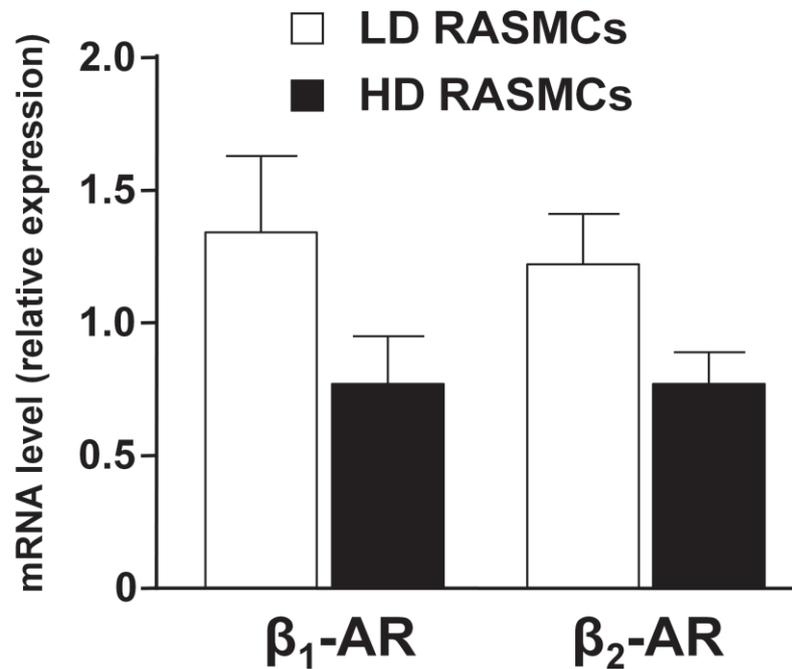


Figure S3. Expression analysis of mRNA encoding β -AR (β_1 and β_2) in LD and HD RASMCs.

RT-qPCR reactions were carried out on mRNAs isolated from RASMCs. The expression of β_1 -AR and β_2 -AR were analyzed. mRNA quantification was expressed using the $2^{\Delta Ct}$ method as described in materials and methods. Data are mean \pm SEM of mRNA expression relative to that in LD RASMCs. n = 12 experiments.

C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que la voie de signalisation de l'AMPC dans les CMLs d'aorte de rat en culture est influencée par la densité cellulaire. Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

✓ Dans les CMLVs ensemencées à haute densité, la concentration basale d'AMPC est inférieure à celle observée dans les CMLVs ensemencées à faible densité, alors que la production d'AMPC suite à une stimulation des récepteurs β -ARs par l'isoprénaline est supérieure .

✓ Dans les cellules ensemencées à haute densité, l'AMPC produit suite à une stimulation à l'isoprénaline met en jeu à la fois les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs et est dégradé principalement par la PDE4. En revanche, dans les cellules ensemencées à faible densité, en réponse à l'isoprénaline, l'AMPC est produit uniquement par le biais des récepteurs β_2 -AR et est dégradé conjointement par les PDE3 et PDE4, l'effet de la PDE3 étant mineur. D'une manière intéressante, l'inhibition de la PDE4 démasque l'effet de la PDE3 dans les cellules ensemencées à haute densité.

✓ Des études de liaison spécifique ont détecté, sur les CMLVs ensemencées à faible densité, une seule population de récepteurs correspondant au récepteur β_2 -AR. En revanche, deux populations de récepteurs ont été détectées sur les CMLVs ensemencées à haute densité avec une proportion de 0.11 et 0.89 correspondant, respectivement, aux récepteurs β_1 - et β_2 -ARs. Ainsi, la contribution différentielle des deux sous-types de récepteurs β -ARs, β_1 et β_2 , dans la production de l'AMPC, selon la densité cellulaire, serait liée à une expression différente de ces deux sous-types de récepteurs dans les deux groupes de cellules.

✓ Dans les CMLVs en culture, les ARNm codant pour plusieurs isoformes de PDE-AMPC sont présents (PDE 1A, 1C, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 7A, 7B et 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, 4A, 4B et 7B) est significativement plus élevée, alors que l'expression de l'ARNm de la PDE8A est significativement plus basse dans les CMLVs ensemencées à haute densité comparativement aux cellules ensemencées à faible densité. Concernant l'activité hydrolytique des PDE-AMPC, l'activité totale est plus importante dans les CMLVs ensemencées à haute densité, mais la contribution relative de la PDE3 et de la PDE4 n'est pas différente.

En conclusion, ces travaux indiquent que la densité cellulaire influence la voie de signalisation β -AR/AMPC/PDEs des CMLs de l'aorte de rat, avec un effet majeur sur

l'expression membranaire du récepteur β_1 -AR et la modulation du profil d'expression et d'activité des PDE-AMPC.

II. Rôle des PDEs-AMPC dans la réactivité vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque

A. Introduction

L'insuffisance cardiaque (IC) est définie par l'incapacité du cœur à assurer, dans des conditions normales, un débit adapté aux besoins de l'organisme. Il a été décrit que la voie de signalisation β -adrénergique cardiaque est altérée au cours de cette pathologie, avec notamment une diminution de la densité des récepteurs β_1 -ARs et un découplage fonctionnel des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs de leur protéine G (Lymperopoulos et al. 2013). Une altération de l'expression, de la distribution et/ou de l'activité des PDEs cardiaques a également été décrite au stade d'hypertrophie cardiaque (Yanaka et al. 2003, Abi-Gerges et al. 2009) mais aussi au cours de l'IC (Lehnart et al. 2005, Ding et al. 2005).

Les altérations vasculaires décrites dans l'IC sont une augmentation des résistances vasculaires périphériques et une dysfonction endothéliale responsable d'une diminution de la biodisponibilité des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRFs) tel que le NO ou d'une libération accrue des facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCFs) (Fang and Marwick 2002). Concernant l'altération de la voie de l'AMPC vasculaire au cours de cette pathologie, certaines études ont mis en évidence une diminution de la vasorelaxation β -adrénergique artérielle (Mathew et al. 1993, Nasa et al. 1996, Toyoshima et al. 1998, McGoldrick et al. 2007), qui serait, dans certains cas, liée à une diminution de la densité des récepteurs β -ARs (Kiuchi et al. 1993, Gaballa et al. 2001). L'impact de l'IC sur le rôle fonctionnel des PDEs vasculaires reste encore peu connu. Une seule étude a exploré l'expression de la PDE3 et de la PDE4 dans l'aorte de rat Dahl sensible au sel, et a rapporté une augmentation de l'activité PDE3, sans modification de l'activité de la PDE4 au stade d'IC (Takahashi et al. 2002).

Dans ce contexte, notre étude a eu pour objectif de mieux comprendre l'impact de l'IC sur l'expression, l'activité et le rôle fonctionnel des principales familles de PDEs-AMPC dans l'aorte de rat et notamment de caractériser leur contribution relative dans la régulation du tonus vasculaire basal et dans la réponse vasorelaxante β -adrénergique et d'évaluer ces fonctions en situation d'IC. Afin de répondre à ces objectifs, nous avons utilisé un modèle animal d'IC induite par une surcharge de pression suite à une sténose de l'aorte ascendante chez le rat (De Sousa et al. 1999). L'induction de l'IC a été validée par la réalisation de mesures échocardiographiques et par la mesure de certains paramètres anatomiques (poids du

cœur et du poumon normalisés sur la longueur du tibia). Des études fonctionnelles de réactivité vasculaire ont été réalisées par une approche pharmacologique sur l'aorte de rat avec le système de cuves à organe isolé, qui nous a permis d'évaluer l'implication de l'endothélium et notamment celle du NO dans la régulation de la fonction vasculaire dans ce contexte pathologique d'IC. Ces études fonctionnelles ont été complétées par différentes approches biochimiques, pour lesquelles ma contribution personnelle à cette étude a été majeure. L'activité hydrolytique des principales familles de PDE-AMPC a été mesurée par une méthode radio-enzymatique associée à l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de ces familles. L'expression des principales isoformes de PDE3 et de PDE4 a été évaluée par RT-PCR quantitative et western blot. Enfin, les concentrations cellulaires d'AMPC et de GMPc dans les anneaux aortiques issus de ces animaux malades et contrôles ont été mesurées par une technique immuno-enzymatique.

B. Résultats : *Article 2 "alteration of vascular reactivity in heart failure : Role of phosphodiesterases 3 and 4"*

Hubert F, **Belacel-Ouari M**, Manoury B, Zhai K, Domergue-Dupont V, Mateo P, Joubert F, Fischmeister R, Leblais V.

British Journal of Pharmacology. 171(23): 5361-75, 2014

RESEARCH PAPER

Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4

F Hubert^{1,2*}, M Belacel-Ouari^{1,2}, B Manoury^{1,2}, K Zhai^{1,2†},
V Domergue-Dupont^{2,3}, P Mateo^{1,2}, F Joubert^{1,2‡}, R Fischmeister^{1,2} and
V Leblais^{1,2}

¹Faculté de Pharmacie, Inserm UMR-S 769, LabEx LERMIT-DHU TORINO, Châtenay-Malabry, France, ²Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France, and ³Plateforme Animalerie et Exploration Fonctionnelle, IPSIT/IFR141, Châtenay-Malabry, France

Correspondence

V Leblais, UMR-S 769, LabEx LERMIT, DHU TORINO, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.
E-mail: veronique.leblais@u-psud.fr

*Present address: Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, Canada.

†Present address: National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China.

‡Present address: UMR 8237, CNRS-UPMC, Paris, France.

Received

8 August 2013

Revised

24 June 2014

Accepted

12 July 2014

BACKGROUND AND PURPOSE

This study examined the role of the main vascular cAMP-hydrolysing phosphodiesterases (cAMP-PDE) in the regulation of basal vascular tone and relaxation of rat aorta mediated by β -adrenoceptors, following heart failure (HF).

EXPERIMENTAL APPROACH

Twenty-two weeks after proximal aortic stenosis, to induce HF, or SHAM surgery in rats, we evaluated the expression, activity and function of cAMP-PDE in the descending thoracic aorta.

KEY RESULTS

HF rat aortas exhibited signs of endothelial dysfunction, with alterations of the NO pathway, and alteration of PDE3 and PDE4 subtype expression, without changing total aortic cAMP-hydrolytic activity and PDE1, PDE3 and PDE4 activities. Vascular reactivity experiments using PDE inhibitors showed that PDE3 and PDE4 controlled the level of $\text{PGF}_{2\alpha}$ -stimulated contraction in SHAM aorta. PDE3 function was partially inhibited by endothelial NO, whereas PDE4 function required a functional endothelium and was under the negative control of PDE3. In HF, PDE3 function was preserved, but its regulation by endothelial NO was altered. PDE4 function was abolished and restored by PDE3 inhibition. In $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted arteries, β -adrenoceptor stimulation-induced relaxation in SHAM aorta, which was abolished in the absence of functional endothelium, as well as in HF aortas, but restored after PDE3 inhibition in all unresponsive arteries.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Our study underlines the key role of the endothelium in controlling the contribution of smooth muscle PDE to contractile function. In HF, endothelial dysfunction had a major effect on PDE3 function and PDE3 inhibition restored a functional relaxation to β -adrenoceptor stimulation.

Abbreviations

BAY, BAY-60-7550; cAMP-PDE, cAMP-hydrolysing PDE; CRC, concentration–response curve; HF, heart failure; MIMX, 8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthine; PSS, physiological salt solution; Ro, Ro-20-1724; SMC, smooth muscle cell; SNP, sodium nitroprusside

Tables of Links

TARGETS	LIGANDS
β-Adrenoceptors	BAY-60-7550
PDE3A	Cilostamide
PDE3B	IBMX
PDE4B	Isoprenaline
PDE4D	Ro-20-1724

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14 (Alexander *et al.*, 2013a,b)

Introduction

In the vascular system, cAMP is a key physiological second messenger that inhibits contraction, proliferation and migration of the smooth muscle cells (SMCs). The intracellular concentration of cAMP is determined by the balance between its production by adenylyl cyclase (AC) and degradation by phosphodiesterases hydrolysing cAMP (cAMP-PDEs).

Stimulation of β-adrenoceptors, which are characteristically coupled to the AC/cAMP pathway, causes vasodilation through protein kinase-dependent mechanisms (Eckly-Michel *et al.*, 1997). β-Adrenoceptors may be located on endothelial cells, on SMCs, or both depending on the vascular bed and the β-adrenoceptor subtype (Flacco *et al.*, 2013). In rat aorta, the endothelium appears not to be necessary for β-adrenoceptor relaxation but it exerts a regulatory role by controlling the SMC precontraction level (Eckly *et al.*, 1994) and the SMC concentration of cGMP through NO release (Lugnier and Komasa, 1993; Eckly and Lugnier, 1994).

The cAMP-mediated relaxation can be decreased by the degradation of cAMP through the action of PDEs. PDEs comprise a large group of more than 50 isoenzymes that are classified into 11 families. Blood vessels express four dominant cAMP-hydrolysing PDE (cAMP-PDE) families: the Ca²⁺/calmodulin-stimulated PDE1, the cGMP-stimulated PDE2, the cGMP-inhibited PDE3 and the cAMP-specific PDE4, with PDE3 and PDE4 providing the main cAMP-hydrolysing activity (Komasa *et al.*, 1991; Polson and Strada, 1996; Zhai *et al.*, 2012). In rat aorta, both PDE3 and PDE4 inhibitors induce a vasorelaxation and potentiate the relaxation to β-adrenoceptor agonists (Komasa *et al.*, 1991; Lugnier and Komasa, 1993; Delpy *et al.*, 1996). These cAMP-mediated responses may be modulated by the endothelium and the NO/cGMP pathway, because cGMP inhibits PDE3 activity by competition with cAMP on its catalytic site (Lugnier and Komasa, 1993; Delpy *et al.*, 1996).

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. Numerous studies have reported down-regulation of the cardiac β-adrenoceptor signalling pathway in HF (Lohse *et al.*, 2003). More recently, alterations of the expression, distribution or activity of cardiac PDEs were also shown to be involved in

cardiac hypertrophy (Yanaka *et al.*, 2003; Abi-Gerges *et al.*, 2009; Mokni *et al.*, 2010) and HF (Ding *et al.*, 2005; Lehnart *et al.*, 2005; Pokreisz *et al.*, 2009). HF is also characterized by vascular morphological and functional alterations, in particular an increase in vessel wall thickness, an increase in the vasomotor tone at rest, and a decrease in vasodilator endothelium-dependent and endothelium-independent responses (Francis and Cohn, 1990; Negrao *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001). This endothelial dysfunction may result from impaired release of endothelium-derived relaxing factors such as NO or increased release of endothelium-derived contracting factors (Kaiser *et al.*, 1989; Katz *et al.*, 1993). Less attention was paid to the effects of HF on the vascular β-adrenoceptor/cAMP/PDE pathway. Most studies reported a decrease in the β-adrenoceptor-mediated vasorelaxation in systemic and/or pulmonary arteries isolated from different models of HF animals (Mathew *et al.*, 1993; Nasa *et al.*, 1996; McGoldrick *et al.*, 2007), which was in some cases related to a decrease in β-adrenoceptor density (Kiuchi *et al.*, 1993; Gaballa *et al.*, 2001). One study also reported an enhanced PDE3 activity in rat aorta isolated from a model of salt-induced hypertension and HF (Takahashi *et al.*, 2002). However, the effects of HF on the functional role of vascular PDEs has never been evaluated.

This study was thus designed to characterize the role of the main vascular cAMP-PDE families in the regulation of the basal vascular tone and the relaxant response to β-adrenoceptor stimulation and to evaluate the effects of HF on these functions, and on the expression profile of the cAMP-PDEs.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures conformed to the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament) and authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (No. D-92-283, 13 December 2012). All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath

et al., 2010). A total of 106 animals were used in the experiments described here.

Detailed methods are included in Supporting Information Appendix S1.

Surgical procedure

Aortic stenosis was induced in male Wistar rats (60–70 g; Elevage Janvier, Le Genest St Isle, France) by placing a stainless steel haemoclip on the ascending aorta to induce HF, as previously described (Joubert *et al.*, 2008). SHAM-operated animals were used as controls.

Echocardiography and blood pressure measurement

Two-dimensional-guided M-mode echocardiography was performed at 22 weeks after surgery on 10 SHAM-operated and 9 HF rats, using a 12 MHz transducer (Vivid 7; General Electric Healthcare, Vélizy Villacoublay, France) under isoflurane gas anaesthesia. Arterial blood pressure was measured in 9 SHAM-operated and 6 HF conscious rats using a tail-cuff system (CODA™, Kent Scientific, Torrington, CT, USA).

Rat aorta sampling

Twenty-two weeks after surgery, rats were killed and the descending thoracic aorta excised and cut into rings, 2-mm long. In some preparations, the endothelium was removed. For biochemical studies, rings were frozen in liquid nitrogen.

Cyclic AMP-PDE activity assay

Cyclic AMP-PDE activity was measured according to the method described by Thompson and Appleman (1971), as previously reported (Zhai *et al.*, 2012). The radioenzymatic assay was performed in the absence or presence of selective PDE inhibitors: 10 μ M 8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthine (MIMX) for PDE1 (Rich *et al.*, 2001), 100 nM BAY-60-7550 (BAY) for PDE2 (Boess *et al.*, 2004), 1 μ M cilostamide for PDE3 (Sudo *et al.*, 2000), 10 μ M Ro-20-1724 (Ro) for PDE4 or 1 mM IBMX as a non-selective PDE inhibitor (Rich *et al.*, 2001). 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).

Western blot analysis

Primary antibodies directed against PDE3A (gift from Dr Chen Yan, Columbia University, NY, USA), PDE3B (gift from Dr Emilio Hirsch, University of Torino, Italy), PDE4B (gift from Dr Marco Conti, University of California, San Francisco, CA, USA) and β -actin (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) were used. The PDE signal was normalized to the β -actin signal.

Quantitative RT-PCR analysis

mRNAs encoding four PDE subtypes (PDE3A, PDE3B, PDE4B and PDE4D) and two housekeeping genes [TBP (TATA box-binding protein) and Ywhaz: 14-3-3 protein zeta/delta] were analysed, as previously described (Zhai *et al.*, 2012). PDE gene expression level was calculated using the comparative threshold (Ct) method ($2^{-\Delta Ct}$).

Vascular reactivity measurement

Aortic rings were mounted in standard organ bath chambers. In a first set of experiments, concentration–response curves (CRCs) to $\text{PGF}_{2\alpha}$ were obtained in arteries pretreated with or without a selective PDE inhibitor (1 μ M cilostamide for PDE3 or 10 μ M Ro for PDE4). In a second set of experiments, aortic rings were submaximally precontracted with $\text{PGF}_{2\alpha}$ and CRCs were conducted using increasing concentrations of either the muscarinic agonist carbachol, the selective PDE inhibitors, cilostamide or Ro, or the β -adrenoceptor agonist isoprenaline, in the presence of an α -adrenoceptor antagonist (10 μ M phentolamine) (Leblais *et al.*, 2008). In some cases, these experiments were performed in arteries pretreated in the presence of the following agents: the PDE3 inhibitor cilostamide (1 μ M), the PDE4 inhibitor Ro (10 μ M) or the NOS inhibitor L-NAME (300 μ M).

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 nucleotide measurements

Cyclic AMP and cGMP contents were determined by an enzyme immunoassay (monoclonal anti-cAMP and anti-cGMP EIA kits; NewEast Biosciences, King of Prussia, PA, USA) on lysates obtained from rings incubated with the selective PDE inhibitors (1 μ M cilostamide for PDE3 or 10 μ M Ro for PDE4) or the vehicle. As positive controls, some rings were incubated with L-858051 (10 μ M) or sodium nitroprusside (SNP; 1 μ M) in the presence of 100 μ M IBMX. Results are expressed in pmol of cAMP or cGMP per ring.

Data and statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM, where n represents the number of rats, except for Figure 3 where n represents the number of vessels. Differences between CRCs were analysed using a two-way repeated-measures ANOVA. Different parameters were compared using Student's t -test. Values of $P < 0.05$ were considered to show statistical significance.

Materials

$\text{PGF}_{2\alpha}$ (Dinoprost tromethamine, Dinoprost®) was obtained from Pfizer Animal Health (Paris, France). Carbamylcholine chloride (carbachol), IBMX, (-)-isoprenaline hydrochloride, L-NAME, phentolamine hydrochloride and SNP were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin, Fallavier, France). BAY-60-7550 was from Cayman Chemical (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France), Cilostamide from Tocris Bioscience (Bristol, UK), MIMX and Ro-20-1724 from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK), and L-858051 from Biomol International (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France). When pharmacological inhibitors were dissolved in non-aqueous vehicle, control experiments were performed in the presence of equivalent concentration of vehicle (DMSO).

Results

Anatomical, echocardiographic and blood pressure parameters

Twenty-two weeks after surgery, rats with aortic stenosis exhibited decreased body weight and increased heart and

Table 1

Anatomical, echocardiographic and blood pressure parameters from SHAM and HF rats

Anatomical parameters	SHAM (n = 48)	HF (n = 43)	P
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 ⁻¹)	404 ± 6	859 ± 25	<0.001
Lung weight/tibia length (mg·cm ⁻¹)	397 ± 6	908 ± 37	<0.001
Liver weight/tibia length (g·cm ⁻¹)	3.82 ± 0.08	3.93 ± 0.11	NS
Echocardiographic parameters	SHAM (n = 10)	HF (n = 9)	P
Left ventricular mass (mg)	1104 ± 73	1993 ± 238	<0.01
Fractional shortening (%)	48.5 ± 2.3	24.4 ± 2.7	<0.001
Blood pressure	SHAM (n = 9)	HF (n = 6)	P
Diastolic blood pressure (mmHg)	90 ± 2.7	77 ± 3.9	<0.05
Systolic blood pressure (mmHg)	132 ± 3.1	108 ± 4.4	<0.001
Mean blood pressure (mmHg)	103 ± 2.7	87 ± 4	<0.01

Values are mean ± SEM. *n*, number of animals. *P*, statistical differences between SHAM and HF groups, NS, non-significant (Student's *t*-test).

lung weight normalized to the tibia length, compared with SHAM animals. Signs of congestive HF, such as ascites, pleural effusions and oedema, were also observed in these rats. Echocardiographic analysis showed an increase in left ventricular mass by 80% ($P < 0.01$) and a twofold decrease in fractional shortening ($P < 0.001$) after stenosis (Table 1). Overall, these observations provide evidence for the presence of left ventricular hypertrophy associated with major cardiac dysfunction in rats with aortic stenosis, confirming the occurrence of severe HF. Furthermore, these rats displayed a decrease in blood pressure parameters by about 14–18% compared with SHAM animals (Table 1).

cAMP-PDE activity in aorta from SHAM and HF rats

Total cAMP-PDE activity was similar in intact or endothelium-denuded aorta isolated from SHAM and HF rats (Figure 1A). In intact aorta isolated from SHAM rats, the total cAMP-PDE activity was barely decreased by the PDE1 inhibitor, MIMX (10 μM), but not modified by the PDE2 inhibitor, BAY (100 nM), suggesting the absence of PDE2 activity (Figure 1B). Both PDE3 (cilostamide, 1 μM) and PDE4 (Ro, 10 μM) inhibitors reduced the cAMP-hydrolytic activity by 48% ($P < 0.01$) and 28% ($P = 0.05$) respectively. Finally, the broad-spectrum PDE inhibitor, IBMX (1 mM), almost completely abolished the total cAMP-PDE activity ($P < 0.01$). This suggests that the rank order of PDE families contributing to the global cAMP-PDE activity in SHAM aortas was PDE3 > PDE4 >> PDE1. Removal of endothelium from SHAM aortas did not affect this pattern of cAMP-hydrolysing activities (Figure 1B). Aortas isolated from HF rats exhibited similar cAMP-PDE family activities compared with 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 Ro ($P < 0.05$) (Figure 1B).

Expression of PDE3 and PDE4 families in aorta from SHAM and HF rats

We then evaluated the effects of HF on the vascular expression of the two main PDE families, PDE3 and PDE4, by the Western blot technique. Two PDE3A isoforms of 98 and 120 kDa were detected (Figure 2A), in accordance with previous reports in vascular cells (Zhao *et al.*, 2008) and myocardium (Abi-Gerges *et al.*, 2009). Expression of the 98 kDa isoform was significantly increased in aorta isolated from HF compared with SHAM rats, whereas the expression of the 120 kDa isoform tended to increase although the difference did not achieve significance (Figure 2D). Using a PDE3B polyclonal antibody, we detected a main band around 125 kDa (Figure 2B). We confirmed the identity of this band as PDE3B protein by using HEK cells overexpressing PDE3B (data not shown). Expression of aortic PDE3B protein was similar in SHAM and HF animals (Figure 2D). Using a PDE4B polyclonal antibody, we detected a band of 68 kDa (Figure 2C) that was lost in aorta isolated from *Pde4b*^{-/-} mice compared with their wild-type littermates (data not shown). A 68 kDa PDE4B isoform has been previously reported in vascular cells (Zhao *et al.*, 2008). PDE4B expression was significantly raised in aorta isolated from HF compared with that from SHAM rats (Figure 2D).

We also evaluated the pattern of PDE gene expression by RT-PCR. PDE3B and PDE4B mRNAs were significantly increased in aortas isolated from HF compared with SHAM rats (Figure 2E). PDE3A mRNA was slightly although not significantly higher in HF aortas (40% increase compared with

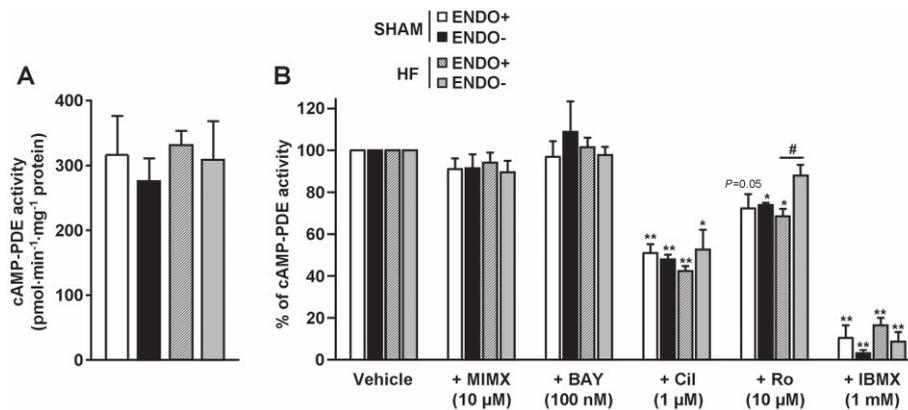


Figure 1

cAMP-PDE activity in aorta with or without functional endothelium, isolated from SHAM and HF rats. (A) Total cAMP-PDE activity was determined in the presence of 1 μM [³H]-cAMP in lysates of SHAM and HF endothelium-intact (ENDO+) or endothelium-denuded (ENDO-) aortas. (B) cAMP-PDE activity pattern was determined in the absence (vehicle) or presence of a selective PDE family inhibitor (PDE1: 10 μM MIMX; PDE2: 100 nM BAY; PDE3: 1 μM cilostamide (Cil); PDE4: 10 μM Ro) or a non-selective PDE inhibitor (IBMX: 1 mM). Results are expressed in % of cAMP-PDE activity measured in the absence of inhibitors. Data are means ± SEM of three independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, significantly different from vehicle group. #*P* < 0.05, significant effect of endothelial removal.

SHAM aortas, *n* = 6), whereas PDE4D mRNA expression was similar in both groups (Figure 2E).

Vascular function in aortas isolated from SHAM and HF rats

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) (Figure 3A). Endothelium removal increased this response in both groups by 18.5% in SHAM (*P* < 0.001) and 10.5% in HF (*P* < 0.01). The CRC to PGF_{2α}, a vasoconstrictor agent acting through stimulation of prostanoid receptors, was significantly shifted to the left in intact aorta from HF rats compared with SHAM rats (Figure 3B). Endothelium removal caused a significant leftward shift of the CRC to PGF_{2α} in aortas from SHAM rats without any change in the maximum response (Figure 3B). In HF aortas, the curves were not significantly different in the presence or absence of endothelium, although the pD₂ value was slightly increased after endothelium removal (Figure 3B). In PGF_{2α}-precontracted aortic rings, the endothelial NO-dependent relaxation elicited by the muscarinic agonist carbachol was severely impaired in aortas from HF rats (Figure 3C). 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 PGF_{2α} in aortas isolated from SHAM and HF rats

In intact arteries isolated from SHAM and HF rats, pretreatment with the PDE3 inhibitor cilostamide (1 μM) similarly shifted to the right the contractile response curves to PGF_{2α} compared with their respective controls, without modification of the maximum contraction (Figure 4A and B). The inhibitory effect of cilostamide on the PGF_{2α}-induced con-

traction was preserved in endothelium-denuded rings from both groups (Figure 4A and B). These data indicate that PDE3 inhibition similarly decreases the sensitivity to PGF_{2α} in aortas from SHAM and HF rats, independently of the presence of a functional endothelium.

In intact aortas from SHAM rats, the PDE4 inhibitor Ro (10 μM) decreased the contractile response to PGF_{2α}. However, in endothelium-denuded arteries, the effect of Ro was abolished (Figure 4C). In HF aorta, Ro treatment did not alter the contractile response to PGF_{2α}, either in the presence or absence of endothelium (Figure 4D). Thus, to counter aortic contraction, PDE4 inhibition requires an intact and functional endothelium.

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

To further elucidate the role of PDE3 and PDE4, CRCs to cilostamide and Ro were obtained in rat aorta submaximally precontracted with PGF_{2α}. In aortas isolated from SHAM rats, cilostamide induced a concentration-dependent relaxation, which was increased to a similar extent after endothelium removal or pretreatment with 300 μM L-NAME (Figure 5A). This indicated that in SHAM aortas, removing endothelial function or reducing NO production facilitated the relaxant response to the PDE3 inhibitor, suggesting that endothelial NO exerted an inhibitory control on PDE3 activity. In HF aortas, cilostamide induced a similar relaxation to that observed in SHAM aortas [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], which was markedly potentiated after endothelium removal and to a lower extent in the presence of L-NAME (Figure 5B). This indicated that in HF aortas, the endothelium-dependent inhibitory control of PDE3 activity was maintained but only partly mediated by NOS activity.

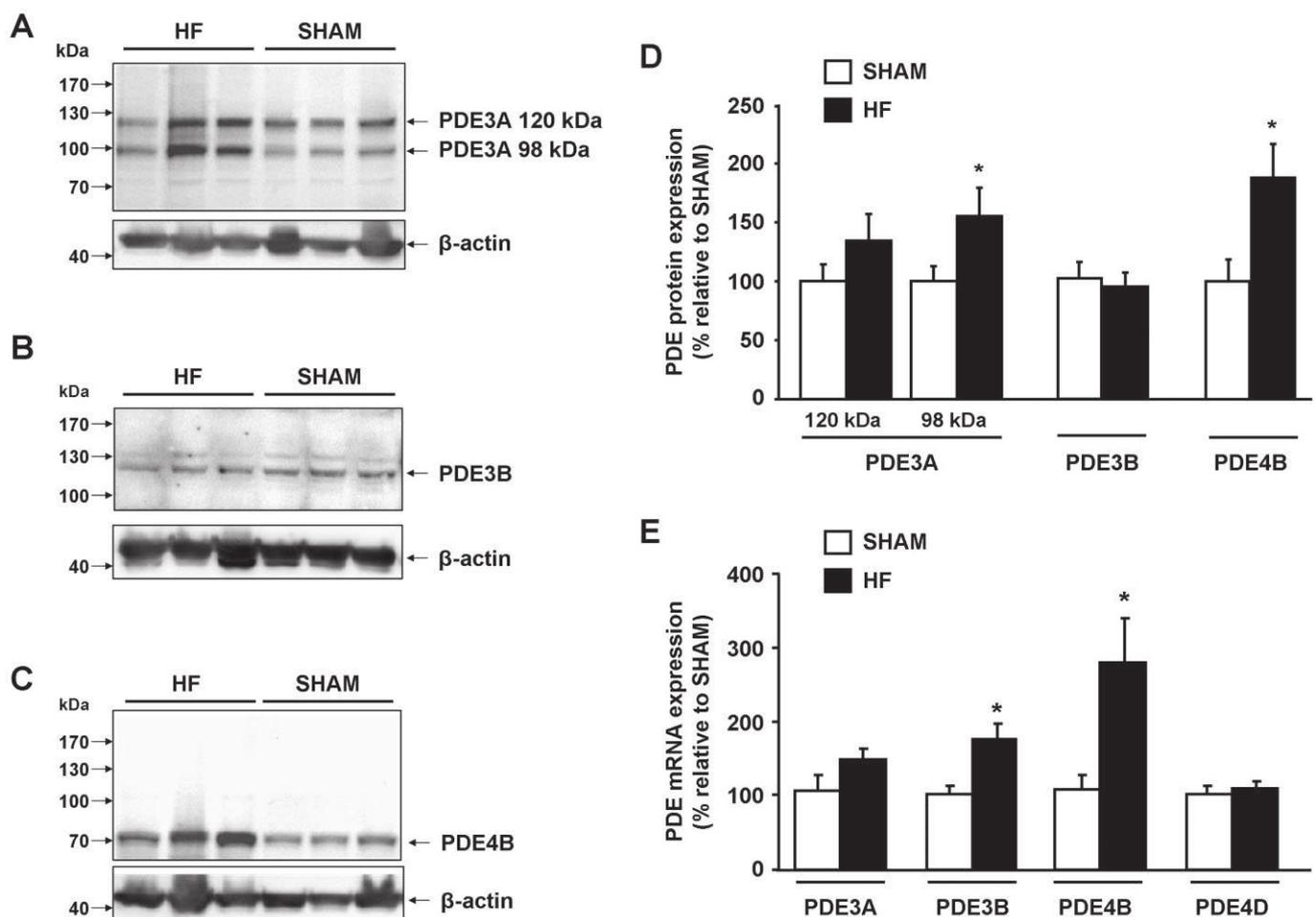


Figure 2

Expression of PDE3 and PDE4 proteins (A–D) and mRNAs (E) in aorta isolated from SHAM and HF rats. (A–C) Representative Western blot images showing PDE3A, PDE3B, PDE4B and β -actin expression in aorta from SHAM and HF rats. (D) Corresponding graph showing relative expression level of PDE3A, PDE3B and PDE4B proteins. Results are expressed in % of the mean expression level in SHAM group. Data are means \pm SEM of 9–12 SHAM and 9–11 HF rats, detected in three to four independent immunoblots. (E) PDE3A, PDE3B, PDE4B and PDE4D mRNA expression in aorta from SHAM and HF rats. Results are expressed in % of the mean expression level in SHAM group. Data are means \pm SEM of six SHAM and six HF rats. * $P < 0.05$, significant effect of HF.

In $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted SHAM aorta, increasing concentrations of Ro produced a concentration-dependent relaxation, which was abolished by L-NAME or removal of the endothelium (Figure 5C), indicating that the relaxant effect induced by PDE4 inhibition requires a functional endothelium and NO. In HF aortas, Ro had no effect on the precontractile tone, either in control conditions or after incubation with L-NAME or endothelium removal (Figure 5D).

We then evaluated the effect of a pretreatment of the arteries with the PDE3 inhibitor cilostamide (1 μM for 10 min prior to $\text{PGF}_{2\alpha}$ application) on the relaxant response to Ro. Pretreatment with cilostamide significantly enhanced the Ro-induced relaxation in SHAM aorta, and restored a relaxation in endothelium-denuded arteries to a similar extent as observed in intact arteries (Figure 5E). In HF rats, cilostamide pretreatment restored a strong relaxant response to Ro in both endothelium-intact and endothelium-denuded aortas (Figure 5F). These results indicated that PDE4 function was under the negative control of PDE3.

Relaxations to β -adrenoceptor stimulation in aortas isolated from SHAM and HF rats

In endothelium-intact rings of SHAM aortas precontracted with $\text{PGF}_{2\alpha}$, the non-selective β -adrenoceptor agonist isoprenaline produced a concentration-dependent relaxation [pD_2 : 7.5 ± 0.2 ($n = 13$)] which was abolished in the presence of L-NAME or after endothelium removal (Figure 6A). In HF aortas, the relaxant effect of isoprenaline was absent even in endothelium-intact arteries (Figure 6B). Thus, aortic relaxation to β -adrenoceptor stimulation requires a functional endothelial NO pathway which is lost in HF aortas due to endothelial dysfunction.

Role of PDE3 and PDE4 in the relaxation to β -adrenoceptor stimulation in aortas isolated from SHAM and HF rats

As shown in Figure 7A, cilostamide pretreatment increased the maximum relaxation to isoprenaline by 16% ($P < 0.05$) in

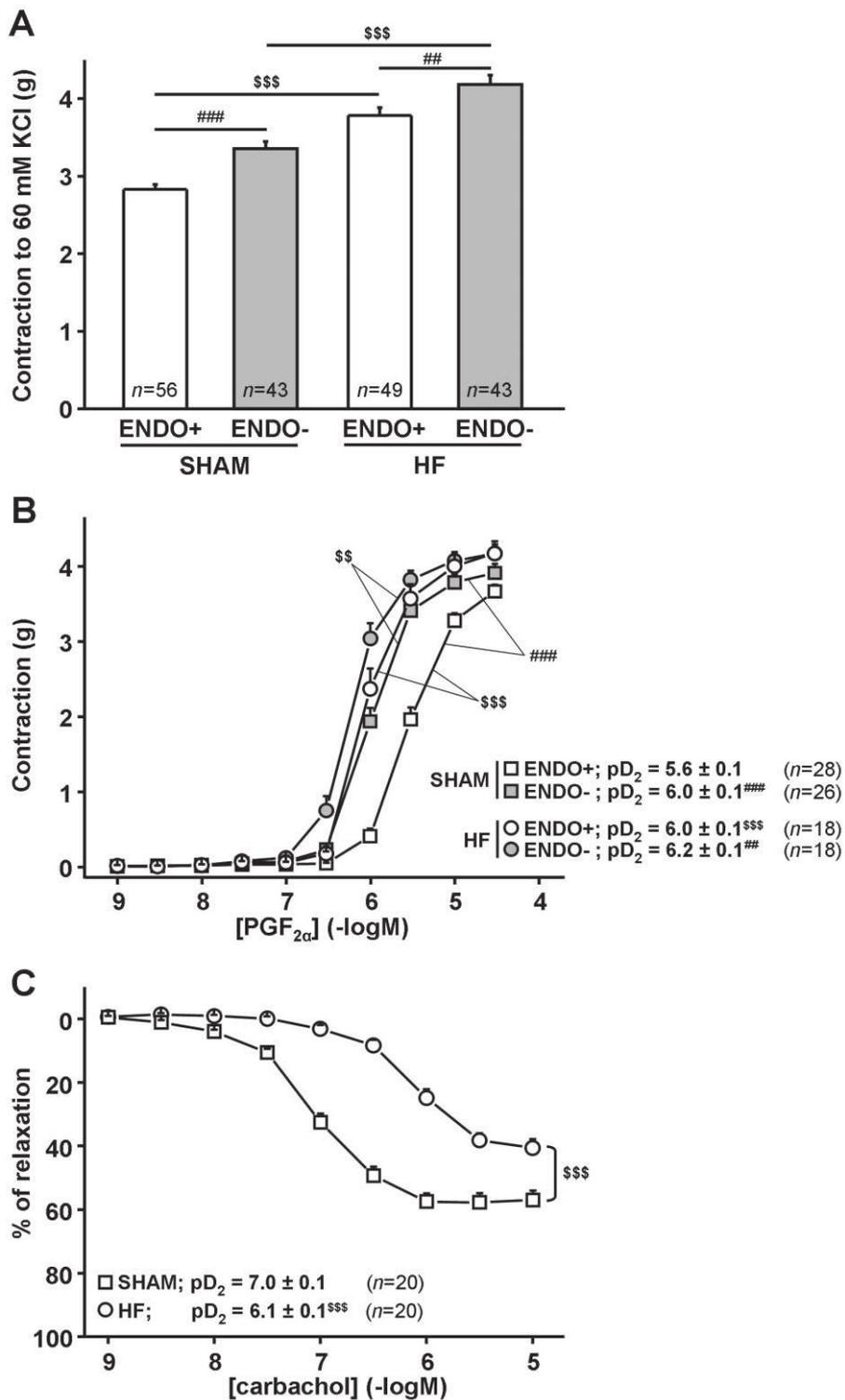


Figure 3

Evaluation of vascular reactivity in aorta isolated from SHAM and HF rats with or without functional endothelium. (A) Contractile response to a depolarizing solution of 60 mM KCl in SHAM and HF endothelium-intact (ENDO+) or endothelium-denuded (ENDO-) rat aortas. (B) CRCs to PGF_{2α} (1 nM to 30 μM) in SHAM and HF ENDO+ and ENDO- aortas. (C): Relaxant-response curves to carbachol (1 nM to 10 μM) on PGF_{2α}-precontracted ENDO+ aortas isolated from SHAM and HF rats. Data are means ± SEM. ^{##}P < 0.01, ^{###}P < 0.001, significant effect of endothelial removal; ^{\$}P < 0.01, ^{\$\$\$}P < 0.001, significant effect of HF.

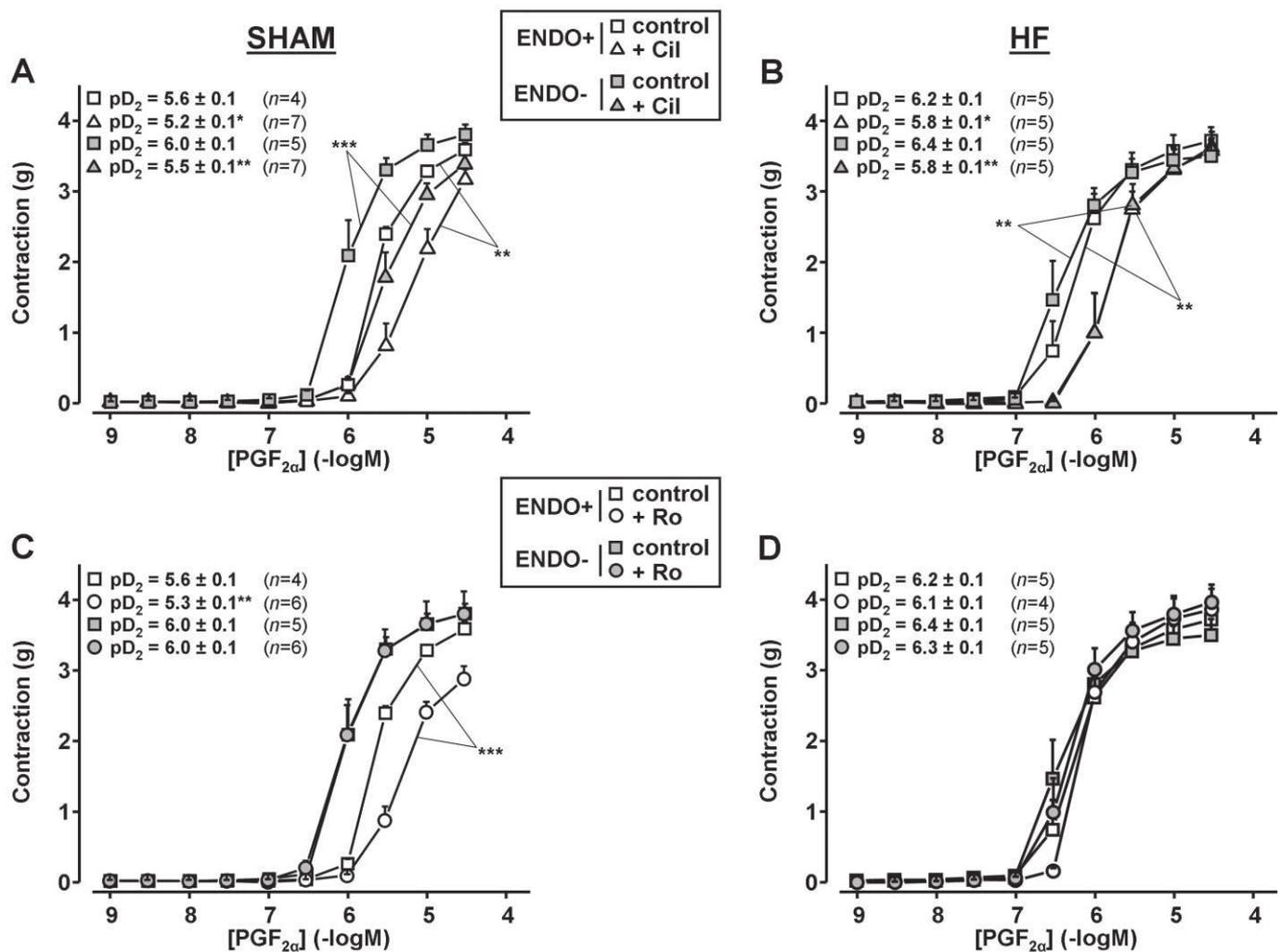


Figure 4

Effect of PDE3 or PDE4 inhibition on $PGF_{2\alpha}$ -induced contraction in aorta isolated from SHAM and HF rats with or without functional endothelium. CRCs to $PGF_{2\alpha}$ (1 nM to 30 μ M) were performed in SHAM (A and C) and HF (B and D) endothelium-intact (ENDO+) or endothelium-denuded (ENDO-) aortas, in the absence (control) or presence of selective PDE inhibitors: (A and B) 1 μ M Cil for PDE3; (C and D) 10 μ M Ro for PDE4. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significant effect of PDE inhibitor in each group.

endothelium-intact SHAM aortas. In HF aortas, cilostamide treatment unmasked a marked relaxation to isoprenaline (Figure 7B), which was similar to that observed in SHAM rat arteries in the presence of cilostamide. In endothelium-denuded aortas (Figure 7C and D) or under NOS inhibition by L-NAME (Figure 7E and F), incubation with cilostamide restored a relaxation to isoprenaline in both SHAM and HF groups. These results indicate that the relaxation of aorta mediated by β -adrenoceptor stimulation was negatively controlled by PDE3 activity. In HF aortas, the loss of this relaxation was unmasked when PDE3 was inhibited.

As shown in Figure 7A, Ro treatment significantly increased the isoprenaline relaxation in endothelium-intact SHAM aortas. In intact HF aortas, Ro restored a small relaxant response to isoprenaline (Figure 7B). By contrast, Ro treatment did not restore the isoprenaline-induced relaxation that was impaired by endothelium removal (Figure 7C and D) or

NOS inhibition (Figure 7E and F). These results indicated that the aortic relaxation mediated by β -adrenoceptor stimulation was also negatively controlled by PDE4 activity which was largely dependent on the endothelium functionality. In HF aortas, the loss of relaxation to β -adrenoceptor stimulation was unmasked by PDE4 inhibition albeit to a lower extent than with PDE3 inhibition.

Effect of PDE3 and PDE4 inhibitors on cAMP and cGMP levels in aortas isolated from SHAM and HF rats

Basal cAMP levels were similar in intact aorta rings isolated from SHAM and HF rats [2.2 ± 0.4 pmol per ring ($n = 6$) vs. 2.8 ± 0.6 pmol per ring ($n = 6$) respectively]. Direct stimulation of AC with L-858051, a forskolin analogue, in the presence of IBMX strongly raised cAMP levels by 25- and 32-fold in SHAM and HF aortas respectively (data not shown, $n = 5$).

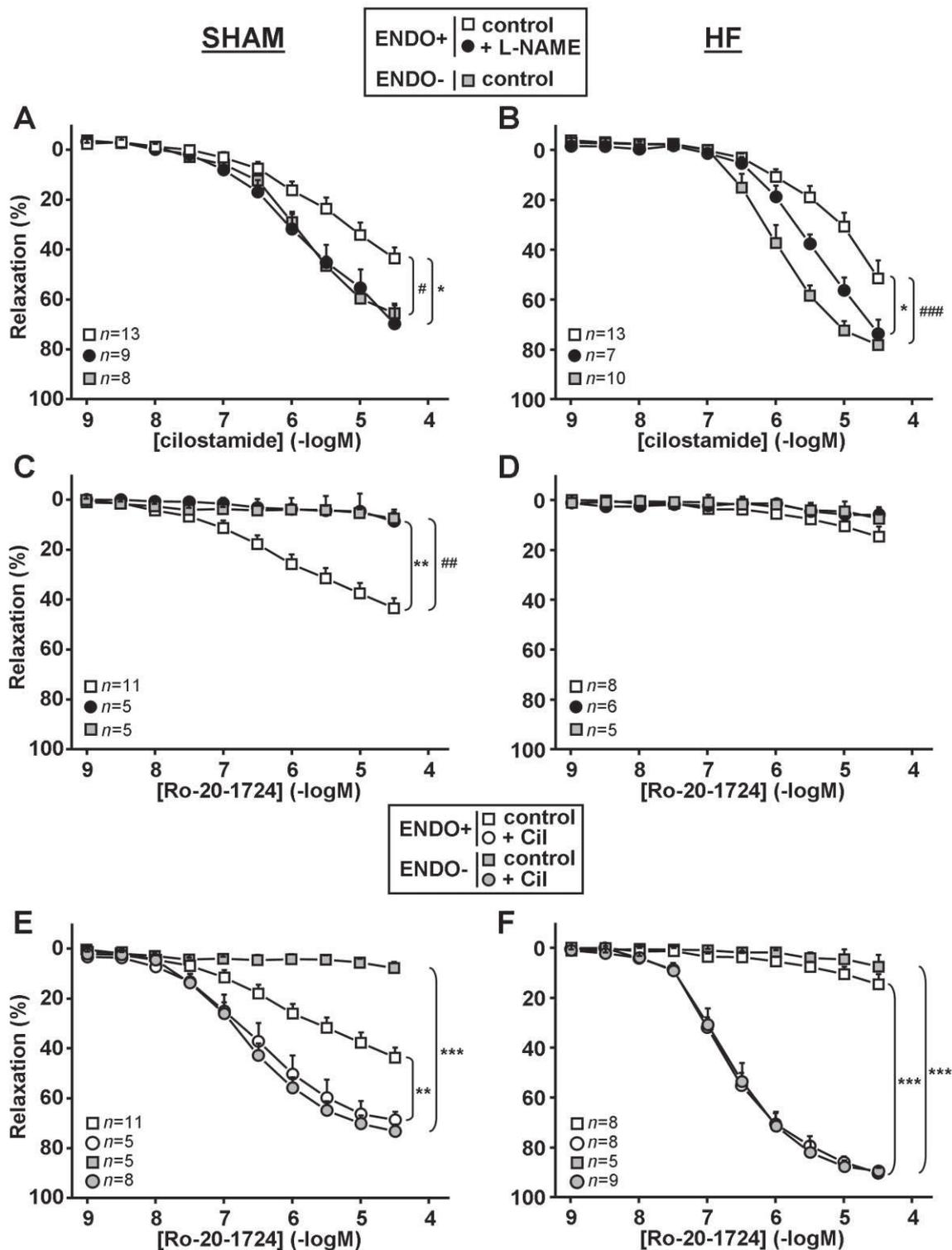


Figure 5

Effect of L-NAME, Cil and endothelium removal on PDE3 or PDE4 inhibition-induced relaxant response in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats. (A–D) CRCs to Cil (1 nM to 30 μ M; A and B) or Ro (1 nM to 30 μ M; C and D) were performed in endothelium-intact arteries (ENDO+) pretreated in the absence (control) or presence of the NOS inhibitor (300 μ M L-NAME) and in endothelium-denuded arteries (ENDO-/control) isolated from SHAM (A and C) and HF (B and D) rats and precontracted with $\text{PGF}_{2\alpha}$. (E–F) CRCs to Ro (1 nM to 30 μ M) were performed either in endothelium-intact (ENDO+) or endothelium-denuded (ENDO-) arteries isolated from SHAM (E) and HF (F) rats, and pretreated in the absence (control) or presence of 1 μ M Cil. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significant effect of L-NAME or PDE inhibitor; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, significant effect of endothelial removal.

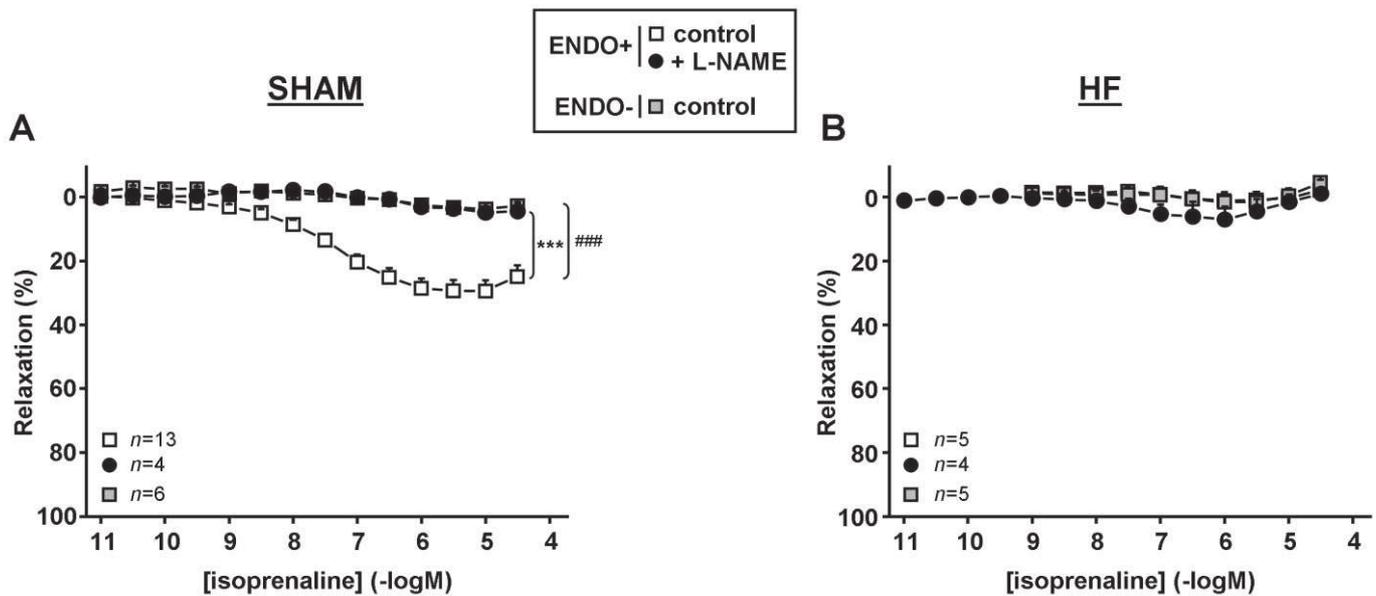


Figure 6

Effect of L-NAME and endothelium removal on relaxation to β -adrenoceptor stimulation in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats. CRCs to isoprenaline (0.01 nM to 30 μ M) were performed in endothelium-intact arteries (*ENDO+*) pretreated in the absence (*control*) or presence of the NOS inhibitor (300 μ M L-NAME) and in endothelium-denuded arteries (*ENDO-/control*) isolated from SHAM (A) and HF (B) rats and precontracted with $\text{PGF}_{2\alpha}$. Data are means \pm SEM. *** $P < 0.001$, significant effect of L-NAME. #### $P < 0.001$, significant effect of endothelial removal.

Treatment with Ro but not with cilostamide induced a significant 2.5-fold increase in cAMP levels in SHAM-intact aortas (Figure 8A). This effect was absent in intact HF aortas, and markedly reduced in endothelium-denuded SHAM aortas (Figure 8A).

In HF aortas, basal cGMP levels were slightly reduced by 25% compared with SHAM aortas [0.8 ± 0.2 pmol per ring ($n = 6$) vs. 1.1 ± 0.3 pmol per ring ($n = 5$) respectively]. Endothelium denudation decreased cGMP levels by 38 and 58% in HF and SHAM aortas respectively [0.5 ± 0.2 pmol per ring ($n = 5$) and 0.4 ± 0.1 pmol per ring ($n = 3$) respectively]. Treatment with the NO donor SNP in the presence of IBMX strongly enhanced cGMP levels by 28- and 17-fold in SHAM and HF aortas respectively (data not shown, $n = 5$). By contrast, treatment with cilostamide or Ro had no significant effect on cGMP level in any groups of SHAM and HF aortas (Figure 8B).

Discussion

In this study, we characterized the expression, activity and functional role of the cAMP-PDE subtypes in aortas isolated from SHAM and HF rats. Our main results can be summarized as follows: (i) PDE3 and PDE4 are the main PDE families responsible for cAMP hydrolysis in SHAM and HF aortas; (ii) PDE3 and PDE4 family expression is altered in HF; (iii) PDE3 inhibition with cilostamide induces a vasorelaxation in precontracted SHAM and HF aortas whether the endothelium is present or not; (iv) moreover, the relaxant effect induced by cilostamide is potentiated when the endothelium is removed or upon NOS inhibition; (v) PDE4 inhibition with Ro induces

an increase in cAMP level and a vasorelaxation in SHAM but has no effect in HF aorta; (vi) these effects of Ro are absent when the endothelium is removed or upon NOS inhibition; (vii) however, a large vasorelaxant effect of Ro is revealed in endothelium-denuded SHAM aorta as well as in HF aorta when PDE3 is inhibited; (viii) β -adrenoceptor stimulation induces an endothelium- and NOS-dependent vasorelaxation in SHAM aorta but has no effect in HF; and (ix) the relaxation mediated by β -adrenoceptor stimulation is increased in SHAM and unmasked in HF aorta by PDE3 or PDE4 inhibition, but only by PDE3 inhibition in denuded aortas. We conclude that cAMP metabolism plays an important role in the endothelial regulation of vascular tone. Endothelial-derived NO, by increasing cGMP level in SMCs, limits the activity of PDE3 and contributes to maintaining a fine tuning between the activities of PDE3 and PDE4. This mechanism also determines the amplitude of the β -adrenoceptor vasorelaxant response. In HF, this modulation is lost due to endothelial dysfunction: thus, PDE3 activity in SMCs is increased which makes the contribution of PDE4 negligible and abolishes the relaxation mediated by β -adrenoceptor stimulation. Inhibition of vascular PDE3 may thus represent an attractive approach to restore a normal vasorelaxation in HF.

We used a rat model of cardiac chronic pressure overload which changes over time from cardiac hypertrophy to HF (Joubert *et al.*, 2008; Abi-Gerges *et al.*, 2009). This animal model mimics HF in patients with stenosis of the aortic valve (Muders and Elsner, 2000). To our knowledge, systemic blood pressure has never been reported in this rat model of HF. Here, we observed that HF rats exhibited a decrease in blood pressure, which might be correlated with the decompensated stage of HF. The aortas isolated at the HF stage exhibited clear

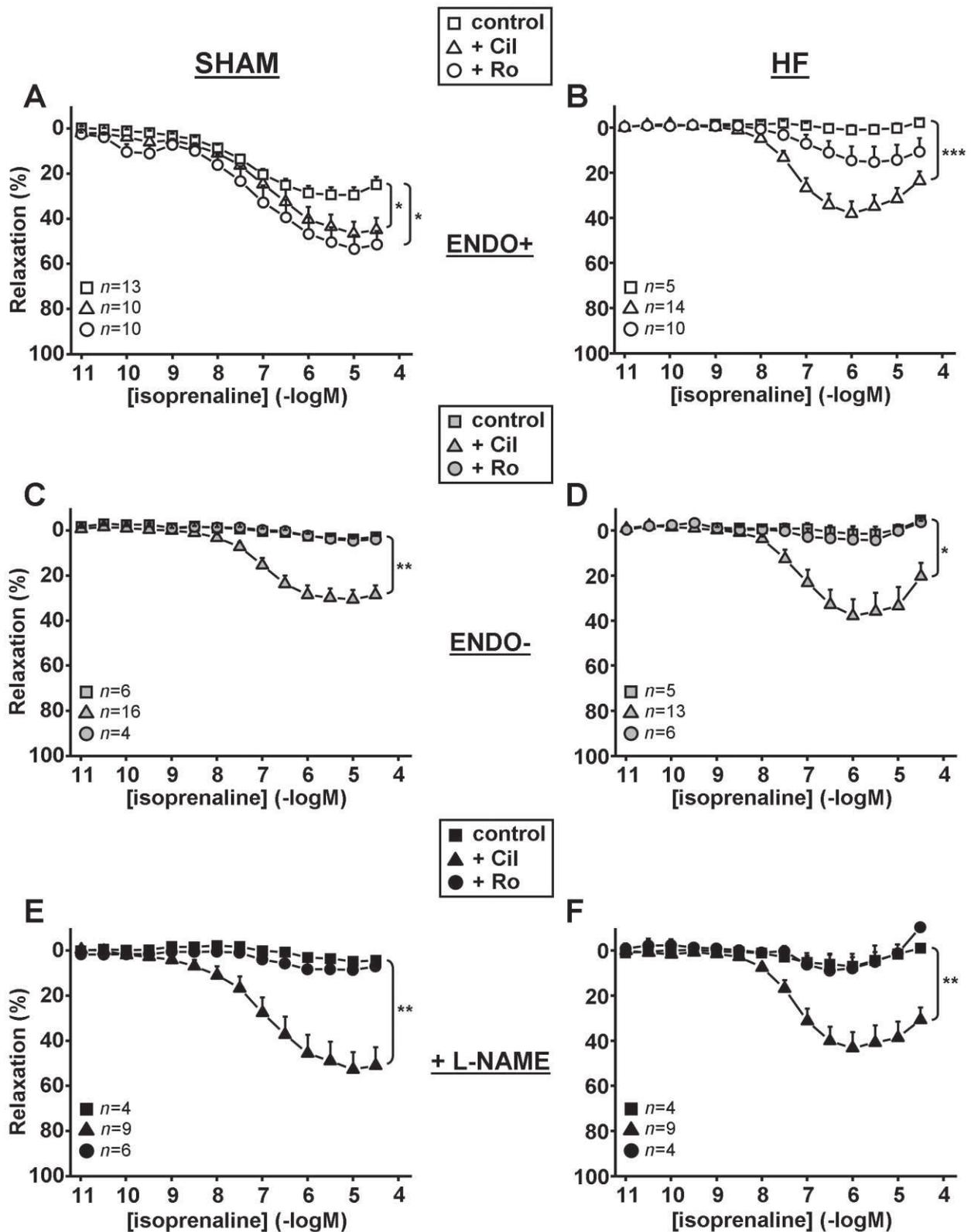


Figure 7

Effect of PDE3 or PDE4 inhibition on relaxant response to β -adrenoceptor stimulation in precontracted aorta isolated from SHAM and HF rats. CRCs to isoprenaline (0.01 nM to 30 μ M) were performed in endothelium-intact (A and B), in endothelium-denuded (C and D) or in L-NAME-pretreated (E and F) aortas isolated from SHAM (A, C, E) or HF (B, D, F) rats pretreated in the absence (control) or presence of the PDE3 inhibitor (1 μ M Cil), or the PDE4 inhibitor (10 μ M Ro). Data are means \pm SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, significant effect of PDE inhibitor.

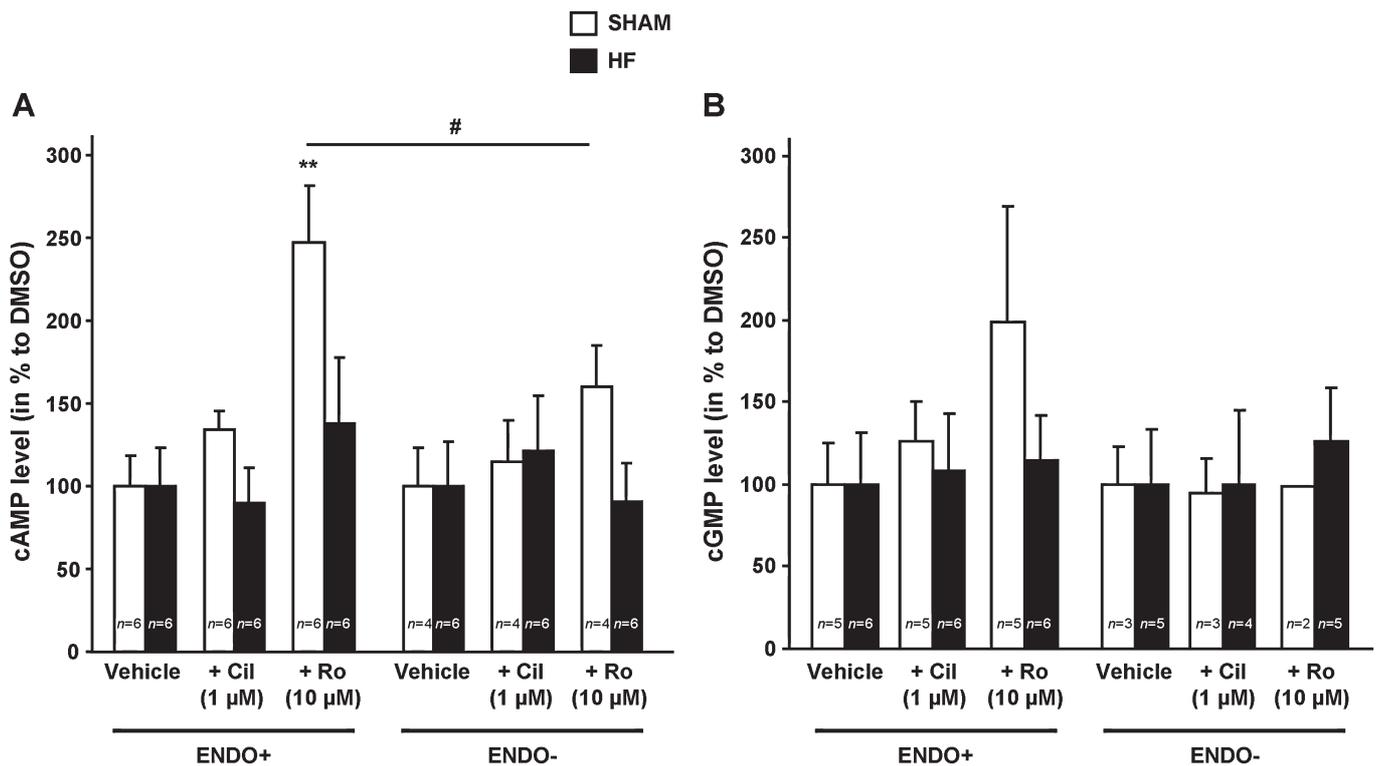


Figure 8

Effect of PDE3 or PDE4 inhibition on cAMP and cGMP levels in aorta isolated from SHAM and HF rats. Cyclic AMP (A) and cGMP (B) levels were determined in lysates of SHAM and HF endothelium-intact (ENDO+) or endothelium-denuded (ENDO-) rings pretreated in the absence (vehicle) or presence of the PDE3 inhibitor (1 μM Cil) or the PDE4 inhibitor (10 μM Ro). Results are expressed in % of mean cyclic nucleotide levels measured in the absence of inhibitors. Data are means ± SEM of *n* rings from different animals. ***P* < 0.01, significantly different from vehicle group. #*P* < 0.05, significant effect of endothelial removal.

signs of vascular dysfunction, with hyper-reactivity to contractile agents and endothelial dysfunction linked to an inhibition of the NOS/NO pathway. This is a characteristic of cardiovascular diseases, including HF (Francis and Cohn, 1990; Negrao *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001), although the mechanisms leading to this dysfunction are unclear and include neurohumoral activation, oxidative stress, haemodynamic alterations and vascular remodelling (Muders and Elsner, 2000; Indik *et al.*, 2001; McGoldrick *et al.*, 2007). By using an *in vitro* biochemical assay, we found that the rank order of cAMP-hydrolysing activity in rat aorta was PDE3 > PDE4 >> PDE1, whereas PDE2 activity was not detected. This pattern is in agreement with previous reports (Polson and Strada, 1996; Maurice *et al.*, 2003). Aortas isolated from HF rats exhibited a similar total cAMP-hydrolysing activity and PDE family contribution. Endothelium removal did not affect cAMP-PDE activities in SHAM aortas, suggesting either that the contribution of endothelium to the vascular PDE activity is minor compared with that of SMCs, or that the sensitivity of the assay is insufficient to detect this endothelial contribution. However, in HF aortas, PDE4 activity was decreased in the absence of endothelium. We also observed that the HF stage was associated with alterations of vascular PDE3 and PDE4 family expression, essentially an increase in PDE3A and PDE4B proteins. The apparent discrepancy between biochemical activity and protein expression

might be explained either by a too small increase in protein expression to be detectable in activity or by a local confinement of these new PDE proteins dedicated to one particular function. Takahashi *et al.* (2002) observed an increase in PDE3 activity without modification of PDE4 activity in the intact aorta from the Dahl salt-sensitive rat model of HF. Thus, alterations in vascular PDE activity might depend on the HF model used.

Both PDE3 and PDE4 were found to control the vascular tone in precontracted SHAM aorta but their contribution differed in several ways. PDE3 inhibition with cilostamide induced a relaxant effect which did not require a functional endothelium. However, this effect was potentiated by NOS inhibition or when the endothelium was removed. The most likely explanation for this is that NO released from intact endothelium elevates cGMP in SMCs and this leads to a partial inhibition of PDE3 which minimizes the effect of cilostamide. By contrast, the vasorelaxant effect elicited by PDE4 inhibition with Ro was abolished when the endothelium was removed (when PDE3 was uninhibited) and was increased in the presence of cilostamide (when PDE3 was inhibited). This suggests that, when fully active, PDE3 largely dominates over PDE4. A somewhat similar conclusion was reached by Komasa *et al.* (1991) in noradrenaline- and PGF_{2α}-precontracted arteries. Surprisingly, PDE3 inhibition was not associated with an increase in global intracellular level of

cAMP or cGMP, as found previously (Eckly and Lugnier, 1994), which supports the hypothesis that functional responses elicited by cyclic nucleotides require local rather than global changes in their concentration.

Another difference between the functional role of PDE3 and PDE4 was observed in HF. While the relaxant effect induced by PDE3 inhibition was similar in aortas from SHAM and HF rats, PDE4 inhibition did not relax aortas from HF rats. This loss of function for PDE4 in HF aortas was similar to that observed in endothelium-denuded SHAM aortas and was therefore likely due to the endothelial dysfunction in HF. Interestingly, PDE3 inhibition restored a significant relaxant response to PDE4 inhibition in both intact and endothelium-denuded HF aortas. This supports the hypothesis that PDE4 function is under the negative control of PDE3, and that in HF aortas PDE3 activity masks that of PDE4. This is not in contradiction with our finding that global PDE3 cAMP-hydrolytic activity was similar in SHAM and HF aortas, because the *in vitro* assay in lysates and controlled buffer solution cannot reveal a change in cellular PDE3 activity by a soluble factor such as cGMP. Alternatively, changes in PDE3 activity may occur in a subcellular compartment, for example, in the vicinity of PDE4, which would not be detectable in biochemical assays.

Several studies in systemic and/or pulmonary arteries isolated from different models of HF animals have reported a decrease in the β -adrenoceptor-mediated vasorelaxation (Mathew *et al.*, 1993; Nasa *et al.*, 1996; McGoldrick *et al.*, 2007). In our model of HF, we also observed a loss of aortic relaxation to β -adrenoceptor stimulation. This loss of response was likely a consequence of the endothelial dysfunction, because in SHAM aorta, the response to β -adrenoceptor stimulation was abolished when the endothelium was removed or upon NOS inhibition. A similar loss of the response to β -adrenoceptor stimulation in the absence of a functional endothelium was reported in earlier studies and this led the authors to conclude that the response involved β -adrenoceptors located on the endothelial cell surface (Kamata *et al.*, 1989; Gray and Marshall, 1992). However, our results contradict this conclusion. Indeed, we found that the relaxation to β -adrenoceptor stimulation was totally rescued in the absence of endothelium, both in SHAM and HF aortas, when PDE3 was inhibited. Therefore, we propose a different mechanism by which NO released from the endothelium leads to SMC PDE3 inhibition by cGMP, and this acts as a brake on cAMP degradation to allow SMC β -adrenoceptor/cAMP pathway to convey relaxation. In HF, because of endothelial dysfunction, the brake is released and PDE3 becomes fully active and serves as a sink for cAMP to prevent it from activating relaxation. Thus, only a pharmacological inhibition of PDE3 can restore the vasorelaxation mediated by β -adrenoceptor stimulation, as also observed in another pathological situation, the restenosis after balloon angioplasty (Zhao *et al.*, 2007).

In conclusion, our study underlines a key role of the vascular endothelium on smooth muscle PDEs and contractile function. Endothelial dysfunction in HF exacerbates smooth muscle PDE3 activity and this prevents relaxation to β -adrenoceptor stimulation. Inhibition of vascular PDE3 may thus represent an attractive therapeutic approach to restore a normal vasorelaxation in HF. A limitation of our study is that

the aorta is a conductance artery which is not critically involved in the regulation of blood pressure. Thus, further studies would be required to assess the role of PDEs in contractile function in resistance arteries from HF models. However, our study clearly shows that, in HF, endothelial dysfunction leads to an altered function of PDEs in the smooth muscle. This phenomenon could be a common feature of cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction.

Acknowledgements

We thank the animal core facility (IPSIT, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France) for efficient animal care, Patrick Lechêne and Florence Lefebvre for technical assistance, and Dr Grégoire Vandecasteele for helpful discussions. We are thankful to Dr Chen Yan (Columbia University, NY, USA), Dr Emilio Hirsch (University of Torino, Italy) and Dr Marco Conti (University of California, San Francisco, CA, USA) for kindly providing PDE3A, PDE3B and PDE4B antibodies respectively.

This work was supported by the Fondation Leducq for the Transatlantic Network of Excellence cAMP grant 06CVD02 (to R. F.), the University Paris-Sud (Bonus Attractivité Paris-Sud 2009–2012 to F. H. and V. L.), the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (PhD fellowship to M. B.-O.) and the Région Ile de France (SETCI to Z. K.).

Author contributions

F. H., M. B.-O., B. M., P. M., F. J., R. F. and V. L. conceived and designed the experiments. F. H., M. B.-O., B. M., Z. K., V. D.-D. and P. M. performed the experiments. F. H., M. B.-O., B. M., P. M. and V. L. analysed the data. F. H., M. B.-O., R. F. and V. L. wrote the paper.

Conflict of interest

None declared.

References

- Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Matéo P, Varin A, Heymes C *et al.* (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on β -adrenergic cAMP signals. *Circ Res* 105: 784–792.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G Protein-Coupled Receptors. *Br J Pharmacol* 170: 1459–1581.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Enzymes. *Br J Pharmacol* 170: 1797–1867.

- Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W *et al.* (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47: 1081–1092.
- 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.
- Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA *et al.* (2005). Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 111: 2469–2476.
- Eckly AE, 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, Lugnier C (1994). Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 271: 237–240.
- Eckly-Michel A, Martin V, Lugnier C (1997). Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *Br J Pharmacol* 122: 158–164.
- Flacco N, Segura V, Perez-Aso M, Estrada S, Seller J, Jimenez-Altayo F *et al.* (2013). Different beta-adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *Br J Pharmacol* 169: 413–425.
- Francis GS, Cohn JN (1990). Heart failure: mechanisms of cardiac and vascular dysfunction and the rationale for pharmacologic intervention. *FASEB J* 4: 3068–3075.
- 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.
- 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.
- Indik JH, Goldman S, Gaballa MA (2001). Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1767–H1770.
- Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R *et al.* (2008). Local energetic regulation of sarcolemmal and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 586: 5181–5192.
- Kaiser L, Spickard RC, Olivier NB (1989). Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *Am J Physiol* 256: H962–H967.
- Kamata K, Miyata N, 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: 890–894.
- 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.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). NC3Rs reporting guidelines working group. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Kiuchi K, Sato N, Shannon RP, Vatner DE, Morgan K, Vatner SF (1993). Depressed beta-adrenergic receptor-mediated and endothelium-mediated vasodilation in conscious dogs with heart failure. *Circ Res* 73: 1013–1023.
- Komas 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.
- Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, Banquet S *et al.* (2008). β -adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent β_2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 77: 202–210.
- Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD *et al.* (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123: 23–35.
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003). What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93: 896–906.
- Lugnier C, Komas N (1993). Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J* 14 (Suppl. I): 141–148.
- 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: 1722–1728.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR *et al.* (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64: 533–546.
- 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: 473–478.
- McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573–1576.
- Mokni W, Keravis T, Etienne-Selloum N, Walter A, Kane MO, Schini-Kerth VB *et al.* (2010). Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *PLoS ONE* 5: e14227.
- Muders F, Elsner D (2000). Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* 41: 605–612.
- Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Saitoh S, Kon H, 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.
- Nasa Y, Toyoshima H, Ohaku H, Hashizume Y, Sanbe A, Takeo S (1996). Impairment of cGMP- and cAMP-mediated vasorelaxations in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol* 271: H2228–H2237.
- Negro CE, Hamilton MA, Fonarow GC, Hage A, Moriguchi JD, 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–H174.
- Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP *et al.*; NC-IUPHAR (2014). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledge base of drug targets and their ligands. *Nucl. Acids Res.* 42 (Database Issue): D1098–1106
- Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Bito V, Van den Bergh A, Lenaerts I, Busch C *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.

Polson JB, Strada SJ (1996). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 403–427.

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: 63–77.

Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, Kimura 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.

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: 249–256.

Thompson WJ, Appleman MM (1971). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* 10: 311–316.

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: 973–979.

Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, 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.

Zhao H, Quilley J, Montrose DC, Rajagopalan S, Guan Q, 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–H2981.

Zhao H, Guan Q, Smith CJ, Quilley J (2008). Increased phosphodiesterase 3A/4B expression after angioplasty and the effect on VASP phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 590: 29–35.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

<http://dx.doi.org/10.1111/bph.12853>

Appendix S1 Supplementary methods.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Alteration of vascular reactivity in heart failure:

Role of phosphodiesterases type 3 and 4

Short running title: Vascular reactivity and cAMP-PDE in heart failure

Authors: F Hubert^{1,2,*}, M Belacel-Ouari^{1,2}, B Manoury^{1,2}, K Zhai^{1,2,*}, V Domergue-Dupont^{2,3}, P Mateo^{1,2}, F Joubert^{1,2}, R Fischmeister^{1,2}, V Leblais^{1,2}.

¹*Inserm UMR-S 769, LabEx LERMIT, DHU TORINO, F-92296 Châtenay-Malabry, France,*

²*Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, F-92296 Châtenay-Malabry, France, and*

³*IPSIT/IFR141, Plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle », F-92296 Châtenay-Malabry, France.*

* *Current address for:* F H, Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, Canada; and K Z, National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China.

Correspondence to: V Leblais, UMR-S 769, LabEx LERMIT, DHU TORINO, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J.-B. Clément 92296 Châtenay-Malabry, France.

E-mail: veronique.leblais@u-psud.fr; Tel: +33-1.46.83.59.06; Fax: +33-1.46.83.54.75.

SUPPLEMENTARY METHODS

All experiments performed conform to the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (no. D- 92-283, December 13, 2012). All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010).

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, under anaesthesia with pentobarbital sodium (200 mg.kg⁻¹, i.p.). The depth of anaesthesia was checked by toe pinch. Aortic stenosis was induced by placing a stainless steel hemoclip (0.6 mm-internal diameter) on the ascending aorta via thoracic incision, as previously described (Joubert *et al.*, 2008). Age-matched control animals underwent the same procedure without placement of the clip.

Echocardiography and blood pressure measurement

Echocardiography was performed at 22 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. Left ventricular mass (LVM) was

calculated according to the Penn formula home-adapted for the rat heart: ($LVM = 1.04 \times [(Dtd + SIV + PP)^3 - (Dtd)^3]$) (Prunier *et al.*, 2002).

Arterial blood pressure was measured in 9 SHAM-operated and 6 stenosed conscious rats using a tail-cuff system (CODA™, Kent Scientific) in a dark temperature-controlled room (22°C). Animals were trained for 3 days. They were placed in individual holders. An occlusion cuff and a volume pressure-recording cuff were applied close to the base of the tail. Each day, 20 sequential readings were obtained and the last 10 readings were averaged. Volume pressure recording allowed the non-invasive measurement of 3 blood pressure parameters simultaneously: systolic, diastolic and mean blood pressures.

Rat aorta sampling

Twenty-two weeks after surgery, rats were anesthetized with pentobarbital sodium (200 mg.kg⁻¹, i.p.). The descending thoracic aorta was isolated, placed in ice-cold physiological salt solution [PSS in mM: NaCl 119, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.17, KH₂PO₄ 1.18, glucose 11, NaHCO₃ 25], cleaned of adventitial tissue and cut into 2 mm length rings. In some preparations, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with fine forceps. Heart, lungs and liver were also removed and weighed. The right tibia was isolated to measure its length using a vernier calliper. For biochemical studies, aortic rings were frozen in liquid nitrogen.

Cyclic AMP-PDE activity assay

Cyclic AMP-PDE activity was measured according to the method described by Thompson and Appleman (1971), as previously reported (Zhai *et al.*, 2012). Frozen aortic rings were homogenized using a tissue homogenizer (Precellys®24, Bertin Technologies) in ice-cold lysis buffer [NaCl 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, glycerol 10%, NP40 0.5% and

microcystin 1 μM]. Samples (4 μg proteins) were assayed in a reaction mixture of 200 μL containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 5 mM β -mercaptoethanol, 1 μM cAMP, and 10^5 cpm of [^3H]-cAMP for 25 min at 33°C. To evaluate cAMP-PDE family-specific activities, the assay was performed in the absence or presence of selective PDE inhibitors: 10 μM 8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthine (MIMX) for PDE1 (Rich *et al.*, 2001), 100 nM BAY-60-7550 (BAY) for PDE2 (Boess *et al.*, 2004), 1 μM Cilostamide (Cil) for PDE3 (Sudo *et al.*, 2000), 10 μM Ro-20-1724 (Ro) for PDE4 or 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) as a non-selective PDE inhibitor (Rich *et al.*, 2001). 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: 0.02% dimethyl sulfoxide (DMSO)].

Western blot analysis

Frozen aortic rings were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) using the tissue homogenizer and centrifuged at 3,000 g and 4°C for 5 min. Supernatants were heated at 95°C for 5 min in the presence of Laemmli buffer and β -mercaptoethanol. Proteins were resolved by electrophoresis on a 8% SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane (Millipore). The membranes were blocked for 1 h with Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST) containing 5% skim milk at room temperature and then were incubated overnight at 4°C with antibodies directed against PDEs [PDE3A (1:10000; gift from Dr. Chen Yan, Columbia University, NY, USA), PDE3B (1:1000; gift from Dr. Emilio Hirsch, University of Torino, Italy), PDE4B (1:10000; gift from Dr. Marco Conti, University of California, San Francisco, USA)] or 2 hours at room temperature with antibody directed against β -actin (1:20000; sc-47778, Santa

Cruz Biotechnology). After washing and 1 hour incubation at room temperature with the goat anti-rabbit IgG-HRP (1:10000; sc-2004, Santa Cruz Biotechnology), final detection was performed using chemiluminescence (Pierce ECL Western blotting substrate, Thermo Scientific). PDE signal was normalized to β -actin signal.

Quantitative RT-PCR analysis

Frozen aortic rings were homogenized in ice-cold TRIZOL Reagent (Gibco). Then, total RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR were performed according to the procedure previously described (Zhai *et al.*, 2012). mRNAs encoding 4 PDE subtypes (PDE3A, PDE3B, PDE4B and PDE4D) and 2 housekeeping genes (TBP: Tata Box Binding Protein, and Ywhaz: 14-3-3 protein zeta/delta) were analyzed. PDE gene expression level was calculated using the comparative threshold (Ct) method ($2^{\Delta Ct}$).

Vascular reactivity measurement

Aorta rings were mounted in standard organ bath chambers filled with PSS maintained at 37°C and aerated with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4). Vessels were passively stretched to their optimal resting force (2 g) and equilibrated for 60 min. 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 μ M) 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. Rings were then equilibrated for 60 min in PSS.

In a first set of experiments, concentration-response curves (CRCs) to increasing concentrations of the vasoconstrictor agent prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α} ; 1 nM to 30 μ M) were

obtained in arteries pretreated in the absence or presence of a selective PDE inhibitor (1 μ M Cil for PDE3 or 10 μ M Ro for PDE4) for 10 min.

In a second set of experiments, aortic rings were submaximally precontracted with a concentration of $\text{PGF}_{2\alpha}$ inducing about 80% of their own contractile response to the 60 mM KCl depolarizing solution. The mean $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentrations used in the different groups of aortas are 2.9 ± 0.1 μ M (n=37) and 2.0 ± 0.0 μ M (n=26) in intact aortas isolated from SHAM and HF rats, respectively, and 1.5 ± 0.3 μ M (n=19) and 1.2 ± 0.2 μ M (n=20) in endothelium-denuded aortas isolated from SHAM and HF rats, respectively. When the contractile response was stable, CRCs to increasing concentrations of a vasorelaxant drug were established with the muscarinic agonist carbachol (1 nM to 10 μ M), the selective PDE inhibitors [Cil (1 nM to 30 μ M) or Ro (1 nM to 30 μ M)] or the β -adrenoceptor agonist isoprenaline (10 pM to 30 μ M) in the presence of the α -adrenoceptor antagonist (10 μ M phentolamine) to avoid possible influence of α -adrenoceptors (Leblais *et al.*, 2008). In some cases, these experiments were performed in arteries pretreated in the presence of the following agents: the PDE3 inhibitor Cil (1 μ M for 10 min), the PDE4 inhibitor Ro (10 μ M for 10 min) or the NOS inhibitor N ω -nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME; 300 μ M for 15 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 nucleotide measurements

Rat aortic rings were equilibrated in PSS at 37°C for 1 hour. Since an effective removal of endothelium could not be functionally tested, the NOS inhibitor L-NAME (300 μ M) was added to endothelium-denuded rings. Rings were incubated for 30 min with the selective PDE inhibitors (1 μ M Cil for PDE3 or 10 μ M Ro for PDE4) or the vehicle (0.03% DMSO). As

positive controls, some rings were incubated with the hydrophylic forskolin analog L-858051 (10 μ M for 15 min) or sodium nitroprusside (SNP; 1 μ M for 10 min) in the presence of 100 μ M IBMX. Rings were rapidly collected in the lysis buffer (0.1 M HCl and 1% Triton X-100) and frozen in liquid nitrogen. Each ring was homogenized using the tissue homogenizer and the homogenate centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. Cyclic AMP and cGMP content were determined on the supernatant by an enzyme immunoassay (monoclonal anti-cAMP and anti-cGMP EIA kits, NewEast Biosciences). Absorbance was read at 450 nm on a spectrophotometer (Infinite[®] 200 PRO, TECAN). Results are expressed in pmole of cAMP or cGMP per ring.

Data and statistical analysis

EC₅₀ value (concentration that produces 50% of the maximum response) was estimated, when relevant, in each individual CRC using the Boltzman equation fit (Origin 6 software) and converted to negative logarithm value. All data are expressed as mean \pm SEM, where “n” represents the number of rats, except for Figure 3 where “n” represents the number of vessels. Differences between CRCs 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 for statistical significance.

References

- Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W *et al.* (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47: 1081-1092.
- Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R *et al.* (2008). Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 586: 5181-5192.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. *Br J Pharmacol* 160: 1577-1579.

Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, Banquet S *et al.* (2008). β -adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent β_2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 77: 202-210.

McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573-1576.

Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel JB, Mercadier JJ, Escoubet B (2002). Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H346-H352.

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: 63-77.

Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, Kimura 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.

Thompson WJ, Appleman MM (1971). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* 10: 311-316.

Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, 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.

C. Conclusion

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- ✓ 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.
- ✓ Cet état pathologique est associé à une altération de la réactivité de l'aorte de rat avec une hyperréactivité aux agents contractants et une dysfonction endothéliale.
- ✓ La PDE3 et la PDE4 sont les principales familles de PDEs hydrolysant l'AMPC dans l'aorte de rat SHAM et IC et leur expression est altérée dans l'IC, avec notamment une augmentation de l'expression de la forme courte de la PDE3A et une augmentation de l'expression de la PDE4B.
- ✓ L'inhibition pharmacologique de la PDE3 provoque une vasorelaxation sur l'aorte intacte pré-contractée de rats SHAM et IC. Cet effet est potentialisé lorsque les anneaux aortiques sont dépourvus de leur endothélium ou lors de l'inhibition pharmacologiques de la NOS. L'inhibition de la PDE4, quant à elle, induit une augmentation de la concentration d'AMPC et une relaxation de l'aorte des rats SHAM. En revanche ces effets ne sont pas observés en l'absence d'endothélium, lorsque la NOS est inhibée et sur les aortes de rats IC. Néanmoins, un effet important de l'inhibiteur de la PDE4, le Ro, est révélé dans les aortes de rat SHAM dépourvues de leur endothélium et dans les aortes de rats IC lorsque la PDE3 est également inhibée.
- ✓ Une stimulation des récepteurs β -ARs induit une vasorelaxation dépendante de l'endothélium et de la NOS dans l'aorte de rat SHAM mais n'a pas d'effet sur l'aorte de rats IC. Cette vasorelaxation médiée par les récepteurs β -ARs est augmentée dans l'aorte de rat SHAM suite à l'inhibition de la PDE3 et de la PDE4. Seule l'inhibition de la PDE3 permet de démasquer la réponse relaxante β -adrénergique dans l'aorte de rat SHAM dépourvue d'endothélium, et dans l'aorte de rat IC.

En conclusion, grâce à ces travaux, nous avons pu montrer que dans l'IC, la dysfonction endothéliale exacerbe l'activité de la PDE3 du muscle lisse aortiques, masquant ainsi la fonction de la PDE4 et empêchant la relaxation médiée par les récepteurs β -ARs. L'inhibition pharmacologique de la PDE3 restaure la fonction de la PDE4 et rétablit une relaxation β -adrénergique dans ces aortes pathologiques. Cette étude souligne le rôle clé de l'endothélium dans le contrôle de la fonction des PDEs musculaires et du tonus contractile vasculaire.

L'inhibition des PDE3 vasculaires pourrait ainsi représenter une approche thérapeutique séduisante pour restaurer une vasorelaxation normale dans l'IC.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse est centré sur l'étude de la voie de signalisation β -AR/AMPC/PDEs dans les CMLVs, et plus particulièrement sur la contribution différentielle des sous-types de récepteurs β -ARs dans la production de l'AMPC et sur le rôle des principales familles de PDEs vasculaires, la PDE3 et la PDE4, dans l'organisation de cette signalisation intracellulaire.

Nous avons notamment évalué l'impact de l'environnement cellulaire sur cette voie de signalisation, ainsi que les altérations potentielles de cette voie de signalisation en situation pathologique d'IC. L'originalité de mon travail repose sur l'utilisation de deux modèles expérimentaux complémentaires : (1) un modèle cellulaire, des CMLs isolées à partir d'aorte de rat sain, adoptant un phénotype synthétique en culture, à partir duquel nous avons évalué, à l'échelle cellulaire, l'influence de la densité cellulaire sur cette voie de signalisation β -AR/AMPC/PDEs ; et (2) un modèle intégré, l'aorte de rat isolée intacte, qui nous a permis d'évaluer le rôle de cette voie AMPC/PDEs dans la régulation de la fonction contractile artérielle, et sa modulation par l'endothélium et en situation pathologique d'IC.

Influence de la densité cellulaire sur la voie de signalisation de l'AMPC dans les CMLVs

Dans la première partie de ma thèse, nous avons étudié la voie de signalisation β -AR/AMPC/PDEs, dans un modèle de CMLs isolées d'aorte de rat et mises en culture. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude de l'influence de la densité d'ensemencement de ces cellules sur cette voie de signalisation. Les résultats principaux de cette étude montrent que dans les CMLVs ensemencées à haute densité, correspondant à des cellules confluentes, la production d'AMPC en réponse à la stimulation β -adrénergique implique les deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques, et que la PDE4 constitue la famille de PDEs contrôlant majoritairement cette réponse. Dans les CMLVs ensemencées à faible densité, correspondant à des cellules isolées, seul le récepteur β_2 -adrénergique est exprimé à la membrane, et la réponse AMPC β -adrénergique est contrôlée par la PDE4 et à un moindre degré par la PDE3.

✓ Caractérisation du phénotype des CMLVs cultivées à faible et à haute densité

Dans un premier temps, nous avons vérifié que notre modèle cellulaire était pur et que les cellules isolées de l'aorte de rat correspondaient aux CMLs. Nous avons ainsi réalisé un immuno-marquage de 3 protéines dont l'expression est spécifique du muscle lisse vasculaire

: la SM- α -actine, la calponine, et la protéine 22 du muscle lisse (SM-22 ou transgeline) (Owens et al. 2004, Rensen et al. 2007). Ce marquage nous a permis de constater que toutes les cellules observées au microscope étaient marquées, confirmant ainsi la pureté de notre isolement cellulaire

Dans la media des vaisseaux sanguins sains et mûres, les CMLs présentent une capacité de prolifération et une activité de synthèse protéique très faibles. Aussi, elles expriment un répertoire unique de protéines contractiles telles que la SM- α -actine, la calponine, la SM-MHC, et la SM-22 (Owens et al. 2004, Rensen et al. 2007). Ces CMLs présentant un phénotype contractile ont pour fonction principale la régulation du tonus vasculaire. Néanmoins, ces cellules conservent un degré de plasticité qui leur permet de moduler leur phénotype contractile vers un phénotype synthétique lors de la mise en culture (Thyberg et al. 1990) ou de lésions vasculaires (Owens et al. 2004). Les cellules synthétiques présentent alors une forte capacité migratoire et proliférative, une diminution de l'expression des protéines constituant l'appareil contractile et une augmentation de la synthèse protéique, notamment la synthèse des composants de la MEC.

Dans nos expériences, les CMLVs sont cultivées sur une couche fine de collagène monomérique, en présence de 10% de FBS, et sont utilisées entre les passages 2 et 6. Dans ces conditions expérimentales, les CMLVs adoptent un phénotype synthétique prolifératif (Ichii et al. 2001, Vallot et al. 2000). La matrice extracellulaire, et notamment le collagène, joue un rôle important dans le développement de cet état prolifératif, comme en témoigne l'inhibition de la prolifération de CMLs aortiques humaines de nouveaux-nés mises en culture sur du collagène fibrillaire (Koyama et al. 1996). Différentes études ont évalué la capacité des CMLVs en culture à subir une réversion phénotypique, c'est-à-dire leur capacité à acquérir de nouveau un phénotype contractile. Il faut noter que ces études ont été réalisées sur des cultures primaires de CMLVs, maintenues en culture sur plusieurs jours. Ainsi, il a été montré sur des CMLs d'aorte de porc qu'un état de confluence élevé, obtenu après 13 jours de culture, est associé à une réversion phénotypique évaluée par observation microscopique des cellules et marquage de la SM-actine (Chamley-Campbell and Campbell 1981). Dans des CMLs d'aorte de lapin cultivées jusqu'à l'état de confluence, une réduction de la production de collagène essentiellement due à une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour le collagène de type 1 sans modification de l'expression du collagène de type 3 est observée ce qui témoigne d'une capacité synthétique réduite et de l'acquisition d'un phénotype plus « contractile » (Ang et al. 1990). L'équipe de Vallot a montré sur des CMLVs d'aorte de rat

que l'atteinte d'un état de confluence élevé est associé à l'acquisition à nouveau de certaines caractéristiques d'un phénotype contractile, avec la réapparition de l'expression de marqueurs de la signalisation calcique, le récepteur de la ryanodine et la pompe SERCA, dont l'expression était abolie lors de leur prolifération (Vallot et al. 2000). Cependant, ces modifications phénotypiques restent partielles puisque l'expression de l'isoforme 2 de la MHC n'est pas restaurée dans cette situation (Vallot et al. 2000).

D'une manière intéressante, ces modifications phénotypiques sont dépendantes de la densité initiale d'ensemencement des cellules. Ainsi, un ensemencement à très forte densité ne permet pas la dédifférenciation des CMLVs vers un phénotype synthétique, alors qu'un ensemencement à une densité très faible au départ, assure le passage des cellules au phénotype synthétique, mais non réversible dans le temps (Chamley-Campbell and Campbell 1981, Vallot et al. 2000).

Dans ce contexte, nous avons caractérisé le phénotype de nos deux conditions de culture cellulaires, et évalué l'expression de l'ARNm codant pour différents marqueurs du phénotype contractile (la SM22 et la SM-MHC) et du phénotype synthétique (le collagène de type 1 et de type 3 et la NM-MHC). Parmi ces marqueurs phénotypiques, seule l'expression de l'ARNm codant pour le collagène de type 1 est modifiée, avec une diminution dans les cellules ensemencées à haute densité. Cette diminution d'expression du collagène de type 1, sans modification de l'expression du collagène de type 3, a également été observée par Ang et coll. dans les CMLs d'aorte de lapin ensemencées à une densité de $3,8 \cdot 10^4$ cellules/cm² (similaire à notre condition de haute densité $3 \cdot 10^4$ cellules/cm²) et cultivées pendant plus de 10 jours (Ang et al. 1990).

Néanmoins, nous n'avons pas observé de modification de l'expression de l'ARNm codant pour la NM-MHC, autre marqueur caractéristique du phénotype synthétique (Vallot et al. 2000). Ceci suggère que nos CMLVs ensemencées à haute densité ont subi une réversion phénotypique partielle. Cette absence de réversion complète pourrait s'expliquer par le fait que nos cellules soient utilisées après plusieurs passages, au contraire des études citées précédemment et notamment de l'étude de Vallot et coll. réalisée sur des cultures primaires (Vallot et al. 2000), mais également par la durée plus courte de culture, à savoir 2 jours dans nos conditions expérimentales, qui pourrait être insuffisante pour réverser l'expression de la NM-MHC. Il serait intéressant de compléter la caractérisation phénotypique de nos deux états de densité de CMLVs par la caractérisation de leur capacité proliférative, par exemple par la détection de deux marqueurs de prolifération, le *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA)

(Vallot et al. 2000) ou le Ki67 (Cai et al. 2015), par immunomarquage ou western-blot. Ces données nous permettraient ainsi de vérifier l'effet de la confluence sur la prolifération des CMLVs et ainsi de quantifier la capacité proliférative des cellules à haute densité.

✓ **Etude de la production d'AMPC basal et en réponse à une stimulation β -adrénergique dans les CMLVs cultivées à faible et à haute densité.**

Nous avons évalué la synthèse de l'AMPC basal dans les deux conditions de culture cellulaire par la technique ELISA et avons montré que la concentration de ce second messager était de $1,54 \cdot 10^{-2}$ pmol / μ g protéines dans les cellulesensemencées à faible densité et de $1,07 \cdot 10^{-2}$ pmol / μ g protéines dans les cellulesensemencées à haute densité (valeurs brutes non présentées). Ces concentrations sont 10 fois plus faibles que celles décrites dans la littérature pour les CMLs d'aorte de rat en culture (Mader 1992, Crass Iii et al. 1992). Cependant, cette différence peut s'expliquer par la souche de rat utilisée (rats Fisher 344 dans ces deux études *versus* rats Wistar dans notre étude), ou tout simplement par les conditions de culture. Néanmoins, nos résultats montrent que les cellulesensemencées à haute densité présentent une diminution de 30% de la concentration d'AMPC basal comparé aux cellulesensemencées à faible densité, qui pourrait s'expliquer soit par une activité basale des adénylates cyclases plus faible, soit par une activité hydrolytique des PDEs-AMPC plus élevée. Nos expériences de FRET montrant que l'application maintenue d'un activateur direct de l'adénylate cyclase, le L-858051, entraîne une production d'AMPC similaire dans les deux groupes de cellules, suggèrent que l'activité des adénylates cyclases est similaire entre les deux groupes de cellules. Ces données mériteraient d'être complétées par un dosage direct de l'activité basale de l'adénylate cyclase. Par contre, nous avons montré que l'activité hydrolytique totale des PDEs-AMPC était augmentée dans les cellulesensemencées à haute densité, ce qui est cohérent avec la diminution des concentrations basales d'AMPC dans ces cellules. Un autre paramètre qui pourrait influencer les concentrations basales d'AMPC serait une modification de l'expression des transporteurs d'efflux de l'AMPC, et notamment de MRP-4 ou MRP-5. En effet, l'expression de ces transporteurs est augmentée dans les CMLVs prolifératives (Sassi et al. 2008), mais l'influence de la densité cellulaire sur leur activité n'est pas connue.

Par la suite, nous avons évalué la capacité de production d'AMPC en réponse à la stimulation des récepteurs β -ARs par une application brève de 15 secondes d'isoprénaline, un agoniste non sélectif des récepteurs β -ARs (Hoffmann et al. 2004), à l'aide de la technique

d'imagerie de FRET nous permettant de visualiser en temps réel les variations d'[AMPc]_i. D'une manière intéressante, la production d'AMPc en réponse à la stimulation β -adrénergique est plus élevée dans les cellulesensemencées à haute densité par rapport aux cellulesensemencées à faible densité, et ceci indépendamment de la concentration d'isoprénaline utilisée (10 ou 100 nM). Cette différence d'amplitude des signaux AMPc mesurés entre les deux groupes de cellules pourrait être due à une saturation de la sonde dans les cellulesensemencées à faible densité présentant un niveau basal d'AMPc basal plus élevé que celui des cellules à haute densité. Néanmoins, nous avons montré qu'en conditions saturantes (par application maintenue d'une concentration élevée de L-858051, 100 μ M, suivie de l'application d'une concentration élevée d'un inhibiteur non sélectif des PDEs, l'IBMX à 100 μ M), le signal FRET-AMPc était similaire dans les deux conditions cellulaires, avec une augmentation du ratio CFP/YFP de 31% *versus* 34% pour les cellulesensemencées à faible densité et à haute densité, respectivement. Ceci confirme donc que la différence des signaux AMPc observés en réponse à l'isoprénaline dans les cellulesensemencées à faible et à haute densité n'est pas due à une saturation de la sonde FRET, ni à une altération de l'activité des adénylates cyclases, mais suggère plutôt une altération de cette cascade de signalisation à l'échelle des récepteurs β -ARs.

✓ **Implication des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans les signaux AMPc dans les CMLVsensemencées à faible et à haute densité**

Nous avons alors comparé la contribution fonctionnelle des deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la réponse à l'isoprénaline des CMLVsensemencées à faible et à haute densité, à l'aide d'antagonistes sélectifs de ces deux sous-types de récepteurs. L'antagoniste du récepteur β_1 -AR (le CGP) et l'antagoniste du récepteur β_2 -AR (l'ICI) ont été appliqués à des concentrations respectives de 100 nM et 5 nM, concentrations précédemment montrées comme étant sélectives de ces récepteurs (Zhai et al. 2012, Hoffmann et al. 2004). Nos données montrent que les deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs contribuent à la réponse à l'isoprénaline mesurée dans les cellulesensemencées à haute densité, avec une prédominance du récepteur β_2 -AR au vu des pourcentages d'inhibition de la réponse induits par ces deux antagonistes. En revanche, seul le sous-type de récepteur β_2 -AR semble impliqué dans la réponse FRET à l'isoprénaline dans les CMLVsensemencées à faible densité. Dans cette étude, nous n'avons pas étudié l'implication du sous-type β_3 -adrénergique, car son

expression vasculaire a été essentiellement décrite dans les cellules endothéliales (Trochu et al. 1999, Dessy et al. 2005).

Par la suite, nous avons recherché le(s) mécanisme(s) responsable(s) de cette contribution différentielle des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la production de l'AMPC selon la densité cellulaire. La première hypothèse que nous avons posée reposait sur l'observation que la PDE3 prolongeait la réponse à l'isoprénaline uniquement dans les cellulesensemencées à faible densité. Aussi, la PDE3, localisée à proximité immédiate du récepteur β_1 -AR, aurait pu contribuer à la dégradation rapide de l'AMPC produit lors de la stimulation de celui-ci, masquant ainsi la réponse β_1 -AR dans les cellulesensemencées à faible densité. Cependant, l'inhibition préalable de la PDE3 n'a pas permis de révéler l'implication du récepteur β_1 -AR dans la production de l'AMPC stimulée par l'isoprénaline dans les cellulesensemencées à faible densité, suggérant donc que la PDE3 n'est pas impliquée dans l'absence de réponse β_1 -adrénergique dans ces cellules (Résultats non présentés).

Notre deuxième hypothèse reposait sur une contribution des cavéoles, invaginations membranaires formant des microdomaines au sein des rafts lipidiques enrichis en cavéoline, dans la signalisation des récepteurs β -ARs. En effet, le rôle des cavéoles dans la formation de plateformes de signalisation est clairement admis, notamment dans les cardiomyocytes, où il est reconnu que la signalisation du récepteur β_2 -AR implique les structures cavéolaires, alors que celle du récepteur β_1 -AR est plus diffuse (Rybin et al. 2000, Steinberg 2004). Dans les CMLVs, l'existence d'une telle compartimentation membranaire des récepteurs β_1 - et β_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 utilisées entre 5 et 12 passages, le sous-type β_1 est principalement exprimé dans les fractions membranaires non-cavéolaires, et le sous-type β_2 uniquement détecté dans ces fractions non-cavéolaires (Ostrom et al. 2002). Afin d'évaluer le rôle fonctionnel des cavéoles dans notre modèle d'étude, nous avons réalisé des expériences de FRET sur des CMLVs à haute densité traitées à la M β CD, un agent qui extrait le cholestérol des membranes cellulaires (Christian et al. 1997), conduisant ainsi à la disparition des cavéoles au niveau de la membrane plasmique. Nous avons observé par un marquage à la filipin III, que le traitement à la M β CD conduit à une diminution de plus de 50 % du contenu cellulaire en cholestérol. Ce marquage est souvent utilisé dans la littérature comme témoin de l'efficacité de la déplétion en cholestérol, mais sans données illustrées de cette quantification (Sampson et al. 2004). L'efficacité de notre traitement à la M β CD mériterait d'être confirmée en microscopie

électronique permettant de visualiser les invaginations cavéolaires (Rodrigues et al. 2010). Il a été ainsi observé qu'un tel traitement à la M β CD (concentration et durée de traitement identiques à nos conditions expérimentales) provoque une déstructuration de plus de 50% des cavéoles du muscle lisse de l'aorte de rat responsable d'une abolition du phénomène de désensibilisation du récepteur à l'angiotensine II (Linder et al. 2007). Néanmoins, nous n'avons pas observé de modification de la réponse à l'isoprénaline dans les CMLVs traitées à la M β CD par rapport aux cellules contrôles. Ainsi, nos résultats suggèrent que les récepteurs β -ARs ne sont pas localisés dans les structures membranaires enrichies en cholestérol, résultats en accord avec les conclusions des travaux d'Ostrom décrites ci-dessus (Ostrom et al. 2002).

La troisième hypothèse était celle d'une expression différente des deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs selon les conditions de culture cellulaire. Nous avons évalué l'expression protéique de ces deux récepteurs par des expériences de *binding* par compétition de la liaison spécifique du [¹²⁵I]-Iodo-Cyanopindolol, ligand non sélectif des récepteurs β -ARs, par un ligand sélectif du récepteur β_1 -AR, le bétaxolol, utilisé dans une large gamme de concentrations (21 concentrations de 10⁻¹² à 10⁻⁴ M). Cette approche expérimentale permet d'identifier plusieurs sites de liaison pour l'agent compétiteur, et notamment 2 sites de liaison du bétaxolol, de haute et faible affinités, correspondant respectivement aux récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Bristow et al. 1986). Cette technique a également l'avantage de détecter des sites de liaison peu exprimés. Ainsi, sur les cellulesensemencées à faible densité, une seule population de récepteurs β -ARs est détectée, correspondant au récepteur β_2 -AR (selon la valeur de K_i du bétaxolol), alors que sur les cellulesensemencées à haute densité, deux populations de récepteurs β -ARs ont été identifiées avec, respectivement, des valeurs de K_i correspondant à une affinité pour les récepteur β_1 - et β_2 -AR et des fractions de 0,11 et 0,89. Ces données de *binding* confirment la prédominance du récepteur β_2 -AR dans les CMLs et plus particulièrement les CMLVs, et confirment nos données fonctionnelles et pharmacologiques d'imagerie de FRET, dans lesquelles la réponse Iso est majoritairement bloquée par l'antagoniste β_2 -AR. Ces données sont également compatibles avec nos données de RT-PCR donnant une valeur seuil de détection (Ct) de l'ARNm codant pour le sous-type β_2 significativement plus faible que celle du sous-type β_1 . Enfin, ces données sont également en accord avec l'étude de Mader décrivant une proportion de récepteur β_2 -AR de 87% dans des cultures confluentes de CML aortiques de rats (Mader 1992). Cependant, dans cette étude, le degré de confluence ou de densité cellulaire n'est pas clairement décrit.

Globalement, nos résultats mettent en évidence une expression membranaire différentielle du récepteur β_1 -AR selon la densité cellulaire, avec une expression exclusive dans les CMLVs ensemencées à haute densité. L'expression membranaire du récepteur β_2 -AR est présente indépendamment de la densité cellulaire. Cependant, nos données expérimentales obtenues par étude de compétition de liaison ne permettent pas de quantifier la densité de chacun des deux sous-types de récepteurs, mais uniquement d'estimer leur proportion relative. Aussi, pour estimer l'effet de la densité cellulaire sur la densité du récepteur β_2 -AR exprimé à la membrane des CMLVs, il serait intéressant d'effectuer une étude de liaison spécifique de saturation, malheureusement, cette expérience ne peut être réalisée car, à notre connaissance, il n'existe pas de ligand radiomarqué et sélectif du récepteur β_2 -AR dans le commerce. La quantification de l'expression protéique du récepteur β_2 -AR pourrait également être envisagée par western blot, sachant que les limites de cette technique sont la spécificité contestée des anticorps dirigés contre les récepteurs β -ARs, et la nature semi-quantitative de cette quantification.

Afin de caractériser le mécanisme responsable de l'expression différentielle des récepteurs β -ARs en fonction de la densité d'ensemencement des CMLVs, nous avons quantifié l'expression des ARNms codant pour ces deux sous-types de récepteurs. Nos données de RT-PCR n'ont pas montré de différence significative d'expression de ces ARNms entre les deux groupes de cellules, suggérant ainsi que la perte d'expression membranaire du récepteur β_1 -AR dans les cellules ensemencées à faible densité implique un mécanisme post-transcriptionnel. Celui-ci n'a pas été recherché dans notre étude, mais il pourrait impliquer une altération du processus de traduction assurant la synthèse du récepteur β_1 -AR ou une altération de l'adressage du récepteur à la membrane. L'approche de western blot pourra permettre de vérifier si l'expression protéique totale du récepteur β_1 -AR est altérée dans les cellules ensemencées à faible densité. La localisation intracellulaire du récepteur β_1 -AR pourra être évaluée dans le compartiment endosomal par co-immunomarquage avec un marqueur de ce compartiment, l'*Early-Endosome Antigen-1* (Cai et al. 2015). Enfin, l'internalisation de ce récepteur sera analysée par un protocole de biotinylation des protéines membranaires, suivi d'une immunoprécipitation des protéines intracellulaires biotinylées correspondant aux protéines membranaires ayant subi une internalisation (Cai et al. 2015). La limite de ces différentes approches reposera sur le choix de l'anticorps anti-récepteur β_1 -AR qui devra être sélectif de ce récepteur et suffisamment puissant pour détecter ce récepteur faiblement exprimé dans les CMLVs. Enfin, une autre possibilité à envisager serait une

altération du phénomène d'oligomérisation du récepteur β_1 -AR, un processus connu pour influencer le trafic cellulaire des RCPGs, leurs propriétés pharmacologiques et leurs voies de signalisation (Lohse 2010, Ferre et al. 2014).

✓ **Rôle des familles de PDE-AMPC dans le contrôle des signaux AMPc cytosolique dans les CMLVs cultivées à faible et haute densité**

Nous avons complété notre étude par la caractérisation du profil d'expression des différentes isoformes de PDE-AMPC dans notre modèle cellulaire. Ainsi, les ARNm codant pour plusieurs isoformes sont présents (PDE 1A, 1C, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 7A, 7B et 8A), alors que ceux codant pour les isoformes PDE 1B, 2A, 4C et 8B n'ont pas été détectés. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux réalisés dans notre équipe de recherche (Zhai et al. 2012), mais montrent quelques différences avec ceux publiés par (Phillips et al. 2005). De manière intéressante, nous avons observé une augmentation de l'expression de certaines isoformes de PDEs (PDE1A, 3A, 4A, 4B et 7B) ainsi que de l'activité totale des PDEs-AMPC dans les cellules ensemencées à haute densité. Ainsi, la sur-expression de certaines isoformes de PDEs dans les cellules ensemencées à haute densité contribuerait à l'élévation de l'activité totale d'hydrolyse de ces enzymes, sans pour autant modifier la contribution relative des PDE3 et PDE4 dans cette activité totale entre les deux groupes de cellules. L'augmentation majeure de l'expression de l'isoforme PDE7A, d'un facteur de 5, dans les cellules ensemencées à haute densité, est un résultat inattendu qui mériterait d'être complété par des approches fonctionnelles, pour évaluer la conséquence de cette surexpression sur la régulation de la voie de l'AMPC dans ces cellules. Il est à noter que l'expression de la PDE7 dans les CMLVs est variable selon le lit vasculaire étudié et le phénotype cellulaire, avec notamment la détection de son ARNm dans les CMLV isolées d'artère pulmonaire humaine et mises en culture (Smith et al. 2003).

Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur l'étude du rôle fonctionnel des deux familles prédominantes de PDE-AMPC, la PDE3 et la PDE4, pour lesquelles nous disposons d'inhibiteurs sélectifs (Hidaka et al. 1979, Lugnier et al. 1986). Nous avons ainsi montré que dans les cellules ensemencées à faible densité, la PDE4 et à un degré moindre la PDE3 hydrolysent conjointement l'AMPC produit par la stimulation β -adrénergique, alors que dans les cellules ensemencées à haute densité, seule la PDE4 joue un rôle dans cette dégradation de l'AMPC et son inhibition permet de démasquer la contribution de la PDE3. Cette contribution différentielle de la PDE3 dans les deux groupes de cellules peut difficilement être corrélée à la

modification de l'expression des deux isoformes de PDE3, puisque la PDE3A, qui est l'isoforme dont l'expression est augmentée avec la densité cellulaire, est une isoforme plutôt décrite comme cytosolique, alors que la PDE3B, dont l'expression n'est pas modifiée avec la densité cellulaire, est une isoforme plutôt décrite comme membranaire (Liu and Maurice 1998, Palmer and Maurice 2000). Il serait intéressant d'évaluer la spécificité de chacune des isoformes de PDE3 mais également de PDE4 dans la régulation des réponses β_1 - et β_2 -adrénergiques, tel qu'il a été décrit dans un modèle d'expression hétérologue (Richter et al. 2008) ou dans les cardiomyocytes néonataux de rats (Xiang et al. 2005, Conti et al. 2014). Une approche de siRNA dirigés contre chacune de ces isoformes pourra être appliquée dans notre modèle cellulaire de CMLVs en culture.

En conclusion, cette étude illustre l'importance de la densité cellulaire sur la voie de signalisation β -ARs/AMPC/PDEs dans les CMLs d'aorte de rat en culture (**Figure 21**). Le résultat majeur de cette étude est l'impact de la densité cellulaire sur la contribution différentielle des deux sous-types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la production de l'AMPC en réponse à la stimulation par l'isoprénaline. Ainsi, l'implication fonctionnelle du récepteur β_1 -AR est perdue dans les cellules à faible densité d'ensemencement. Cette perte de fonction est associée à l'absence d'expression du récepteur à la membrane, consécutive à un mécanisme post-transcriptionnel. Par ailleurs, la densité des CMLVs module également l'activité hydrolytique des PDEs-AMPC qui augmente avec la densité cellulaire.

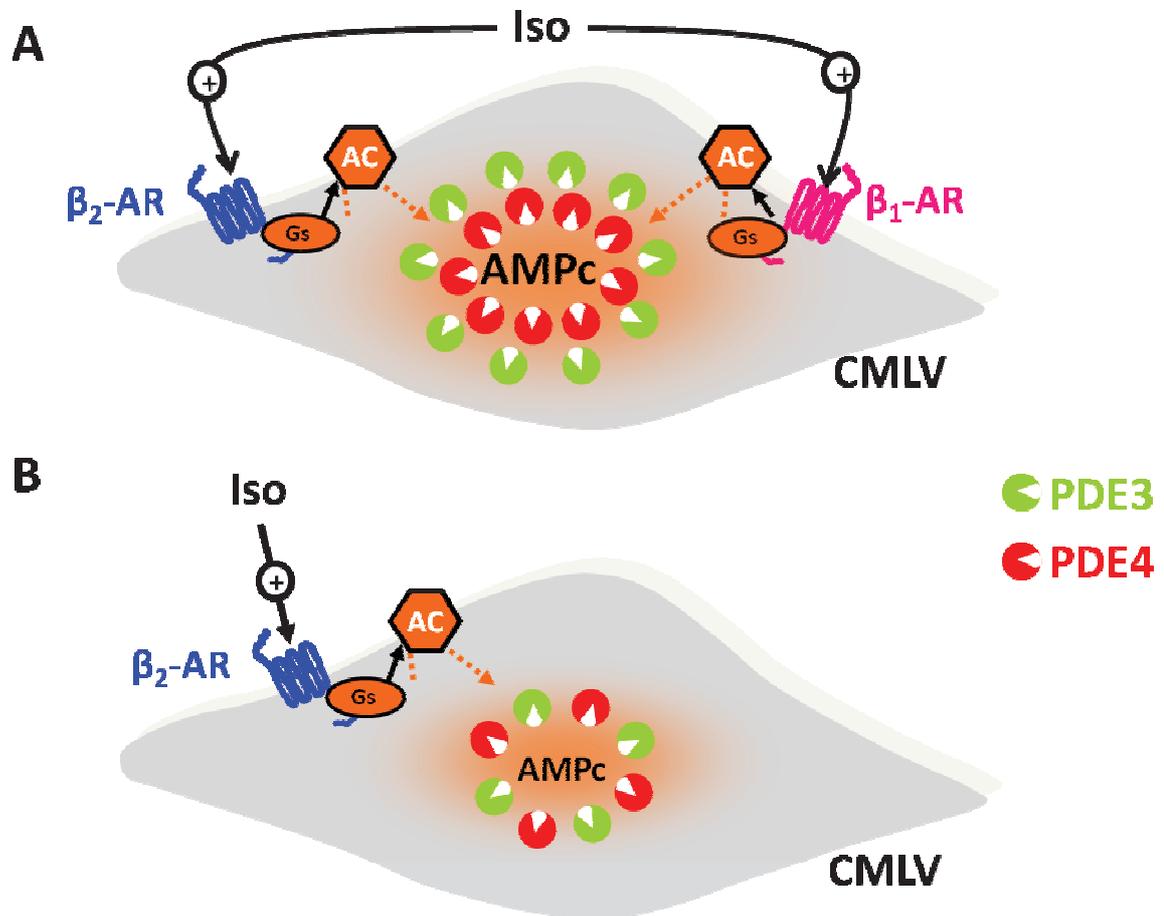


Figure 21: Schémas récapitulatifs de la contribution des récepteurs β_1 et β_2 -ARs dans la synthèse de l'AMPc et du rôle des PDEs dans son hydrolyse dans les CMLVs.

A : Dans les cellulesensemencées à haute densité : Le signal AMPc cytosolique, généré par les deux sous-types de récepteurs β_1 et β_2 -ARs suite à une stimulation à l'isoprénaline est hydrolyé principalement par la PDE4 dont l'inhibition démasque une participation de la PDE3. **B :** Dans les cellulesensemencées à faible densité : Le signal AMPc cytosolique implique uniquement le récepteur β_2 -AR et est conjointement hydrolyé par la PDE3 et la PDE4.

En perspectives, il apparaît nécessaire de caractériser le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans ces modulations liées au degré d'ensemencement des CMLVs.

Un premier aspect que nous souhaitons évaluer concerne l'effet de la densité cellulaire sur la composition lipidique membranaire. En effet, la membrane plasmique est une structure dynamique, composée principalement de phospholipides. Cependant, celle-ci n'est pas homogène et sa fluidité dépend de sa composition en lipides et de sa structure. Ainsi, les radeaux lipidiques ou « *lipid rafts* » constituent des microdomaines membranaires peu fluides enrichis notamment en cholestérol et sphingolipides. Les cavéoles correspondent à des invaginations de ces microdomaines enrichis en cavéoline. Il est clairement établi que ces microdomaines sphingolipides-cholestérol membranaires sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont le trafic membranaire et la transduction des signaux cellulaires (Harder and Simons 1997). Or, il a été montré que le processus de carcinogenèse, processus prolifératif et migratoire, est associé à une modification de la composition lipidique et protéique des microdomaines membranaires qui contribue notamment à l'acquisition du phénotype « Multi-Drug Resistance » (MDR) de ces cellules (Lavie and Liscovitch 2000). Ainsi, afin de comparer le profil lipidomique des CMLVs dans les deux conditions d'ensemencement, nous avons initié une collaboration avec Audrey Solgadi et le Pr Pierre Chaminade de la plateforme Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites (plateforme SAMM de l'IPSIT, Université Paris-Sud), afin d'analyser la composition en phospholipides de la membrane plasmique des CMLVs par spectrométrie de masse sur des extraits de lipides membranaires.

Le second aspect que nous souhaitons éclaircir concerne l'implication de facteurs solubles *versus* le contact cellulaire dans l'effet de la densité cellulaire sur la modulation phénotypique des CMLVs.

Une implication de facteurs solubles dans la modulation phénotypique contractile *versus* synthétique des CMLVs est décrite (Rensen et al. 2007). Pour évaluer la contribution de facteurs solubles dans nos conditions expérimentales, nous réaliserons des co-cultures de CMLVs ensemencées à faible et à haute densité, avec du milieu de culture conditionné provenant soit des cellules ensemencées à faible densité soit des cellules ensemencées à haute densité (Fillinger et al. 1997). Cette approche de co-culture nous permettra ainsi d'évaluer l'influence de la composition du milieu de culture sur les principales modulations que nous avons décrites dans notre étude.

Le rôle du contact cellulaire dans la modulation de la voie de signalisation de l'AMPC dans les CMLVs, notamment dans les cellules ensemencées à haute densité ayant atteint un degré de confluence leur permettant d'établir des contacts entre elles, est également un élément à prendre en considération et mérite ainsi d'être exploré. En effet, Kaya et *al.* (Kaya et al. 2012) ont montré que la voie de signalisation β_2 -adrénergique, et notamment l'efficacité de certains agonistes β_2 -ARs dans la production de l'AMPC et la phosphorylation d'ERK, dépendait de la densité des cellules HEK et plus précisément du contact cellule-cellule. Ces auteurs n'ont pas recherché les mécanismes impliqués dans ce contact cellulaire. Parmi les protéines impliquées dans les jonctions cellulaires, les cadhérines constituent une famille de glycoprotéines transmembranaires responsables de l'interaction cellule-cellule (Takeichi 1990), par le biais de leur domaine extracellulaire constitué de 5 domaines de répétition contenant le motif HAV (pour His-Ala-Val) (Geiger and Ayalon 1992), alors que leur domaine cytoplasmique est responsable de la liaison des cadhérines aux constituants du cytosquelette par l'intermédiaire des caténines. En plus de leur fonction structurale, les cadhérines agissent comme des récepteurs de signalisation pouvant moduler certaines fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration et la différenciation (Steinberg and McNutt 1999, Knudsen et al. 1998, Slater et al. 2004). Ainsi, il a été montré dans l'aorte de rat, que l'altération de la fonction des R-cadhérines entraîne la translocation nucléaire de la β -caténine et une augmentation des taux de cycline-1 responsable de la prolifération des CMLVs (Slater et al. 2004). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'éventuelle implication de ces protéines d'interaction cellulaire dans la modulation de la voie de signalisation β -AR dans les CMLVs d'aorte de rat. Afin d'inhiber l'établissement de ces contacts cellule-cellule dans les cellules à haute densité, nous utiliserons un peptide bloqueur de l'interaction des cadhérines par reconnaissance du motif HAV (peptide HAV) et son peptide contrôle (peptide HGV) (Slater et al. 2004). Ces données nous permettront d'évaluer le rôle des cadhérines dans l'établissement du phénotype des cellules ensemencées à haute densité. Si ces résultats ne sont pas concluants, nous envisagerons alors l'impact d'autres protéines d'adhésion cellulaire, telles que les intégrines.

✚ Rôle des PDEs-AMPC dans la réactivité vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle des principales familles de PDEs-AMPC (la PDE3 et la PDE4) dans la régulation de la fonction contractile de l'aorte de rat et à aux altérations potentielles en situation pathologique d'IC. Dans cette étude, nous avons caractérisé l'expression, l'activité et le rôle fonctionnel de la PDE3 et de la PDE4 dans l'aorte isolée de rat SHAM et IC. Ma contribution personnelle à ce travail initié par un ancien doctorant du laboratoire, Fabien Hubert, porte sur la réalisation d'études complémentaires, notamment de mesure de la pression artérielle *in vivo* et de caractérisation biochimique de l'activité PDE/nucléotides cycliques dans ce modèle pathologique.

✓ Evaluation de la pression artérielle systémique chez les rats IC

Notre étude a été réalisée sur un modèle d'IC par surcharge barométrique, avec sténose de l'aorte ascendante, modèle décrit comme reproduisant l'IC des patients présentant une sténose de la valve aortique (Muders and Elsner 2000). A notre connaissance, aucune mesure de pression artérielle systémique n'avait été réalisée auparavant sur ce modèle d'IC. Nous avons observé que les rats IC présentent une diminution de la pression artérielle moyenne qui pourrait être corrélée à la diminution du débit cardiaque caractéristique du stade d'IC décompensée de notre modèle expérimental.

✓ Expression protéique et activité hydrolytique des PDE-AMPC dans l'aorte de rats IC

Nous avons exploré les conséquences de l'IC sur l'activité d'hydrolyse des PDEs-AMPC (la PDE1, la PDE2, la PDE3 et la PDE4) ainsi que sur l'expression de la PDE3 et de la PDE4 aortiques. Le dosage biochimique *in vitro* de l'activité d'hydrolyse de l'AMPC a montré que dans l'aorte de rat SHAM, le profil d'activité de ces enzymes est le suivant : PDE3 > PDE4 >> PDE1, avec l'absence d'activité PDE2. Ces résultats sont en parfait accord avec les données de la littérature (Lugnier and Schini 1990, Polson and Strada 1996, Maurice et al. 2003). L'aorte isolée de rats IC présente une activité d'hydrolyse totale et une contribution des différentes familles de PDEs dans cette activité similaires à celle de l'aorte de rats SHAM. 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. Néanmoins, nous avons observé que dans les aortes de rats IC, l'activité de la PDE4 est diminuée en l'absence d'endothélium. Ces données biochimiques ont été complétées par une approche de western blot, pour identifier le profil d'expression protéique des isoformes de PDE3A, PDE3B et PDE4B. L'étude de l'expression de la PDE4D n'a pas pu être réalisée car l'anticorps commercial anti-PDE4D utilisé s'est révélé non spécifique, avec persistance d'un signal lors de l'étude d'un tissu contrôle issu de souris déficientes en PDE4D (données non montrées). Nous avons observé que l'IC était associée à des altérations de l'expression protéique des PDEs vasculaires, avec une augmentation de l'expression de la forme courte de la PDE3A (forme à 98 kDa) et de la PDE4B, sans modification de la PDE3B. Ces résultats contradictoires entre la mesure de l'activité hydrolytique de l'AMPc et l'expression protéique des PDE-AMPc pourraient s'expliquer par le fait que l'augmentation de l'expression protéique est trop faible pour induire une augmentation de l'activité enzymatique détectable par notre dosage biochimique. A notre connaissance, une seule étude a rapporté 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.

✓ **Altération de la fonction vasculaire aortique des rats IC**

L'aorte de rats IC présente une dysfonction contractile vasculaire caractérisée 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 dépendante de la voie du NO et la perte de l'effet potentialisateur de l'endothélium sur la réponse contractile à la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Ces altérations sont classiquement décrites dans l'IC (Francis and Cohn 1990, Negro et al. 2000, Nakamura et al. 2001). En revanche, 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 impliqués dans la régulation de sa fonction (Baggia et al. 1997, Richard et al. 2009). Aussi, il serait intéressant d'étudier d'autres lits vasculaires

notamment les artères de résistance. Des données non publiées du laboratoire montrent ainsi que les artères mésentériques présentent une altération moindre de ces paramètres vasculaires.

✓ **Altérations fonctionnelles des PDE-AMPC dans l'aorte de rats IC**

Après avoir caractérisé notre modèle de rat pathologique en termes d'activité enzymatique, d'expression protéique des PDE-AMPC et de fonction vasculaire globale, nous avons analysé la contribution fonctionnelle des familles de PDE-AMPC majoritaires (la PDE3 et la PDE4) dans le contrôle du tonus contractile de l'aorte, à l'aide d'inhibiteurs sélectifs de ces deux familles de PDEs.

Nous avons constaté que la PDE3 et la PDE4 sont toutes les deux impliquées dans le contrôle du tonus aortique mais que leur contribution diffère à plusieurs niveaux (**Figure 22**).

Globalement, nous avons observé que dans les aortes intactes de rats SHAM, l'inhibition de la PDE3 induit une vasorelaxation, potentialisée dans les aortes dépourvues d'endothélium fonctionnel ou lors de l'inhibition de la NOS. Ces résultats pourraient s'expliquer par la diminution de la libération du NO par l'endothélium, induisant une diminution des concentrations de GMPc dans la CMLV, et donc une augmentation de l'activité de la PDE3 dans ces cellules. En revanche, l'effet vasorelaxant observé suite à l'inhibition de la PDE4 est aboli dans les aortes dépourvues d'endothélium fonctionnel mais restauré par l'inhibiteur de PDE3. Ces données suggèrent que la fonction de la PDE3 est augmentée lors d'une altération de la voie du NO endothélial, et peut alors masquer celle de la PDE4. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Komasa *et al.* qui 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 (Komasa et al. 1991). Afin de confirmer ces données fonctionnelles, nous avons réalisé des dosages biochimiques d'AMPC et de GMPc dans les anneaux aortiques. L'inhibition de la PDE3 par le cilostamide ne modifie pas les niveaux intracellulaires d'AMPC et de GMPc, alors que l'inhibition de la PDE4 par le Ro-201724 induit une augmentation d'AMPC uniquement lorsque l'endothélium est fonctionnel. Cette absence d'effet du cilostamide est inattendu, et contradictoire avec les données précédemment décrites dans la littérature (Eckly and Lugnier 1994). Cependant, ces résultats apparemment incohérents pourraient s'expliquer par le fait que les réponses fonctionnelles induites par les nucléotides cycliques ne requièrent pas de modification globale de leur concentration, mais plutôt une modification localisée dans des compartiments subcellulaires impliqués directement dans les effets fonctionnels de l'AMPC (Mika et al. 2012).

Les données obtenues dans l'aorte de rat IC témoignent également d'une régulation différentielle de la fonction de la PDE3 et PDE4. Alors que la relaxation induite par l'inhibition de la PDE3 est préservée dans l'aorte de rat IC, l'effet vasorelaxant de l'inhibition de la PDE4 est aboli (**Figure 22**). Cette perte de la fonction de la PDE4 dans l'aorte de rat IC est similaire à celle observée dans l'aorte de rats SHAM dépourvue d'endothélium, et est associée à l'absence d'effet de l'inhibiteur de PDE4 sur la concentration d'AMPC. D'une manière intéressante, l'inhibition de la PDE3 restaure la relaxation induite par l'inhibition de la PDE4 dans l'aorte de rat IC présentant ou pas un endothélium fonctionnel. Ces résultats soutiennent l'hypothèse 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.

Pour finir, nous nous sommes également intéressés à la vasorelaxation induite par la stimulation des récepteurs β -ARs, et à sa modulation par la PDE3 et la PDE4 dans l'aorte de rat SHAM et IC. Différentes études réalisées sur des artères systémiques et pulmonaires isolées de différents modèles animaux d'IC ont montré une diminution de la vasorelaxation β -AR (Mathew et al. 1993, Nasa et al. 1996, McGoldrick et al. 2007). Dans notre modèle d'aorte de rats IC, nous avons également observé une diminution de la relaxation β -AR (**Figure 23**), qui semble être la conséquence de la dysfonction endothéliale, car dans l'aorte de rats SHAM, cette vasorelaxation β -AR est abolie lors de l'inhibition de la NOS ou lorsque l'aorte est dénudée de son endothélium. Une perte similaire de la relaxation β -AR en l'absence d'endothélium fonctionnel a été rapportée dans de précédentes études et a conduit les auteurs à conclure que la réponse β -AR était dépendante de l'endothélium (Kamata et al. 1989, Gray and Marshall 1992). Nos résultats contredisent ces conclusions d'autant plus que la relaxation β -AR est complètement restaurée après l'inhibition de la PDE3 dans les aortes de rat SHAM et IC dépourvues d'endothélium. Ainsi, nos résultats supportent un autre mécanisme de régulation de la relaxation β -AR : le NO libéré par l'endothélium provoquerait une inhibition de la PDE3 de la CMLV *via* le GMPc, agissant ainsi comme un frein dans la dégradation de l'AMPC produit en réponse à la stimulation des récepteurs β -ARs présents sur la CMLV, conduisant à une relaxation de la CML. Dans l'IC, la dysfonction endothéliale conduit à une "sur-activation" de la PDE3, et seule l'inhibition de la PDE3 permet de restaurer une réponse fonctionnelle β -AR.

En conclusion, cette étude a souligné le rôle clef de l'endothélium dans la régulation de la fonction des PDEs et de la fonction contractile de l'aorte de rat. La dysfonction endothéliale dans l'IC conduit à une "sur-activation" de la PDE3 masquant l'activité PDE4 et l'effet

relaxant β -adrénergique. Ainsi, l'inhibition de la PDE3 pourrait constituer une cible thérapeutique séduisante permettant la restauration de la relaxation β -AR dans l'IC. La limite de notre étude est que l'aorte est une artère de conductance qui n'est pas impliquée de manière critique dans la régulation de la pression artérielle. Aussi, des études complémentaires seront nécessaires afin d'élucider le rôle des PDEs dans la régulation de la fonction contractile dans les artères de résistance. Néanmoins, notre étude a clairement montré qu'au cours de l'IC, la dysfonction endothéliale conduit à des altérations de la fonction des PDEs de la CMLV. Ceci pourrait constituer une caractéristique commune à toutes les pathologies cardiovasculaires présentant une dysfonction endothéliale.

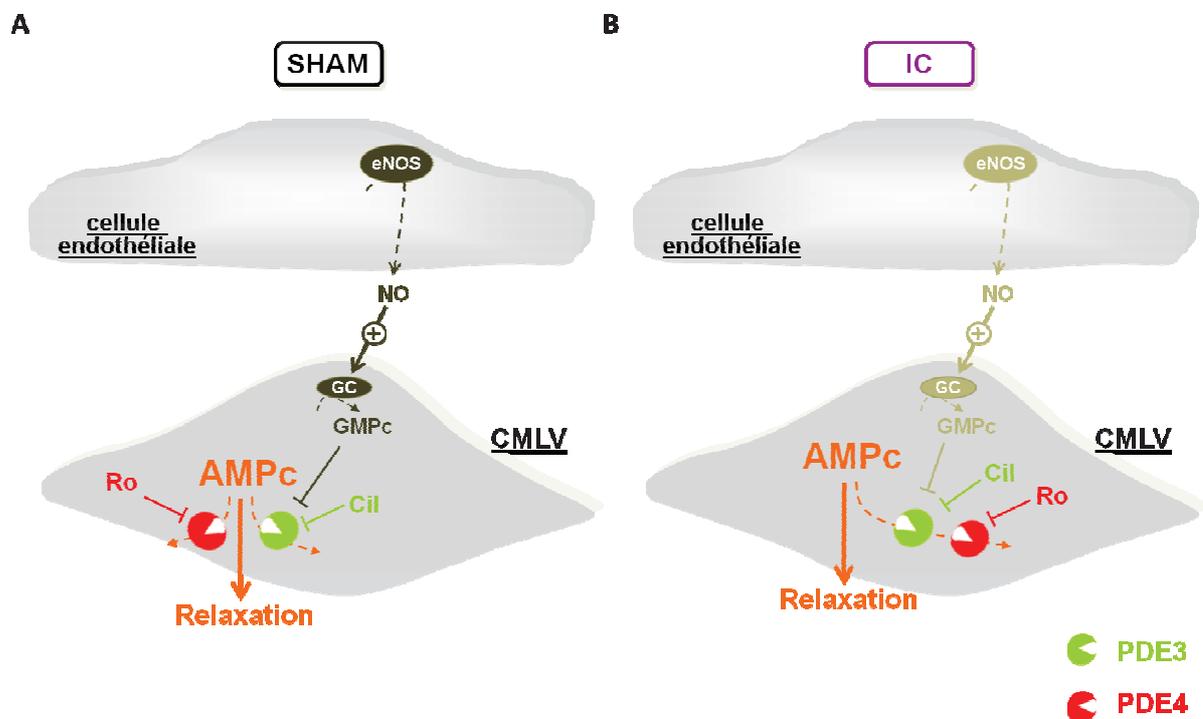


Figure 22 : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPc dans le contrôle du tonus contractile basal dans les aortes de rats SHAM et IC.

A : Dans les aortes de rat SHAM, les PDE3 et PDE4 contrôlent les concentrations basales d'AMPc et leur inhibition provoque une vasorelaxation. La voie NO/GMPc exerce un effet inhibiteur sur 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, alors que celle de la PDE4 est altérée. L'inhibition de la PDE3 permet alors de restorer l'effet vasorelaxant d'un inhibiteur de PDE4.

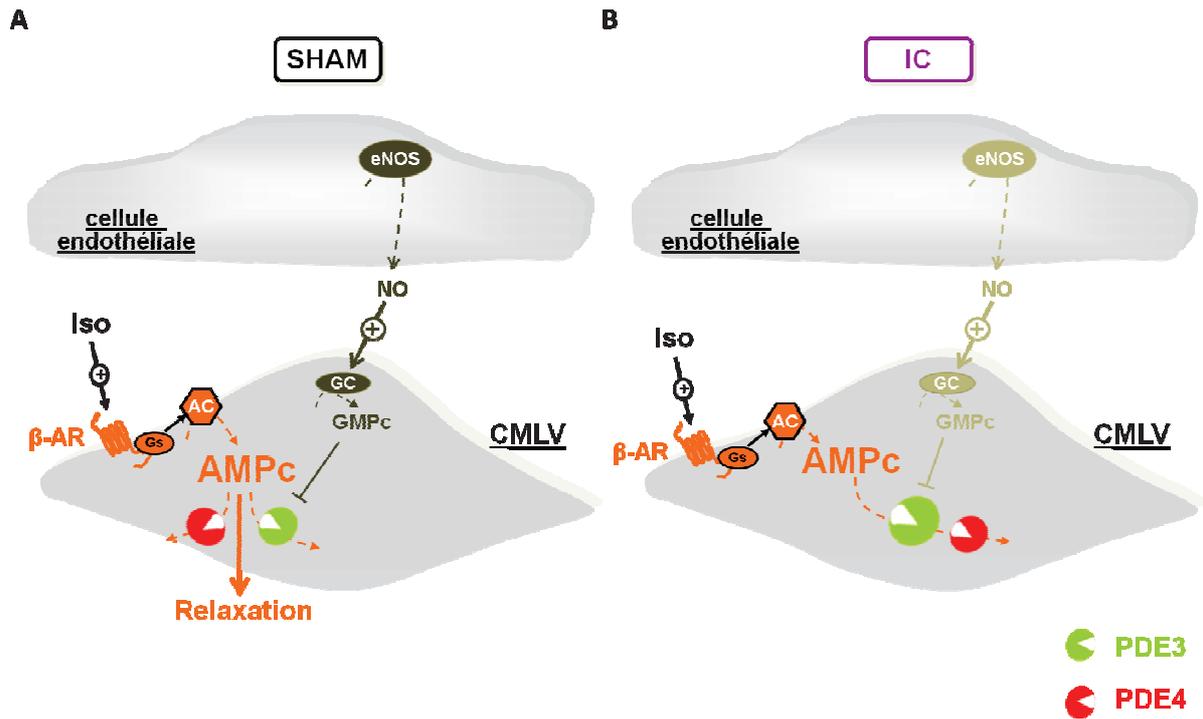


Figure 23 : Schémas récapitulatifs du rôle des PDEs-AMPc dans le contrôle de la réponse relaxante β -adrénergique dans les aortes de rats SHAM et IC.

A : Dans les aortes de rat SHAM, la relaxation induite par une stimulation des récepteurs β -ARs est contrôlée par les PDE3 et PDE4, mais également par la voie du NO/GMPc qui exerce un effet inhibiteur sur l'activité de la PDE3. **B :** Dans les aortes de rat IC, la relaxation β -adrénergique est abolie du fait d'un contrôle négatif par la PDE3, mais également dans une moindre mesure par la PDE4.

CONCLUSIONS

Mes travaux de thèse soulignent le rôle critique de l'environnement cellulaire dans le contrôle de la signalisation β -adrénergique vasculaire.

Notre première étude, réalisée sur un modèle de culture de CMLVs isolées à partir de l'aorte de rat, a montré que l'état de confluence de ces cellules régule la voie de signalisation β -AR/AMPC/PDE en modulant l'expression et/ou la fonction des différents acteurs de cette voie, suggérant un rôle des CMLVs environnantes dans ce processus.

Notre seconde étude, réalisée sur un modèle intégré d'aorte de rat, a confirmé le rôle prépondérant de l'endothélium dans la régulation de la fonction contractile vasculaire en modulant notamment la voie β -AR/AMPC/PDE musculaire lisse. Cette étude démontre également que toute dysfonction endothéliale, associée à une situation pathologique telle que l'IC, peut entraîner une altération de cette voie de signalisation.

BIBLIOGRAPHIE

- AALKJAER C, HEAGERTY AM, PETERSEN KK, SWALES JD AND MULVANY MJ. 1987. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation--contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ Res* 61: 181-186.
- ABI-GERGES A ET AL. 2009. Decreased Expression and Activity of cAMP Phosphodiesterases in Cardiac Hypertrophy and Its Impact on β -Adrenergic cAMP Signals. *Circ Res* 105: 784-792.
- AIRD WC. 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100: 174-190.
- ALLEN SW, CHATFIELD BA, KOPPENHAFFER SA, SCHAFFER MS, WOLFE RR AND ABMAN SH. 1993. Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. Association with acute hypoxic pulmonary vasoreactivity. *The American review of respiratory disease* 148: 519-522.
- ANG AH, TACHAS G, CAMPBELL JH, BATEMAN JF AND CAMPBELL GR. 1990. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *The Biochemical journal* 265: 461-469.
- ANGUS JA AND WRIGHT CE. 2000. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44: 395-407.
- 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. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280: H68-75.
- ARRIBAS S, MARIN J, PONTE A, BALFAGON G AND SALAICES M. 1994. Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 520-527.
- ASSINDER SJ, STANTON JA AND PRASAD PD. 2009. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 482-486.
- BABU GJ, WARSHAW DM AND PERIASAMY M. 2000. Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microscopy research and technique* 50: 532-540.
- BAGGIA S, PERKINS K AND GREENBERG B. 1997. Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *Journal of cardiovascular pharmacology* 29: 389-396.
- BAGNALL AJ, KELLAND NF, GULLIVER-SLOAN F, DAVENPORT AP, GRAY GA, YANAGISAWA M, WEBB DJ AND KOTELEVTSYEV YV. 2006. Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension* 48: 286-293.
- BAKEHE M. 2013. Système cardiovasculaire.
- BAKER JG, HALL IP AND HILL SJ. 2003. Agonist actions of "beta-blockers" provide evidence for two agonist activation sites or conformations of the human beta1-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 63: 1312-1321.
- BAKKER EN, BUUS CL, VANBAVEL E AND MULVANY MJ. 2004. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *Journal of vascular research* 41: 174-182.
- BARBAGALLO F ET AL. 2016. Genetically Encoded Biosensors Reveal PKA Hyperphosphorylation on the Myofilaments in Rabbit Heart Failure. *Circ Res*.
- BARST RJ, RUBIN LJ, MCGOON MD, CALDWELL EJ, LONG WA AND LEVY PS. 1994. Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Annals of internal medicine* 121: 409-415.
- 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: 292-298.
- BAUERSACHS J, FLEMING I, FRACCAROLLO D, BUSSE R AND ERTL G. 2001. Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc Res* 51: 344-350.
- 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, p. 1-713.
- BEGONHA R, MOURA D AND GUIMARAES S. 1995. Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 47: 510-513.
- 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: 26238-26249.
- BELCH JJ, BRIDGES AB, SCOTT N AND CHOPRA M. 1991. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *British heart journal* 65: 245-248.
- BELL D AND MCDERMOTT BJ. 1996. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacological reviews* 48: 253-288.
- BELO VA, GUIMARAES DA AND CASTRO MM. 2015. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *Journal of vascular research* 52: 221-231.
- BENDECK MP, ZEMPO N, CLOWES AW, GALARDY RE AND REIDY MA. 1994. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 75: 539-545.
- BERKENBOOM G, DEPIERREUX M AND FONTAINE J. 1987. The influence of atherosclerosis on the mechanical responses of human isolated coronary arteries to substance P, isoprenaline and noradrenaline. *Br J Pharmacol* 92: 113-120.
- BEZPROZVANNY I, WATRAS J AND EHRLICH BE. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351: 751-754.
- BIEL M, ZONG X, DISTLER M, BOSSE E, KLUGBAUER N, MURAKAMI M, FLOCKERZI V AND HOFMANN F. 1994. Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3505-3509.
- 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: 922-927.
- 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: 229-237.
- BOBIN P, BELACEL-OUARI M, BEDIOUNE I, ZHANG L, LEROY J, LEBLAIS V, FISCHMEISTER R AND VANDECASTEELE G. 2016. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Archives of cardiovascular diseases*.

- BOCKAERT J AND PIN JP. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal* 18: 1723-1729.
- BOLTON TB. 1979. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59: 606-718.
- BOONEN HC, DAEMEN MJ, EERDMANS PH, FAZZI GE, VAN KLEEF EM, SCHIFFERS PM AND DE MEY JG. 1993. Mesenteric small artery changes after vasoconstrictor infusion in young rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 22: 388-395.
- BORKOWSKI KR, GROS R AND SCHNEIDER H. 1992. Vascular beta-adrenoceptor-mediated responses in hypertension and ageing in rats. *Journal of autonomic pharmacology* 12: 389-401.
- BOS CL, RICHEL DJ, RITSEMA T, PEPPELENBOSCH MP AND VERSTEEG HH. 2004. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36: 1187-1205.
- BOS JL. 2006. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in biochemical sciences* 31: 680-686.
- 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: 637-644.
- 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: 285-296.
- BRIONES AM, ARRIBAS SM AND SALAICES M. 2010. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* 19: 187-194.
- BRISTOW MR, GINSBURG R, UMANS V, FOWLER M, MINOBE W, RASMUSSEN R, ZERA P, MENLOVE R, SHAH P AND JAMIESON S. 1986. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59: 297-309.
- BRISTOW MR, MINOBE WA, RAYNOLDS 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.
- 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 engineering Part A* 15: 815-825.
- BUSSE R, EDWARDS G, FELETOU M, FLEMING I, VANHOUTTE PM AND WESTON AH. 2002. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in pharmacological sciences* 23: 374-380.
- 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.
- BUXTON IL AND BRUNTON LL. 1983. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem* 258: 10233-10239.
- BYLUND DB, EIKENBERG DC, HIEBLE JP, LANGER SZ, LEFKOWITZ RJ, MINNEMAN KP, MOLINOFF PB, RUFFOLO RR, JR. AND TRENDELENBURG U. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological reviews* 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. *Endocrine reviews* 24: 765-781.

- CAI Y, MILLER CL, NAGEL DJ, JEON K-I, 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: 616-623.
- CAI Y, NAGEL DJ, ZHOU Q, CYGNAR KD, ZHAO H, LI F, PI X, KNIGHT PA AND YAN C. 2015. Role of cAMP-Phosphodiesterase 1C Signaling in Regulating Growth Factor Receptor Stability, Vascular Smooth Muscle Cell Growth, Migration, and Neointimal Hyperplasia. *Circ Res* 116: 1120-1132.
- CARAFOLI E. 1992. The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267: 2115-2118.
- CARVALHO MH, SCIVOLETTO R, FORTES ZB, NIGRO D AND CORDELLINI S. 1987. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. *Journal of hypertension* 5: 377-382.
- CASTRO MM AND TANUS-SANTOS JE. 2013. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Current drug targets* 14: 335-343.
- CHAMLEY-CAMPBELL J, CAMPBELL GR AND ROSS R. 1979. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59: 1-61.
- CHAMLEY-CAMPBELL JH AND CAMPBELL GR. 1981. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* 40: 347-357.
- CHAPMAN RA AND TUNSTALL J. 1987. The calcium paradox of the heart. *Progress in biophysics and molecular biology* 50: 67-96.
- CHEN J, LEVIN LR AND BUCK J. 2012. Role of soluble adenylyl cyclase in the heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 302: H538-543.
- CHEN ZS, LEE K AND KRUEH GD. 2001. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276: 33747-33754.
- CHENG KT, CHAN FL, HUANG Y, CHAN WY AND YAO X. 2003. Expression of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channel (CNGA2) in vascular tissues. *Histochemistry and cell biology* 120: 475-481.
- CHENG KT, LEUNG YK, SHEN B, KWOK YC, WONG CO, KWAN HY, MAN YB, MA X, HUANG Y AND YAO X. 2008. CNGA2 channels mediate adenosine-induced Ca²⁺ influx in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 913-918.
- 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: 882-888.
- CHRISTIAN AE, HAYNES MP, PHILLIPS MC AND ROTHBLAT GH. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of lipid research* 38: 2264-2272.
- 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.
- CLÉMENT N, GLORIAN M, RAYMONDJEAN M, ANDRÉANI M AND LIMON I. 2006. PGE₂ amplifies the effects of IL-1 β on vascular smooth muscle cell de-differentiation: A consequence of the versatility of PGE₂ receptors 3 due to the emerging expression of adenylyl cyclase 8. *J Cell Physiol* 208: 495-505.

- COCKCROFT JR, CHOWIENCZYK PJ, BENJAMIN N AND RITTER JM. 1994. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *The New England journal of medicine* 330: 1036-1040.
- CONTI M AND BEAVO J. 2007. Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annual Review of Biochemistry* 76: 481-511.
- CONTI M, MIKA D AND RICHTER W. 2014. Cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *The Journal of general physiology* 143: 29-38.
- CORBIN JD AND KEELY SL. 1977. Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J Biol Chem* 252: 910-918.
- CRASS III MF, BORST SE AND SCARPACE PJ. 1992. β -adrenergic responsiveness in cultured aorta smooth muscle cells Effects of subculture and aging. *Biochemical Pharmacology* 43: 1811-1815.
- DAAKA Y, LUTTRELL LM AND LEFKOWITZ RJ. 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88-91.
- DARBY I, SKALLI O AND GABBIANI G. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63: 21-29.
- DAVIS MJ AND HILL MA. 1999. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 79: 387-423.
- DAVOREN PR AND SUTHERLAND EW. 1963. The Effect of L-Epinephrine and Other Agents on the Synthesis and Release of Adenosine 3',5'-Phosphate by Whole Pigeon Erythrocytes. *J Biol Chem* 238: 3009-3015.
- DAZERT P ET AL. 2003. Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *The American journal of pathology* 163: 1567-1577.
- 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.
- DEFOUW LM AND DEFOUW DO. 2001. Differential phosphodiesterase activity contributes to restrictive endothelial barrier function during angiogenesis. *Microvascular research* 62: 263-270.
- 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 therapy* 6: 956-965.
- DELPY E, COSTE H AND 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. *British Journal of Pharmacology* 119.
- DESSY C ET AL. 2005. Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. *Circulation* 112: 1198-1205.
- DI BENEDETTO G, SCALZOTTO E, MONGILLO M AND POZZAN T. 2013. Mitochondrial Ca(2)(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell metabolism* 17: 965-975.

- DING B ET AL. 2005. Functional Role of Phosphodiesterase 3 in Cardiomyocyte Apoptosis Implication in Heart Failure. *Circulation* 111: 2469-2476.
- DING C, POTTER ED, QIU W, COON SL, LEVINE MA AND GUGGINO SE. 1997. Cloning and widespread distribution of the rat rod-type cyclic nucleotide-gated cation channel. *The American journal of physiology* 272: C1335-1344.
- DIXON RA ET AL. 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321: 75-79.
- DODGE-KAFKA KL, SOUGHAYER J, PARE GC, CARLISLE MICHEL JJ, LANGE BERG LK, KAPILOFF MS AND SCOTT JD. 2005. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 437: 574-578.
- DOEBELE RC ET AL. 2009. A novel interplay between Epac/Rap1 and mitogen-activated protein kinase kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5 (MEK5/ERK5) regulates thrombospondin to control angiogenesis. *Blood* 114: 4592-4600.
- DOLLERY CM AND LIBBY P. 2006. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 69: 625-635.
- DONG LH, WEN JK, LIU G, MCNUTT MA, MIAO SB, GAO R, ZHENG B, ZHANG H AND HAN M. 2010. Blockade of the Ras-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in smooth muscle 22 alpha-mediated suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 683-691.
- DOUGLAS JS, JR. ET AL. 2005. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation* 112: 2826-2832.
- DREXLER H AND LU W. 1992. Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. *The American journal of physiology* 262: H1640-1645.
- 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: 1033-1040.
- ECKLY-MICHEL A, MARTIN V AND LUGNIER C. 1997. Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *Br J Pharmacol* 122: 158-164.
- 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. *British Journal of Pharmacology* 113.
- EDDAHIBI S ET AL. 2006. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113: 1857-1864.
- EDDINGER TJ AND MEER DP. 2007. Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. *American journal of physiology Cell physiology* 293: C493-508.
- EDVINSSON L AND OWMAN C. 1974. Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro. *Circ Res* 35: 835-849.
- EGLER RM, HEGDE SS AND WATSON N. 1996. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacological reviews* 48: 531-565.
- EISNER DA AND LEDERER WJ. 1985. Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *The American journal of physiology* 248: C189-202.
- EL-ARMOUCHE A AND ESCHENHAGEN T. 2009. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart failure reviews* 14: 225-241.

- EMORINE LJ, MARULLO S, BRIEND-SUTREN MM, PATEY G, TATE K, DELAVIER-KLUTCHKO C AND STROSBERG AD. 1989. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245: 1118-1121.
- FANG ZY AND MARWICK TH. 2002. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? *American heart journal* 143: 383-390.
- 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: 2676-2686.
- FEIHL F, LIAUDET L, WAEBER B AND LEVY BI. 2006. Hypertension: a disease of the microcirculation? *Hypertension* 48: 1012-1017.
- 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.
- FELDMAN MD, COPELAS L, GWATHMEY JK, PHILLIPS P, WARREN SE, SCHOEN FJ, GROSSMAN W AND MORGAN JP. 1987. Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 75: 331-339.
- FELDMAN RD. 1987. Beta-adrenergic receptor alterations in hypertension--physiological and molecular correlates. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 65: 1666-1672.
- FELETOU M AND VANHOUTTE PM. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291: H985-1002.
- FELETOU M AND VANHOUTTE PM. 2007. Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. *Annals of medicine* 39: 495-516.
- FENG M, WHITESALL S, ZHANG Y, BEIBEL M, ALECY LD AND DIPETRILLO K. 2008. Validation of Volume--Pressure Recording Tail-Cuff Blood Pressure Measurements. *Am J Hypertens* 21: 1288-1291.
- FERRE S, CASADO V, DEVI LA, FILIZOLA M, JOCKERS R, LOHSE MJ, MILLIGAN G, PIN JP AND GUITART X. 2014. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacological reviews* 66: 413-434.
- FERRO A, COASH M, YAMAMOTO T, ROB J, JI Y AND QUEEN L. 2004. Nitric oxide-dependent beta2-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: 1872-1880.
- FILIPPOV S ET AL. 2005. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *The Journal of experimental medicine* 202: 663-671.
- 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. *The Journal of surgical research* 67: 169-178.
- FISCHMEISTER R, CASTRO LR, ABI-GERGES A, ROCHAIS F, JUREVICIUS 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.
- FLACCO N, SEGURA V, PEREZ-ASO M, ESTRADA S, SELLER J, JIMÉNEZ-ALTAYÓ F, NOGUERA M, D'OCÓN P, VILA E AND IVORRA M. 2013. Different β -adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways:

- implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *British Journal of Pharmacology* 169: 413-425.
- FRANCIS GS AND COHN JN. 1990. Heart failure: mechanisms of cardiac and vascular dysfunction and the rationale for pharmacologic intervention. *FASEB J* 4: 3068-3075.
- FRANCIS SH, BUSCH JL, CORBIN JD AND SIBLEY D. 2010. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological reviews* 62: 525-563.
- FRASER ID, CONG M, KIM J, ROLLINS EN, DAAKA Y, LEFKOWITZ RJ AND SCOTT JD. 2000. Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Current biology* : CB 10: 409-412.
- FREEDMAN NJ AND LEFKOWITZ RJ. 1996. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent progress in hormone research* 51: 319-351; discussion 352-313.
- FRID MG, ALDASHEV AA, DEMPSEY EC AND STENMARK KR. 1997. Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res* 81: 940-952.
- FRIDOLFSSON HN, ROTH DM, INSEL PA AND PATEL HH. 2014. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J* 28: 3823-3831.
- 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: 7920-7924.
- FU-XIANG D, JAMESON M, SKOPEC J, DIEDERICH A AND DIEDERICH D. 1992. Endothelial dysfunction of resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 20 Suppl 12: S190-192.
- FURCHGOTT RF AND ZAWADZKI JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- GABALLA MA, ECKHART A, KOCH WJ AND GOLDMAN S. 2001. Vascular beta-adrenergic receptor system is dysfunctional after myocardial infarction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280: H1129-1135.
- GALIS ZS AND KHATRI JJ. 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90: 251-262.
- GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW AND LIBBY P. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94: 2493-2503.
- GARG UC AND HASSID A. 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-1777.
- GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D AND LE MAREC H. 1996. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98: 556-562.
- GEIGER B AND AYALON O. 1992. Cadherins. *Annual review of cell biology* 8: 307-332.
- GHERBI K, BRIDDON SJ AND HILL SJ. 2014. Detection of the secondary, low-affinity beta1 -adrenoceptor site in living cells using the fluorescent CGP 12177 derivative BODIPY-TMR-CGP. *Br J Pharmacol* 171: 5431-5445.

- GHERBI K, MAY LT, BAKER JG, BRIDDON SJ AND HILL SJ. 2015. Negative cooperativity across beta1-adrenoceptor homodimers provides insights into the nature of the secondary low-affinity CGP 12177 beta1-adrenoceptor binding conformation. *FASEB J* 29: 2859-2871.
- 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: 655-663.
- GLENNEY JR, JR. AND SOPPET D. 1992. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10517-10521.
- GOYAL RK. 1989. Muscarinic receptor subtypes. Physiology and clinical implications. *The New England journal of medicine* 321: 1022-1029.
- 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.
- GRAY DW AND MARSHALL I. 1992. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *British Journal of Pharmacology* 107.
- 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: 845-852.
- GUEGUEN M, KEUYLIAN Z, MATEO V, MOUGENOT N, LOMPRÉ A-M, MICHEL J-B, 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: 331-342.
- GUIMARAES S AND MOURA D. 2001. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological reviews* 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: 371-373.
- HAGNER S, STAHL U, KNOBLAUCH B, MCGREGOR GP AND LANG RE. 2002. Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell and tissue research* 310: 41-50.
- HAILSTONES D, SLEER LS, PARTON RG AND STANLEY KK. 1998. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *Journal of lipid research* 39: 369-379.
- HAN M, DONG LH, ZHENG B, SHI JH, WEN JK AND CHENG Y. 2009. Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life Sci* 84: 394-401.
- HANOUNE J AND DEFER N. 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41: 145-174.
- HANSEN JT. 1987. Morphology of the carotid sinus wall in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *The Anatomical record* 218: 426-433.
- HANSSON GK, GENG YJ, HOLM J, HARDHAMMAR P, WENNMALM A AND JENNISCHE E. 1994. Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *The Journal of experimental medicine* 180: 733-738.
- HANSSON GK, JONASSON L, HOLM J AND CLAESSION-WELSH L. 1986. Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque: smooth muscle cells express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant gamma chain. *Clinical and experimental immunology* 64: 261-268.

- 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: 1510-1520.
- 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: 1093-1099.
- HARA Y, SASSI Y, GUIBERT C, GAMBARYAN N, DORFMULLER P, EDDAHIBI S, LOMPRES AM, HUMBERT M AND HULOT JS. 2011. Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *J Clin Invest* 121: 2888-2897.
- HARDER T AND SIMONS K. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9: 534-542.
- HARRISON DG. 1997. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100: 2153-2157.
- HARRISON DG, WIDDER J, GRUMBACH I, CHEN W, WEBER M AND SEARLES C. 2006. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *Journal of internal medicine* 259: 351-363.
- HASSOUN PM, THAPPA V, LANDMAN MJ AND FANBURG BL. 1992. Endothelin 1: mitogenic activity on pulmonary artery smooth muscle cells and release from hypoxic endothelial cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 199: 165-170.
- HATHAWAY DR, KONICKI MV AND COOLICAN SA. 1985. Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *J Mol Cell Cardiol* 17: 841-850.
- HAUSDORFF WP, BOUVIER M, O'DOWD BF, IRONS GP, CARON MG AND LEFKOWITZ RJ. 1989. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 264: 12657-12665.
- 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: 10948-10956.
- HAYASHI K AND NAIKI T. 2009. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2: 3-19.
- HAYWOOD GA ET AL. 1996. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 93: 1087-1094.
- HE R, KOMAS N, EKHOLOM 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 biochemistry and biophysics* 29: 89-111.
- HEAD BP, PATEL HH AND INSEL PA. 2014. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1838: 532-545.
- 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. *Journal of cellular biochemistry* 89: 1250-1259.
- HICKEY KA, RUBANYI G, PAUL RJ AND HIGHSMITH RF. 1985. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *The American journal of physiology* 248: C550-556.

- 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.
- HIMPENS B, KITAZAWA T AND SOMLYO AP. 1990. Agonist-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 417: 21-28.
- HIRANO K. 2007. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *Journal of pharmacological sciences* 104: 109-115.
- HIROSE K, KADOWAKI S, TANABE M, TAKESHIMA H AND IINO M. 1999. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns. *Science* 284: 1527-1530.
- HOEPER MM ET AL. 2013. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62: D42-50.
- HOFFMANN C, LEITZ MR, OBERDORF-MAASS S, LOHSE MJ AND KLOTZ KN. 2004. Comparative pharmacology of human β -adrenergic receptor subtypes—characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 151-159.
- HOUSE SJ, POTIER M, BISAILLON J, SINGER HA AND TREBAK M. 2008. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 456: 769-785.
- 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.
- ICHII T, KOYAMA H, TANAKA S, KIM S, SHIOI A, OKUNO Y, RAINES EW, IWAO H, OTANI S AND NISHIZAWA Y. 2001. Fibrillar collagen specifically regulates human vascular smooth muscle cell genes involved in cellular responses and the pericellular matrix environment. *Circ Res* 88: 460-467.
- IKEBE M, HARTSHORNE DJ AND ELZINGA M. 1987. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *J Biol Chem* 262: 9569-9573.
- INDOLFI C ET AL. 1997. Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nature medicine* 3: 775-779.
- INDOLFI C ET AL. 2000. 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. *J Am Coll Cardiol* 36: 288-293.
- 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: 231-241.
- ISHIKAWA Y AND HOMCY CJ. 1997. The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* 80: 297-304.
- JANAKIDEVI K, FISHER MA, DEL VECCHIO PJ, TIRUPPATHI C, FIGGE J AND MALIK AB. 1992. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 263: C1295-1301.
- JANG EK, DAVIDSON MM, 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. *American journal of physiology Cell physiology* 280: C22-33.

- JIN SL AND CONTI M. 2002. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7628-7633.
- JOHNSON-MILLS K, ARAUZ E, COFFEY R, KRZANOWSKI JR J AND POLSON J. 1998. Effect of CI-930 [3-(2H)-pyridazinone-4,5-dihydro-6-[4-(1H-imidazolyl) phenyl]-5-methyl-monohydrochloride] and rolipram on human coronary artery smooth muscle cell proliferation. *Biochemical Pharmacology* 56: 1065-1073.
- JOHNSON CP, BAUGH R, WILSON CA AND BURNS J. 2001. Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma. *Journal of clinical pathology* 54: 139-145.
- JOHNSON R, WEBB JG, NEWMAN WH AND WANG Z. 2006. Regulation of human vascular smooth muscle cell migration by beta-adrenergic receptors. *The American surgeon* 72: 51-54.
- JOUBERT F, WILDING JR, FORTIN D, DOMERGUE-DUPONT V, NOVOTOVA M, VENTURA-CLAPIER R AND VEKSLER V. 2008. Local energetic regulation of sarcolemmal and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 586: 5181-5192.
- JUREVICIUS J AND FISCHMEISTER R. 1996. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 295-299.
- KAKKAR R, RAJU RV AND SHARMA RK. 1999. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1). *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55: 1164-1186.
- 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: 890-894.
- KANWAR M, WALTER C, CLARKE M AND PATARROYO-APONTE M. 2016. Targeting heart failure with preserved ejection fraction: current status and future prospects. *Vascular health and risk management* 12: 129-141.
- KASUYA J, GOKO H AND FUJITA-YAMAGUCHI Y. 1995. Multiple transcripts for the human cardiac form of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* 270: 14305-14312.
- KATAKAMI N, KIM YS, KAWAMORI R AND YAMASAKI Y. 2010. The phosphodiesterase inhibitor cilostazol induces regression of carotid atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes mellitus: principal results of the Diabetic Atherosclerosis Prevention by Cilostazol (DAPC) study: a randomized trial. *Circulation* 121: 2584-2591.
- KAUMANN AJ. 1989. Is there a third heart beta-adrenoceptor? *Trends in pharmacological sciences* 10: 316-320.
- KAUMANN AJ, ENGELHARDT S, HEIN L, MOLENAAR P AND LOHSE M. 2001. Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double beta1/beta2-adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of beta1-adrenoceptors for putative beta4-adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363: 87-93.
- KAUMANN AJ AND MOLENAAR P. 1996. Differences between the third cardiac beta-adrenoceptor and the colonic beta 3-adrenoceptor in the rat. *Br J Pharmacol* 118: 2085-2098.
- KAUMANN AJ, PREITNER F, SARSERO D, MOLENAAR P, REVELLI JP AND GIACOBINO JP. 1998. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 53: 670-675.
- KAUPP UB AND SEIFERT R. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82: 769-824.
- 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: 164-167.
- KAYA AI, ONARAN HO, ÖZCAN G, AMBROSIO C, COSTA T, BALLI S AND UĞUR Ö. 2012. Cell Contact-dependent Functional Selectivity of β 2-Adrenergic Receptor Ligands in Stimulating cAMP Accumulation and Extracellular Signal-regulated Kinase Phosphorylation. *J Biol Chem* 287: 6362-6374.
- KEITH M, GERANMAYEGAN A, SOLE MJ, KURIAN R, ROBINSON A, OMRAN AS AND JEEJEEBOY KN. 1998. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 31: 1352-1356.
- KEMP CD AND CONTE JV. 2012. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 21: 365-371.
- KERAVIS T AND LUGNIER C. 2012. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* 165: 1288-1305.
- 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: 2338-2343.
- KISHI Y, ASHIKAGA T AND NUMANO F. 1992. Phosphodiesterases in vascular endothelial cells. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 25: 201-213.
- KITAZAWA T, ETO M, WOODSOME TP AND KHALEQUZZAMAN M. 2003. Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol* 546: 879-889.
- KIUCHI K, SATO N, SHANNON RP, VATNER DE, MORGAN K AND VATNER SF. 1993. Depressed beta-adrenergic receptor- and endothelium-mediated vasodilation in conscious dogs with heart failure. *Circ Res* 73: 1013-1023.
- KNUDSEN KA, FRANKOWSKI C, JOHNSON KR AND WHEELOCK MJ. 1998. A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *Journal of cellular biochemistry Supplement* 30-31: 168-176.
- 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: 459-470.
- KOCHER O AND GABBIANI G. 1986. Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Human pathology* 17: 875-880.
- KOMALAVILAS P AND LINCOLN TM. 1996. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* 271: 21933-21938.
- KOMAS N, LUGNIER C AND STOCLET JC. 1991. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 104.
- KOMORI K, LORENZ RR AND VANHOUTTE PM. 1988. Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *The American journal of physiology* 255: H207-212.
- KONISHI M AND SU C. 1983. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 5: 881-886.
- KONKAR AA, ZHAI Y AND GRANNEMAN JG. 2000. beta1-adrenergic receptors mediate beta3-adrenergic-independent effects of CGP 12177 in brown adipose tissue. *Mol Pharmacol* 57: 252-258.

- KOOISTRA MR, CORADA M, DEJANA E AND BOS JL. 2005. Epac1 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.
- 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: 265-276.
- 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 H, RAINES EW, BORNFELDT KE, ROBERTS JM AND ROSS R. 1996. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* 87: 1069-1078.
- KOYAMA N, KINSELLA MG, WIGHT TN, HEDIN U AND CLOWES AW. 1998. Heparan sulfate proteoglycans mediate a potent inhibitory signal for migration of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 305-313.
- KRIZMANICH WJ AND LEE RM. 1987. Scanning electron microscopy of vascular smooth muscle cells from rat muscular arteries. *Scanning microscopy* 1: 1749-1758.
- 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- or transporter-like structure. *Science* 244: 1558-1564.
- 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. *The American journal of cardiology* 74: 1133-1136.
- 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 Signal* 6: 363-392.
- LANDS AM, ARNOLD A, MCAULIFF JP, LUDUENA FP AND BROWN TG, JR. 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-598.
- LAVIE Y AND LISCOVITCH M. 2000. Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences. *Glycoconjugate journal* 17: 253-259.
- LEDOUX J, WERNER ME, BRAYDEN JE AND NELSON MT. 2006. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 21: 69-78.
- LEE SW ET AL. 2008. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARE-DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients). *J Am Coll Cardiol* 51: 1181-1187.
- LEES-MILLER JP, HEELEY DH AND SMILLIE LB. 1987. An abundant and novel protein of 22 kDa (SM22) is widely distributed in smooth muscles. Purification from bovine aorta. *The Biochemical journal* 244: 705-709.
- LEHNART SE, WEHRENS XHT, REIKEN S, WARRIER S, BELEVYCH AE, HARVEY RD, RICHTER W, JIN SLC, CONTI M AND MARKS AR. 2005. Phosphodiesterase 4D Deficiency in the Ryanodine-Receptor Complex Promotes Heart Failure and Arrhythmias. *Cell* 123: 25-35.
- 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: 126-135.

- LEMARIE CA, THARAUX PL AND LEHOUX S. 2010. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 48: 433-439.
- LEROY J, ABI-GERGES A, NIKOLAEV VO, RICHTER W, LECHENE P, MAZET JL, CONTI M, FISCHMEISTER R AND VANDECASTEELE G. 2008. Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca²⁺ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* 102: 1091-1100.
- LEUNG YK, DU J, HUANG Y AND YAO X. 2010. Cyclic nucleotide-gated channels contribute to thromboxane A₂-induced contraction of rat small mesenteric arteries. *PLoS One* 5: e11098.
- LI L, MIANO JM, CSERJESI P AND OLSON EN. 1996. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res* 78: 188-195.
- 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. *The Biochemical journal* 327 (Pt 3): 709-716.
- LIAU G, WINKLES JA, CANNON MS, KUO L AND CHILIAN WM. 1993. Dietary-induced atherosclerotic lesions have increased levels of acidic FGF mRNA and altered cytoskeletal and extracellular matrix mRNA expression. *Journal of vascular research* 30: 327-332.
- LIJNEN HR, VAN HOEF B, LUPU F, MOONS L, CARMELIET P AND COLLEN D. 1998. Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1035-1045.
- LINCOLN TM, CORNWELL TL AND TAYLOR AE. 1990. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in vascular smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 258: C399-407.
- LINDER AE, THAKALI KM, THOMPSON JM, WATTS SW, WEBB RC AND LEITE R. 2007. Methyl-beta-cyclodextrin prevents angiotensin II-induced tachyphylactic contractile responses in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 78-84.
- LINDHOLM LH, CARLBERG B AND SAMUELSSON O. 2005. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet* 366: 1545-1553.
- 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. *British Journal of Pharmacology* 125: 1501-1510.
- LIU H 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 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: 26615-26624.
- LOHSE MJ. 2010. Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr Opin Pharmacol* 10: 53-58.
- 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: 8558-8564.
- LOHSE MJ, BENOVIC JL, CARON MG AND LEFKOWITZ RJ. 1990. Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265: 3202-3211.

- LOUKIANOV E, LOUKIANOVA T AND PERIASAMY M. 1997. Myosin heavy chain isoforms in smooth muscle. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* 117: 13-18.
- LU Z, QU P, XU K AND HAN C. 1995. beta-Adrenoceptors in endothelium of rabbit coronary artery and alteration in atherosclerosis. *Biological signals* 4: 150-159.
- LUGNIER C. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics* 109: 366-398.
- 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.
- LUU TN, DASHWOOD MR, CHESTER AH, MUDDLE JR AND YACOUB MH. 1995. Calcitonin gene-related peptide in healthy and atheromatous human epicardial coronary arteries. Function and receptor characterization. *Journal of vascular research* 32: 93-99.
- LYMPEROPOULOS A, RENGO G AND KOCH WJ. 2013. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res* 113: 739-753.
- MAASS PG ET AL. 2015. PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nature genetics* 47: 647-653.
- MADER SL. 1992. Influence of Animal Age on the Beta-Adrenergic System in Cultured Rat Aortic and Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells. *J Gerontol* 47: B32-B36.
- MAGGI CA AND MELI A. 1988. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *General pharmacology* 19: 1-43.
- MAK DO, MCBRIDE S AND FOSKETT JK. 1998. Inositol 1,4,5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor Ca²⁺ channel by ligand tuning of Ca²⁺ inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15821-15825.
- MALINOWSKA B AND SCHLICKER E. 1996. Mediation of the positive chronotropic effect of CGP 12177 and cyanopindolol in the pithed rat by atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 117: 943-949.
- MALLAT Z ET AL. 2005. Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 46: 1249-1257.
- MANGANIELLO VC AND DEGERMAN E. 1999. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. *Thrombosis and haemostasis* 82: 407-411.
- MANN DL, KENT RL, PARSONS B AND COOPER GT. 1992. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 85: 790-804.
- MARIN J. 1993. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *Journal of autonomic pharmacology* 13: 127-176.
- MARX SO, TOTARY-JAIN H AND MARKS AR. 2011. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circulation Cardiovascular interventions* 4: 104-111.
- MASUDA J AND ROSS R. 1990. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 10: 178-187.

- 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: 1722-1728.
- MAURICE DH, CRANKSHAW D AND HASLAM RJ. 1991. Synergistic actions of nitrovasodilators and isoprenaline on rat aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 192: 235-242.
- 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, KE H, AHMAD F, WANG Y, CHUNG J AND MANGANIELLO VC. 2014. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 13: 290-314.
- 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.
- MCDANIEL NL, REMBOLD CM AND MURPHY RA. 1994. Cyclic nucleotide dependent relaxation in vascular smooth muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 72: 1380-1385.
- 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. *Clinical science* 113: 473-478.
- MCPHERSON GA. 1985. Analysis of radioligand binding experiments. A collection of computer programs for the IBM PC. *Journal of pharmacological methods* 14: 213-228.
- MCPHERSON GA, MOLENAAR P, MALTA E AND RAPER C. 1985. Influence of assay buffer on dissociation constants of drugs at beta-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 119: 93-100.
- MEANS AR, VANBERKUM MF, BAGCHI I, LU KP AND RASMUSSEN CD. 1991. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* 50: 255-270.
- MESSERLI FH AND GROSSMAN E. 2004. beta-Blockers in hypertension: is carvedilol different? *The American journal of cardiology* 93: 7B-12B.
- METRICH M, LUCAS A, GASTINEAU M, SAMUEL JL, HEYMES C, MOREL E AND LEZOUALC'H F. 2008. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 102: 959-965.
- MIANO JM, CSERJESI P, LIGON KL, PERIASAMY M AND OLSON EN. 1994. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circ Res* 75: 803-812.
- MIANO JM AND OLSON EN. 1996. Expression of the smooth muscle cell calponin gene marks the early cardiac and smooth muscle cell lineages during mouse embryogenesis. *J Biol Chem* 271: 7095-7103.
- MICHEL MC, BRODDE OE AND INSEL PA. 1990. Peripheral adrenergic receptors in hypertension. *Hypertension* 16: 107-120.
- MIKA D, LEROY J, VANDECASTEELE G AND FISCHMEISTER R. 2012. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 52: 323-329.
- MILLER VM AND VANHOUTTE PM. 1985. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *The American journal of physiology* 248: H432-437.
- 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: 223-224.
- 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: 50-56.

- 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: 663-665.
- MONTEZANO AC, TSIROPOULOU S, DULAK-LIS M, HARVEY A, CAMARGO LDE L AND TOUYZ RM. 2015. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* 24: 425-433.
- MOREL E, MARCANTONI A, GASTINEAU M, BIRKEDAL R, ROCHAIS F, GARNIER A, LOMPRES AM, VANDECASTEELE G AND LEZOUALC'H F. 2005. 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. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69: 247-266.
- MORISHITA R, HIGAKI J, MIYAZAKI M AND OGIHARA T. 1992. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 19: 1162-67.
- MORRELL NW ET AL. 2009. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54: S20-31.
- MOVAT HZ AND FERNANDO NV. 1963. The Fine Structure of the Terminal Vascular Bed. I. Small Arteries with an Internal Elastic Lamina. *Experimental and molecular pathology* 14: 549-563.
- MOVSESIAN MA. 2002. PDE3 cyclic nucleotide phosphodiesterases and the compartmentation of cyclic nucleotide-mediated signalling in cardiac myocytes. *Basic research in cardiology* 97 Suppl 1: 183-90.
- MUDERS F AND ELSNER D. 2000. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* 41: 605-612.
- MULVANY MJ. 2012. Small artery remodelling in hypertension. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 110: 49-55.
- MUNSON PJ AND RODBARD D. 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Analytical biochemistry* 107: 220-239.
- MUNZEL T, DAIBER A, ULLRICH V AND MULSCH A. 2005. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1551-1557.
- MURTHY KS AND MAKHLOUF GM. 1995. Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 268: C171-180.
- NAGEL DJ ET AL. 2006. Role of nuclear Ca²⁺/calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival. *Circ Res* 98: 777-784.
- NAKAKI T, OHTA M AND KATO R. 1991. Inhibition by prostacyclin and carbacyclins of endothelin-induced DNA synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 44: 237-239.
- 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. *Journal of Cardiac Failure* 7: 38-44.
- 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. *The American journal of physiology* 271: H2228-2237.

- 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. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 278: H168-H174.
- NEWBY AC AND ZALTSMAN AB. 2000. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 190: 300-309.
- NIKOLAEV VO, BÜNEMANN 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, GAMBARYAN S, ENGELHARDT S, WALTER U AND LOHSE MJ. 2005. Real-time Monitoring of the PDE2 Activity of Live Cells HORMONE-STIMULATED cAMP HYDROLYSIS IS FASTER THAN HORMONE-STIMULATED cAMP SYNTHESIS. *J Biol Chem* 280: 1716-1719.
- NIKOLAEV VO, MOSHKOV A, LYON AR, MIRAGOLI M, NOVAK P, PAUR H, LOHSE MJ, KORCHEV YE, HARDING SE AND GORELIK J. 2010. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* 327: 1653-1657.
- NINO PK ET AL. 2015. Phosphodiesterase 1 regulation is a key mechanism in vascular aging. *Clinical science* 129: 1061-1075.
- O'DONNELL SR AND WANSTALL JC. 1984. 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: 733-738.
- O'DONNELL SR AND WANSTALL JC. 1985. Responses to the beta 2-selective agonist procaterol of vascular and atrial preparations with different functional beta-adrenoceptor populations. *Br J Pharmacol* 84: 227-235.
- OKAMOTO T, SCHLEGEL A, SCHERER PE AND LISANTI MP. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273: 5419-5422.
- OMORI K AND KOTERA J. 2007. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100: 309-327.
- ORALLO F. 1996. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol Ther* 69: 153-171.
- ORIOWO MA. 1995. Different atypical beta-adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci* 56: PL269-275.
- 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: 1044-1050.
- 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: 381-387.
- 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.
- 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: 13373-13380.
- PAGANI ED, VANALLER GS, O'CONNOR B AND SILVER PJ. 1993. Reversal of nitroglycerin tolerance in vitro by the cGMP-phosphodiesterase inhibitor zaprinast. *Eur J Pharmacol* 243: 141-147.

- PALMER D AND 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.
- 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: 852-861.
- PALMER RM, 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: 827-835.
- PANZA JA, CASINO PR, KILCOYNE CM AND QUYYUMI AA. 1993. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87: 1468-1474.
- PARNELL E, SMITH BO, PALMER TM, TERRIN A, ZACCOLO M AND YARWOOD SJ. 2012. Regulation of the inflammatory response of vascular endothelial cells by EPAC1. *Br J Pharmacol* 166: 434-446.
- PARTON RG AND SIMONS K. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology* 8: 185-194.
- PATEL TB, DU Z, PIERRE S, CARTIN L AND SCHOLICH K. 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269: 13-25.
- PAVAN B, BIONDI C AND DALPIAZ A. 2009. Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug discovery today* 14: 982-991.
- PEDERSEN ME AND COCKCROFT JR. 2007. The vasodilatory beta-blockers. *Current hypertension reports* 9: 269-277.
- PHILLIPS PG, LONG L, WILKINS MR AND MORRELL NW. 2005. cAMP phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogs in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 288: L103-115.
- PIERCE KL, PREMONT RT AND LEFKOWITZ RJ. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews Molecular cell biology* 3: 639-650.
- POLSON JB AND STRADA SJ. 1996. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annual review of pharmacology and toxicology* 36: 403-427.
- POST SR, HAMMOND HK AND INSEL PA. 1999. Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39: 343-360.
- POULOS TL. 2006. Soluble guanylate cyclase. *Current opinion in structural biology* 16: 736-743.
- PREITNER F, MUZZIN P, REVELLI JP, SEYDOUX J, GALITZKY J, BERLAN M, LAFONTAN M AND GIACOBINO JP. 1998. Metabolic response to various beta-adrenoceptor agonists in beta3-adrenoceptor knockout mice: evidence for a new beta-adrenergic receptor in brown adipose tissue. *Br J Pharmacol* 124: 1684-1688.
- 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 : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 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. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 283: H346-352.

- 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: 3639-3650.
- RALL TW AND SUTHERLAND EW. 1962. Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 237: 1228-1232.
- RAMPERSAD SN, OVENS JD, HUSTON 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 vascular endothelial cadherin (VE-Cad)-based signaling complex and controls cAMP-mediated vascular permeability. *J Biol Chem* 285: 33614-33622.
- 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: 1528-1538.
- REMBOLD CM. 1992. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* 20: 129-137.
- RENSEN SSM, DOEVENDANS PAFM AND EYS GJMV. 2007. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal* 15.
- 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: 1046-1053.
- RICHARD V, VERCAUTEREN M, GOMEZ É AND THUILLEZ C. 2009. Nouvelles voies pharmacologiques dans l'insuffisance cardiaque : faut-il traiter l'endothélium ? *Thérapie* 64: 93-100.
- RICHTER W ET AL. 2008. Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *The EMBO journal* 27: 384-393.
- ROBERTS OL, KAMISHIMA T, BARRETT-JOLLEY R, QUAYLE JM AND DART C. 2013. Exchange protein activated by cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in rat mesenteric artery. *J Physiol* 591: 5107-5123.
- RODMAN DM ET AL. 2005. Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res* 96: 864-872.
- RODRIGUES GJ, RESTINI CB, LUNARDI CN, NETO MDOS A, MOREIRA JE AND BENDHACK LM. 2010. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. *Eur J Pharmacol* 627: 251-257.
- ROKOLYA A AND SINGER HA. 2000. Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle. *American journal of physiology Cell physiology* 278: C537-545.
- RONG JX, BERMAN JW, TAUBMAN MB AND FISHER EA. 2002. Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1617-1623.
- ROQUE M, KIM WJ, GAZDOIN M, MALIK A, REIS ED, FALLON JT, BADIMON JJ, CHARO IF AND TAUBMAN MB. 2002. CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 554-559.
- ROSCIONI SS, MAARSINGH H, ELZINGA CR, SCHUUR J, MENZEN M, HALAYKO AJ, MEURS H AND SCHMIDT M. 2011. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. *Journal of cellular and molecular medicine* 15: 1551-1563.

- ROSE RJ, LIU H, PALMER D AND MAURICE DH. 1997. Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. *British Journal of Pharmacology* 122: 233-240.
- ROSE SL AND BABENSEE JE. 2007. Complimentary endothelial cell/smooth muscle cell co-culture systems with alternate smooth muscle cell phenotypes. *Annals of biomedical engineering* 35: 1382-1390.
- ROSENBAUM DM, RASMUSSEN SG AND KOBILKA BK. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363.
- ROSS R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
- ROZEC B AND GAUTHIER C. 2006. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther* 111: 652-673.
- 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: 351-359.
- RUZICKA DL AND SCHWARTZ RJ. 1988. Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. *The Journal of cell biology* 107: 2575-2586.
- 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. *Journal of Clinical Investigation* 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: 151-157.
- 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: 895-905.
- SALAHPOUR A, ANGERS S AND BOUVIER M. 2000. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 11: 163-168.
- SAMAHA FF, IP HS, MORRISEY EE, SELTZER J, TANG Z, SOLWAY J AND PARMACEK MS. 1996. Developmental pattern of expression and genomic organization of the calponin-h1 gene. A contractile smooth muscle cell marker. *J Biol Chem* 271: 395-403.
- 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.
- SANCHEZ O, MARCOS E, PERROS F, FADEL E, TU L, HUMBERT M, DARTEVELLE P, SIMONNEAU G, ADNOT S AND EDDAHIBI S. 2007. Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 176: 1041-1047.
- 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: 2659-2670.

- SARZANI R, BRECHER P AND CHOBANIAN AV. 1989. Growth factor expression in aorta of normotensive and hypertensive rats. *J Clin Invest* 83: 1404-1408.
- SASSI Y 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.
- 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: 505-510.
- SCHIFFRIN EL. 2005. Vascular endothelin in hypertension. *Vascular pharmacology* 43: 19-29.
- SCHUETZ JD, CONNELLY MC, SUN D, PAIBIR SG, FLYNN PM, SRINIVAS RV, KUMAR A AND FRIDLAND A. 1999. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature medicine* 5: 1048-1051.
- SEIFERT R, WENZEL-SEIFERT K, GETHER U AND KOBILKA BK. 2001. Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 1218-1226.
- SHANAHAN CM, CARY NR, METCALFE JC AND WEISSBERG PL. 1994. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 93: 2393-2402.
- SHEN B, CHENG KT, LEUNG YK, KWOK YC, KWAN HY, WONG CO, CHEN ZY, HUANG Y AND YAO X. 2008. Epinephrine-induced Ca²⁺ influx in vascular endothelial cells is mediated by CNGA2 channels. *J Mol Cell Cardiol* 45: 437-445.
- SHEN J, YANG M, JU D, JIANG H, ZHENG JP, XU Z AND LI L. 2010. Disruption of SM22 promotes inflammation after artery injury via nuclear factor kappaB activation. *Circ Res* 106: 1351-1362.
- 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 pharmacologica Sinica* 29: 185-192.
- SHMIGOL AV, EISNER DA AND WRAY S. 1998. Properties of voltage-activated [Ca²⁺]_i transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. *J Physiol* 511 (Pt 3): 803-811.
- SILVER PJ, SCHMIDT-SILVER C AND DISALVO J. 1982. beta-Adrenergic relaxation and cAMP kinase activation in coronary arterial smooth muscle. *The American journal of physiology* 242: H177-184.
- SILVER PJ, WALUS K AND DISALVO J. 1984. Adenosine-mediated relaxation and activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in coronary arterial smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 228: 342-347.
- SKALHEGG BS AND TASKEN K. 2000. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 5: D678-693.
- SLATER SC, KOUTSOUKI E, JACKSON CL, BUSH RC, ANGELINI GD, NEWBY AC AND GEORGE SJ. 2004. R-Cadherin:β-Catenin Complex and Its Association With Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1204-1210.
- SMITH SJ, BROOKES-FAZAKERLEY S, DONNELLY LE, BARNES PJ, BARNETTE MS AND GIEMBYCZ MA. 2003. Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 284: L279-289.
- 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: 211-212.
- 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: 857-866.
- STEGEMANN JP, HONG H AND NEREM RM. 2005. Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *Journal of applied physiology* 98: 2321-2327.
- STEINBERG MS AND MCNUTT PM. 1999. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 554-560.
- STEINBERG SF. 2004. beta(2)-Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts. *J Mol Cell Cardiol* 37: 407-415.
- STJARNE L, LUNDBERG JM AND ASTRAND P. 1986. Neuropeptide Y--a cotransmitter with noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate in the sympathetic nerves of the mouse vas deferens? A biochemical, physiological and electropharmacological study. *Neuroscience* 18: 151-166.
- 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: 106-115.
- STOFFEL RH, 3RD, PITCHER JA AND LEFKOWITZ RJ. 1997. Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. *The Journal of membrane biology* 157: 1-8.
- SUKHOVA GK, SHI GP, SIMON DI, CHAPMAN HA AND LIBBY P. 1998. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 102: 576-583.
- SUN D, HUANG A, ZHAO G, BERNSTEIN R, FORFIA P, XU X, KOLLER A, KALEY G AND HINTZE TH. 2000. Reduced NO-dependent arteriolar dilation during the development of cardiomyopathy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 278: H461-468.
- SUNAHARA RK, DESSAUER CW AND GILMAN AG. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 36: 461-480.
- SUNAHARA RK AND TAUSSIG R. 2002. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Molecular interventions* 2: 168-184.
- SUTHERLAND EW AND RALL TW. 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232: 1077-1091.
- 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.
- SZEPETIUK G, PIERARD-FRANCHIMONT C, QUATRESOOZ P AND PIERARD GE. 2012. [Physico-biological foundation of skin fluorescence--review]. *Pathologie-biologie* 60: 380-386.
- 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 and vessels* 16: 249-256.
- TAKEICHI M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59: 237-252.
- 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: 313-320.

- TANI E, YAMAGATA S AND ITO Y. 1977. Cell membrane structure of vascular smooth muscle of circle of Willis. *Cell and tissue research* 179: 131-142.
- TASKEN K AND AANDAHL EM. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 84: 137-167.
- TAYLOR SS, BUECHLER JA AND YONEMOTO W. 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59: 971-1005.
- TERRIN A ET AL. 2006. PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases. *The Journal of cell biology* 175: 441-451.
- THAKUR NK, HAYASHI T, SUMI D, KANO H, MATSUI-HIRAI H, TSUNEKAWA T AND IGUCHI A. 2002. Anti-atherosclerotic effect of beta-blocker with nitric oxide-releasing action on the severe atherosclerosis. *Journal of cardiovascular pharmacology* 39: 298-309.
- 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. *The Journal of surgical research* 59: 337-343.
- 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. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 83: 215-242.
- THYBERG J. 2000. Differences in caveolae dynamics in vascular smooth muscle cells of different phenotypes. *Lab Invest* 80: 915-929.
- 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: 966-990.
- THYBERG J, ROY J, TRAN PK, BLOMGREN K, DUMITRESCU A AND HEDIN U. 1997. Expression of caveolae on the surface of rat arterial smooth muscle cells is dependent on the phenotypic state of the cells. *Lab Invest* 77: 93-101.
- 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.
- TODA N. 2003. Vasodilating beta-adrenoceptor blockers as cardiovascular therapeutics. *Pharmacol Ther* 100: 215-234.
- 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: 344-352.
- TRAN PK, TRAN-LUNDMARK K, SOININEN R, TRYGGVASON K, THYBERG J AND HEDIN U. 2004. Increased intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation in transgenic mice with heparan sulfate-deficient perlecan. *Circ Res* 94: 550-558.
- TREASURE CB, KLEIN JL, VITA JA, MANOUKIAN SV, RENWICK GH, SELWYN AP, GANZ P AND ALEXANDER RW. 1993. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation* 87: 86-93.
- TROCHU J-N, LEBLAIS V, RAUTUREAU Y, BÉVÉRELLI 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. *British Journal of Pharmacology* 128: 69-76.
- TURLEY EA. 2001. Extracellular matrix remodeling: multiple paradigms in vascular disease. *Circ Res* 88: 2-4.

- VALLOT O, COMBETTES L, JOURDON P, INAMO J, MARTY I, CLARET M AND LOMPRÉ AM. 2000. Intracellular Ca(2+) handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1225-1235.
- VAN AUBEL RA, SMEETS PH, PETERS JG, BINDELS RJ AND RUSSEL FG. 2002. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 13: 595-603.
- 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. *The Journal of cell biology* 134: 401-411.
- VANHOUTTE PM. 1989. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension* 13: 658-667.
- VANHOUTTE PM, FELETOU M AND TADDEI S. 2005. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 144: 449-458.
- VANHOUTTE PM, ZHAO Y, XU A AND LEUNG SW. 2016. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res* 119: 375-396.
- VARIN R, MULDER P, RICHARD V, TAMION F, DEVAUX C, HENRY JP, LALLEMAND F, LEREBOURS G AND THUILLEZ C. 1999. Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress. *Circulation* 99: 2951-2957.
- VARIN R, MULDER P, TAMION F, RICHARD V, HENRY JP, LALLEMAND F, LEREBOURS G AND THUILLEZ C. 2000. Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure : role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress, and bradykinin. *Circulation* 102: 351-356.
- WANG J, SEYEDI N, XU XB, WOLIN MS AND HINTZE TH. 1994. Defective endothelium-mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure. *The American journal of physiology* 266: H670-680.
- WANG X, HU G, BETTS C, HARMON EY, KELLER RS, VAN DE WATER L AND ZHOU J. 2011. Transforming growth factor-beta1-induced transcript 1 protein, a novel marker for smooth muscle contractile phenotype, is regulated by serum response factor/myocardin protein. *J Biol Chem* 286: 41589-41599.
- 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. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 281: H1545-1552.
- 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.
- WIELINGA PR, VAN DER HEIJDEN I, REID G, BEIJNEN JH, WIJNHOLDS J AND BORST P. 2003. Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem* 278: 17664-17671.
- WILLIAMS B. 1998. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *Journal of hypertension* 16: 1921-1929.
- WILLIAMS B, POULTER NR, BROWN MJ, DAVIS M, MCINNES GT, POTTER JF, SEVER PS, THOM SM AND BHS GUIDELINES WORKING PARTY FTBHS. 2004. British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. *Bmj* 328: 634-640.
- WILLIAMS C AND WICK TM. 2005. Endothelial cell-smooth muscle cell co-culture in a perfusion bioreactor system. *Annals of biomedical engineering* 33: 920-928.
- WILLIAMS TM AND LISANTI MP. 2004. The caveolin proteins. *Genome biology* 5: 214.

- 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: 16285-16296.
- WOLINSKY H AND GLAGOV S. 1967. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res* 20: 409-421.
- WOODCOCK-MITCHELL J, MITCHELL JJ, LOW RB, KIENY M, SENDEL 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; research in biological diversity* 39: 161-166.
- 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: 34496-34504.
- WU S, MOORE TM, BROUGH GH, WHITT SR, CHINKERS M, LI M AND STEVENS T. 2000. Cyclic nucleotide-gated channels mediate membrane depolarization following activation of store-operated calcium entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 18887-18896.
- WU X, HAYSTEAD TA, NAKAMOTO RK, SOMLYO AV AND SOMLYO AP. 1998. Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J Biol Chem* 273: 11362-11369.
- XIANG Y, NARO F, ZOUDILOVA M, JIN SL, CONTI M AND KOBILKA B. 2005. Phosphodiesterase 4D is required for beta2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 909-914.
- XIAO RP, JI X AND LAKATTA EG. 1995. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47: 322-329.
- YAMADA E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1: 445-458.
- YAN C. 2015. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 and vascular aging. *Clinical science* 129: 1077-1081.
- YAN C, MILLER CL AND ABE J. 2007. Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res* 100: 489-501.
- 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. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67: 973-979.
- YAO X, LEUNG PS, KWAN HY, WONG TP AND FONG MW. 1999. Rod-type cyclic nucleotide-gated cation channel is expressed in vascular endothelium and vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 41: 282-290.
- YOKOYAMA U ET AL. 2008. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 295: H1547-1555.
- 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 and vessels* 11: 229-233.
- ZACCOLO M AND MOVSESIAN MA. 2007. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 100: 1569-1578.

- 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 Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem* 277: 31249-31256.
- ZELIS R AND FLAIM SF. 1982. Alterations in vasomotor tone in congestive heart failure. *Progress in cardiovascular diseases* 24: 437-459.
- ZEMPO N, KENAGY RD, AU YP, BENDECK M, CLOWES MM, REIDY MA AND CLOWES AW. 1994. Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *Journal of vascular surgery* 20: 209-217.
- ZHAI K, HUBERT F, NICOLAS V, JI G, FISCHMEISTER R AND LEBLAIS V. 2012. β -Adrenergic cAMP Signals Are Predominantly Regulated by Phosphodiesterase Type 4 in Cultured Adult Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *PLoS ONE* 7.
- 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. *American journal of physiology Cell physiology* 283: C1080-1089.
- ZHAO H, GUAN Q, SMITH CJ AND QUILLEY J. 2008. Increased phosphodiesterase 3A/4B expression after angioplasty and the effect on VASP phosphorylation. *European Journal of Pharmacology* 590: 29-35.
- ZIEBA BJ ET AL. 2011. The cAMP-responsive Rap1 Guanine Nucleotide Exchange Factor, Epac, Induces Smooth Muscle Relaxation by Down-regulation of RhoA Activity. *J Biol Chem* 286: 16681-16692.

ANNEXES

I. Article 3 : *"Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension"*

Antigny F, Hautefort A, Meloche J, **Belacel-Ouari M**, Boris M, Rucker-Martin C, Péchoux C, Potus F, Nadeau V, Tremblay V, Ruffenach G, Bourgeois A, Dorfmueller P, Breuils-Bonnet S, Fadel E, Ranchoux B, Jourdon P, Girerd B, Montani D, Provencher S, Bonnet S, Simonneau G, Humbert M, Perros F.

Circulation. 133(14): 1371-85, 2016

Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension

Fabrice Antigny, PhD; Aurélie Hautefort, MSc; Jolyane Meloche, MSc; Milia Belacel-Ouari, MSc; Boris Manoury, PhD; Catherine Rucker-Martin, PhD; Christine Péchoux, PhD; François Potus, MSc; Valérie Nadeau, MSc; Eve Tremblay, MSc; Grégoire Ruffenach, MSc; Alice Bourgeois, MSc; Peter Dorfmueller, MD, PhD; Sandra Breuils-Bonnet, PhD; Elie Fadel, MD, PhD; Benoît Ranchoux, PhD; Philippe Jourdon, PhD; Barbara Girerd, PhD; David Montani, MD, PhD; Steeve Provencher, MD; Sébastien Bonnet, PhD; Gérald Simonneau, MD; Marc Humbert, MD, PhD; Frédéric Perros, PhD

Background—Mutations in the *KCNK3* gene have been identified in some patients suffering from heritable pulmonary arterial hypertension (PAH). *KCNK3* encodes an outward rectifier K⁺ channel, and each identified mutation leads to a loss of function. However, the pathophysiological role of potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) in PAH is unclear. We hypothesized that loss of function of KCNK3 is a hallmark of idiopathic and heritable PAH and contributes to dysfunction of pulmonary artery smooth muscle cells and pulmonary artery endothelial cells, leading to pulmonary artery remodeling; consequently, restoring KCNK3 function could alleviate experimental pulmonary hypertension (PH).

Methods and Results—We demonstrated that KCNK3 expression and function were reduced in human PAH and in monocrotaline-induced PH in rats. Using a patch-clamp technique in freshly isolated (not cultured) pulmonary artery smooth muscle cells and pulmonary artery endothelial cells, we found that KCNK3 current decreased progressively during the development of monocrotaline-induced PH and correlated with plasma-membrane depolarization. We demonstrated that KCNK3 modulated pulmonary arterial tone. Long-term inhibition of KCNK3 in rats induced distal neomuscularization and early hemodynamic signs of PH, which were related to exaggerated proliferation of pulmonary artery endothelial cells, pulmonary artery smooth muscle cell, adventitial fibroblasts, and pulmonary and systemic inflammation. Lastly, in vivo pharmacological activation of KCNK3 significantly reversed monocrotaline-induced PH in rats.

Conclusions—In PAH and experimental PH, KCNK3 expression and activity are strongly reduced in pulmonary artery smooth muscle cells and endothelial cells. KCNK3 inhibition promoted increased proliferation, vasoconstriction, and inflammation. In vivo pharmacological activation of KCNK3 alleviated monocrotaline-induced PH, thus demonstrating that loss of KCNK3 is a key event in PAH pathogenesis and thus could be therapeutically targeted. (*Circulation*. 2016;133:1371-1385. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951.)

Key Words: cell proliferation ■ electrophysiology ■ hypertension, pulmonary ■ ion channels ■ pulmonary artery

Pulmonary artery (PA) hypertension (PAH) is a severe and progressive condition characterized by increased mean pulmonary arterial pressure >25 mmHg at rest, with a

normal PA wedge pressure in the absence of chronic respiratory, cardiac, or thromboembolic disease.¹ PAH is a complex disease associated with endothelial cell (EC) dysfunction and

Received January 30, 2015; accepted February 12, 2016.

From Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, Kremlin-Bicêtre, France (F.A., A.H., C.R.-M., P.D., E.F., B.R., P.J., B.G., D.M., G.S., M.H., F.P.); AP-HP, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Département Hospitalo-Universitaire Thorax Innovation, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France (F.A., A.H., C.R.-M., P.D., E.F., B.R., P.J., B.G., D.M., G.S., M.H., F. Perros); UMRS 999, INSERM and Université Paris-Sud, Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France (F.A., A.H., C.R.-M., P.D., E.F., B.R., P.J., B.G., D.M., G.S., M.H., F. Perros); Inserm, UMR S1180, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, Département Hospitalo-Universitaire TORINO, Châtenay-Malabry, France (M.B.-O., B.M.); Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada (J.M., F. Potus, V.N., E.T., G.R., A.B., S.B.-B., S.P., S.B., F. Perros); INRA, UMR1313 Génétique Animale Biologie Intégrative, Equipe Plateforme MET-MIMA2-78352 Jouy-en-Josas, France (C.P.); and Service de Chirurgie Thoracique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France (E.F.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951/-/DC1>.

Correspondence to Fabrice Antigny, PhD, INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, 133 Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France. E-mail fabrice.antigny@u-psud.fr

© 2016 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951

endothelial-to-mesenchymal transition, endothelial and pulmonary arterial smooth muscle cell (PASMC) proliferation, pulmonary vasoconstriction, and inflammation. The nature of the initial trigger that promotes pulmonary vascular cell proliferation is still unclear. During the last decade, genetic studies have identified several predisposing genes associated with PAH, mainly within the transforming growth factor- β signaling pathway.²

Clinical Perspective on p 1385

Recently, using whole-exome sequencing, Ma and colleagues³ identified *KCNK3* (which codes for the potassium channel subfamily K member 3) as a new predisposing gene for PAH. *KCNK3* mutations were identified in 2 of 92 unrelated patients (3.2%) with familial PAH and in 3 of 230 patients (1.3%) with sporadic PAH. PAH caused by a *KCNK3* mutation is an autosomal-dominant disease with incomplete penetrance, as has been previously described for *BMPR2* mutations. A *KCNK3* mutation causes the first channelopathy identified in PAH.⁴

The *KCNK3* gene encodes for an outward K⁺ channel characterized by the presence of 4 transmembrane domains and 2 pore domains per subunit⁵ and is a member of 2-pore-domain K⁺ channels (K2P). *KCNK3*, also called Twik-related acid-sensitive K⁺ channel (TASK1), shares several characteristics with the background K⁺ current, including minimal voltage sensitivity, extracellular pH sensitivity, resistance to classic K⁺ channel inhibitors, and insensitivity to cytoplasmic Ca²⁺.⁶ Electrophysiological experiments have demonstrated a loss of function in all identified mutations of the channel.³ However, additional experiments are required to decipher the pathophysiological role of *KCNK3* channels in the development of nonheritable forms of PAH.

In the present study, we investigated the expression and function of *KCNK3* in patients with idiopathic PAH (iPAH) and heritable PAH (hPAH) who do not carry PAH-causing mutations by assessing the associated biochemical and molecular biology. We also evaluated the role of *KCNK3* in the development of pulmonary hypertension (PH) using the well-established PH rat model induced by monocrotaline exposure (MCT-PH). We measured the involvement of *KCNK3* in pulmonary arterial tone using organ bath studies. We analyzed the consequences of long-term in vivo inhibition of *KCNK3* in rats using a selective *KCNK3* channel blocker (ie, A293, Sanofi, France) at the pulmonary vascular level.

Our overall hypothesis is that loss of function of *KCNK3* is a hallmark for all forms of PH and contributes to PASMC and PAEC dysfunction and that stimulating *KCNK3* function in vivo with ONO-RS-082³ could alleviate experimental PH.

Methods

The online-only Data Supplement provides further details of our methods, including the suppliers and chemicals used.

Patients

Human lung specimens were obtained at the time of lung transplantation from 11 patients with PAH and at the time of a lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from 12 control subjects. PAH patients underwent genetic counseling and gave their written informed consent for genetic analysis. Five patients with PAH were carriers of *BMPR2* mutations (p.Arg321X, p.Arg491Trp, p.Tyr113X,

deletion of exon 3, and a splice defect in intron 3: c.418+3A>T) and corresponded to hPAH. No *BMPR2* mutations were identified in 6 patients, who were also included in the genome-wide association study analysis of Ma and collaborators,³ and were not carriers of a *KCNK3* mutation. These patients corresponded to iPAH. In the lung specimens from control subjects, pulmonary arteries were studied at a distance from tumor areas. Transthoracic echocardiography was performed preoperatively in control subjects to rule out PH. The patients studied were part of the French Network on Pulmonary Hypertension, a program approved by our institutional Ethics Committee, who had given their written informed consent (protocol N8CO-08-003, ID RCB: 2008-A00485-50, approved June 18, 2008).

Materials

Tetraethylammonium, glibenclamide, Bay-K8644, papain, dithiothreitol, and monocrotaline were obtained from Sigma. ONO-RS-082 was obtained from EnzoLife Sciences. U44619 was purchased from Interchim. The selective blocker of *KCNK3*, A293 (2-(butane-1-sulfonyl-amino)-N-[1-(R)-(6-methoxypyridin-3-yl)-propyl]-benzamide, was kindly provided by Sanofi-Aventis.⁷

Hemodynamic Measurements, Evaluation of Right Ventricular Hypertrophy, and Tissue Collection

Rats were anesthetized with isoflurane (Minerve, Esternay, France). Hemodynamic measurements were recorded as previously described.⁸ For the Fulton index of right ventricular (RV) hypertrophy, the ratio of RV weight to left ventricular plus septum weight was calculated.

Isolation of PASMCs

Hearts and lungs were rapidly excised into ice-cold physiological Ca²⁺-free Hanks media. First- to third-order intrapulmonary arteries, with diameters between 2 and 0.2 mm, were dissected; the endothelium of vessels was disrupted by rubbing the luminal surface with a cotton swab; the fibroblast-containing adventitial layer was removed; and the media containing PASMC was dissociated with a cocktail containing papain, dithiothreitol, and BSA, as previously described by Hong et al.⁹

Isolation of PAECs

After dissection of the pulmonary arteries, PAECs were enzymatically dissociated according to an adapted protocol previously described by Paffett et al.¹⁰

Electrophysiological Recordings

K⁺ currents were recorded with the whole-cell patch-clamp technique at room temperature (22°C–24°C) in normoxic conditions with an Axopatch 200B amplifier, a Digidata 1440A, and pClamp 10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Borosilicate glass pipettes (Harvard Apparatus) were pulled with a Sutter puller and fire polished; they had a resistance of 3 to 5 Mega Ω . The pipette solution contained (in mmol/L) 130 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.2 (adjusted with KOH). The bath solution contained (in mmol/L) 124 NaCl, 5 KCl, 0.5 NaH₂PO₄, 0.5 KH₂PO₄, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose, pH 7.4 (adjusted with NaOH). Cell capacitances (9–15 pF for PASMCs and 4–5 pF for PAECs) were obtained for each cell measured, and the current was normalized to the cell capacitance.

The cell was clamped at 0 mV for 3 minutes, allowing I_{KV} inactivation. The residual steady-state current was measured as the noninactivating current, I_{KN} . The *KCNK3* current was recorded by applying a 1.2-second voltage ramp from 60 mV to –100 mV. I_{KV} was elicited by applying a 400-millisecond voltage step to 0 mV from a holding potential of –40 mV. Then, we applied A293 (*KCNK3* inhibitor) and measured the A293-sensitive current corresponding to I_{KCNK3} . Resting membrane potentials (E_m) were assessed with the current clamp ($I=0$) mode. The junction potential of ≈ 4.6 mV between the pipette and bath solution was corrected offline.

Isometric Tension Measurement

Contractile responses of the intrapulmonary artery were measured with a small-vessel wire myograph (Danish Myotechnology, Aarhus, Denmark), as reported previously.¹¹ Briefly, second-order

intrapulmonary arterial segments (length, 1.4–2 mm) were mounted on the jaws of the myograph using a 25- μ m-diameter tungsten wire. Data acquisition was performed with PowerLab 8/30 and LabChart Pro version 7.1 software (AD Instrument). The protocols are detailed in the online-only Data Supplement.

Quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted with the classic Trizol procedure. One μ g total RNA was reverse-transcribed with a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). For gene expression quantification, we used Applied Biosystems TaqMan gene expression assays with the TaqMan Universal PCR Master Mix. The results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The primers used in this study are listed in Table I in the online-only Data Supplement.

Multiplex Data

We performed simultaneous quantification of recognized serum biomarkers of cardiovascular diseases in sera from rats using the Millipore Milliplex (RV1MAG-26K and RV2MAG-26K, Millipore, Molsheim, France). Data were analyzed with Bioplex manager software, version 6.1 (Biorad), at Plate-forme Cardiex-Therassay (University of Nantes, Nantes, France).

Western Blot Analysis

Human or rat lung tissue samples were prepared as previously described.¹² The Western blot protocol is described in the online-only Data Supplement.

Immunofluorescence Staining

Frozen lungs were prepared as previously described.¹³ Immunofluorescence labeling is described in the online-only Data Supplement.

Statistical Analyses

Data are expressed as the mean \pm SEM of n observations. Comparisons were made with the Mann-Whitney (comparison between 2 groups) or Kruskal-Wallis test (comparison between >2 groups). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. All statistical tests were performed with GraphPad Prism software (GraphPad, version 6.0 for Windows).

Results

KCNK3 Is Functionally Expressed in Freshly Isolated (Noncultured) PSMCs From Control Rats

Multiple immunofluorescence labeling revealed that KCNK3 was expressed in situ in PSMCs and PAECs (Figure 1A) and was maintained in freshly isolated PSMCs from control rats (Figure 1B).

Whole-cell patch-clamp experiments to measure endogenous KCNK3 current in isolated rat PSMCs showed that the KCNK3 channel was insensitive to standard K^+ channel blockers (tetraethylammonium and glibenclamide).¹⁴ PSMCs were clamped at 0 mV for 3 minutes to inactivate the voltage-dependent K^+ channels (K_v). We then applied a voltage ramp protocol between 60 and -100 mV for 100 milliseconds, as shown in Figure 1C. Residual K_v and KATP channels were inhibited by simultaneous applications of tetraethylammonium (10 mmol/L, general K^+ channel blockers) and glibenclamide (10 μ mol/L, K_{ATP} channel blocker). In agreement with the KCNK3 channel properties,¹⁵ the K^+ current was blocked by decreasing external pH to 6.3, whereas an external pH of 8.3 highly increased the current. This effect was reversed by returning to the external solution pH to 7.3 (Figure 1C and 1D).

KCNK3 Current and KCNK3 Expression Decreased Progressively During the Development of PH

MCT-PH is the standard model for severe PH. The progressive neomuscularization and obstruction of precapillary resistance in arteries that occurred in the MCT-PH rat model led to a delayed and progressive increase in mean pulmonary arterial pressure and RV hypertrophy, as measured by the Fulton index, developing 14 days after monocrotaline exposure and becoming established and severe by day 21 (Figure 2A and 2B).

To discriminate the KCNK3 current, we measured the difference in K^+ current at external pH values of 8.3 and 6.3. We named this current the acidic- K^+ -sensitive current. Our results showed a progressive decrease in the acidic- K^+ -sensitive current with the change in PH (ie, at 7, 14, and 21 days after exposing Wistar rats to monocrotaline). At 7 days after exposure to MCT, the acidic- K^+ -sensitive current was significantly reduced by 30%; it was reduced by 80% at 14 days and by 90% at 21 days (Figure 2C and 2D).

Expression of lung KCNK3 protein was reduced by 80% to 90% at 14 and 21 days after monocrotaline exposure (Figure 2E and 2F). However, it was not affected at 7 days even though the acidic current was already significantly reduced at this early time point. Moreover, transcription of KCNK3 was also impaired by 80% in isolated PAs (not shown), whereas the KCNK3 mRNA level was normal in pulmonary veins (not shown).

Using the current clamp mode, we measured significant and progressive depolarization of the resting membrane potential (E_m). E_m values were -35 ± 1.52 , -26 ± 4.0 , -20 ± 1.1 , and -21.6 ± 2.6 mV in the controls at 7, 14, and 21 days after monocrotaline exposure, respectively (Figure 2G).

Decreased KCNK3 function/expression was also observed in another strain of rats, Sprague-Dawley rats. In Sprague-Dawley rats, the acidic- K^+ -sensitive current was reduced by 62% and 85% at 7 and 21 days, respectively, after monocrotaline exposure (Figure 2H). KCNK3 protein level was also reduced by 90% in Sprague-Dawley rats after monocrotaline exposure (Figure 2I). Surprisingly, the acidic- K^+ -sensitive current was 2-fold higher in PSMCs from Sprague-Dawley rats compared with Wistar rats, which could be explained by the differential expression of TASK2, another pH-sensitive channel (Figure I in the online-only Data Supplement).

Moreover, we confirmed (by immunostaining) the plasma-membrane localization of KCNK3 in freshly isolated PAECs. Isolated PAECs were positive for the EC marker CD31 (Figure 2J), positive for von Willebrand factor, and negative for α -smooth-muscle actin (not shown). To measure KCNK3 current specifically in isolated PAECs, we previously labeled ECs with a Dylight 594-conjugated tomato lectin from *Lycopersicon esculentum* (a specific marker for EC). At 7 days after monocrotaline exposure, the acidic- K^+ -sensitive current was reduced by 80% (Figure 2K) and was associated with membrane depolarization (-26.6 ± 1.38 mV in controls versus -18.7 ± 2.8 mV after monocrotaline exposure; Figure 2L).

Correlative electron microscopy experiments performed on controls or MCT-PH lung samples from rats nicely

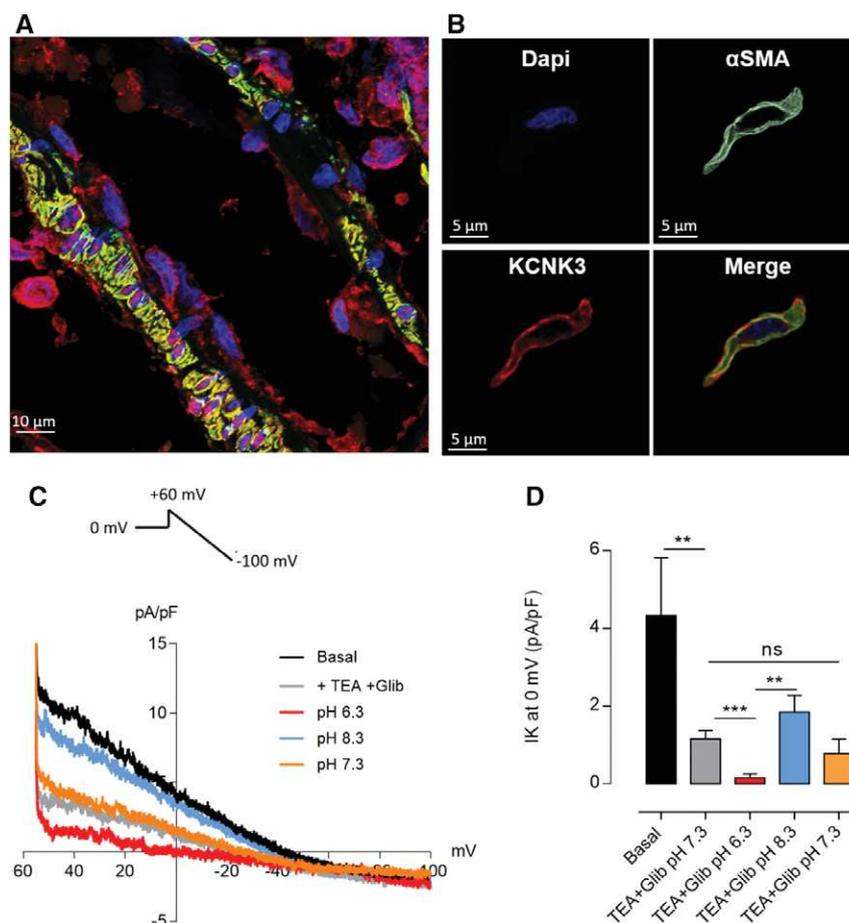


Figure 1. Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) is functionally expressed in freshly isolated (noncultured) pulmonary artery (PA) smooth muscle cells (PASCs) from control rats. **A**, Localization by immunofluorescence labeling and confocal imaging of KCNK3 in PAs from control rat lungs. KCNK3 expression and α -smooth-muscle actin (α -SMA) expression are shown in red and green, respectively, and nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bar, 10 μ m. **B**, Localization of KCNK3 by immunofluorescence labeling in freshly isolated PASCs from control rats. α -SMA expression and KCNK3 expression are shown in green and red, respectively, and nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bar, 5 μ m. **C**, Typical current-voltage relationship corresponding to recordings from a 1.2-second voltage ramp protocol (60 to -100 mV) from a holding potential of 0 mV and maintained for 3 minutes. Current was sequentially recorded (1) under basal conditions (black curve) and in the presence of (2) tetraethyl-ammonium (TEA) plus glibenclamide (Glib; 10 mmol/L and 10 μ mol/L, respectively) at pH 7.3 (gray curve), (3) TEA+Glib at pH 6.3 (red curve), (4) TEA+Glib at pH 8.3 (blue curve), and (5) TEA+Glib at pH 7.3 (orange curve). The current was normalized by the capacitance of the cell and is represented in pA/pF. **D**, Current density of I_K measured at 0 mV in myocytes isolated from 3 control PAs (3 different rats, 5<n<8 cells). Bar graph mean \pm SEM. * P <0.05; ** P <0.01.

demonstrated that KCNK3 channels were localized mainly at the plasma membrane of PASCs and PAECs in control rats (Figure IIA in the online-only Data Supplement). According to our Western blot and quantitative polymerase chain reaction experiments, in MCT-PH rats, the numbers of gold particles (KCNK3 channel) were severely impaired in PASCs and PAECs (Figure IIB in the online-only Data Supplement). Moreover, the KCNK3 channels accumulated in the endoplasmic reticulum compartment and were absent of the plasma membrane of MCT-PASCs (Figure IIB in the online-only Data Supplement).

However, we also measured a strong reduction in the intensity of other K^+ currents and a decrease in mRNA level of Kv1.2, Kv2.1, Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 in severe MCT-PH, whereas other K2P channels (TASK2, TWIK1) were not affected (Figure IIIA–IIIC in the online-only Data Supplement).

A293 Inhibits Endogenous KCNK3 Current in Freshly Isolated PASCs and Modulates the Vascular Tone of the PA

External acidic pH is known to inhibit other members of the K2P family.¹⁶ To characterize I_{KCNK3} more specifically, we used a selective KCNK3 blocker: A293 (supplied by Sanofi). The dose response of A293 on global K^+ current caused a maximal decrease in global K^+ current at 1 μ mol/L (Figure IVA in the online-only Data Supplement). To minimize any nonspecific effects, we also used A293 at 200 nmol/L. At 200 nmol/L, A293 reduced K^+ current by 30% (Figure IVA and IVB in the online-only Data Supplement). As expected, in MCT-PH, the A293-sensitive current was reduced by 90% in PASCs (Figure 3A). In the presence of tetraethylammonium (TEA) plus glibenclamide (Glib), A293 reduced K^+ current similarly to acidic pH (Figure 3B and Figure IVA–IVC), thus confirming the ability of A293 to inhibit KCNK3. Using this specific

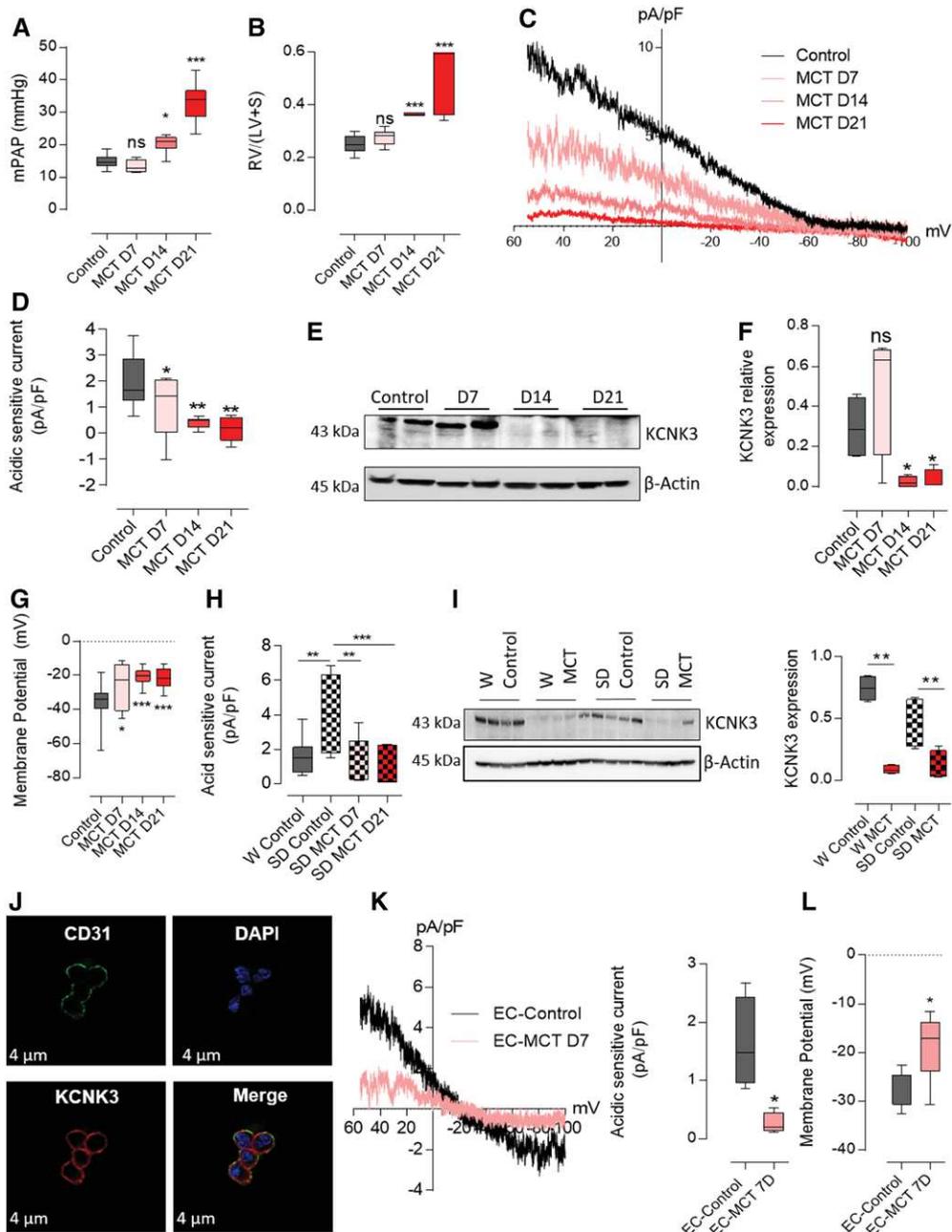


Figure 2. Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) current and KCNK3 expression are decreased progressively during the development of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH) and correlate with resting plasma-membrane depolarization. **A**, Mean pulmonary artery (PA) pressure (mPAP; in mmHg) and **(B)** the Fulton index (calculated as the ratio of right ventricular weight to left ventricular plus septal weight [RV/LV+S]) in controls and at 1, 2, and 3 weeks after MCT injection. **C**, Representative inward ramp current in control and MCT-PH PA smooth muscle cells (PASMCs; at 1, 2, and 3 weeks after MCT exposure), corresponding to the difference between the currents recorded at pH 8.3 and at pH 6.3, here called acid-sensitive K^+ current. **D**, Quantification of I_K measured at 0 mV recorded in freshly isolated PASMCs (controls and MCT-PH, $n=5-13$ cells). (**C** and **D**, 3 different rats per condition, $5 < n < 13$ cells.) **E**, Representative Western blot image of KCNK3 protein expression in the lungs of control and MCT-PAH rats (1, 2, and 3 weeks after MCT exposure). β -Actin was used as the loading control (4 different rats per condition). **F**, Quantification of membrane potential (E_m ; 3 different rats per condition, $6 < n < 30$ cells). **G**, Resting E_m of PASMCs that were freshly isolated from control and MCT-PAH rats (1, 2, and 3 weeks after MCT exposure). **H**, Acid-sensitive current density measured at 0 mV in freshly isolated PASMCs from control and MCT-PAH Wistar (W) and Sprague-Dawley (SD) rats at 1 and 3 weeks after MCT exposure (3 different rats per condition, $6 \leq n \leq 18$ cells). **I**, Representative Western blot image of KCNK3 protein expression in lungs from control and MCT-PAH in Wistar and Sprague-Dawley rats at 3 weeks after MCT exposure. β -Actin was used as the loading control. **Right**, Quantification of **I** (4 different rats per condition). **J**, Localization by immunofluorescence labeling and confocal imaging of KCNK3 in freshly isolated PA endothelial cells (ECs) from control rats. **K**, Variation in the acid-sensitive current as a function of time after MCT injection in freshly isolated PAECs ($n=3$). **L**, Quantification of resting E_m in PAECs freshly isolated from control and 1 week after PH induction. **A** through **G** and **J** through **L**, Experiments performed with Wistar rats. Dot plots with min and max. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

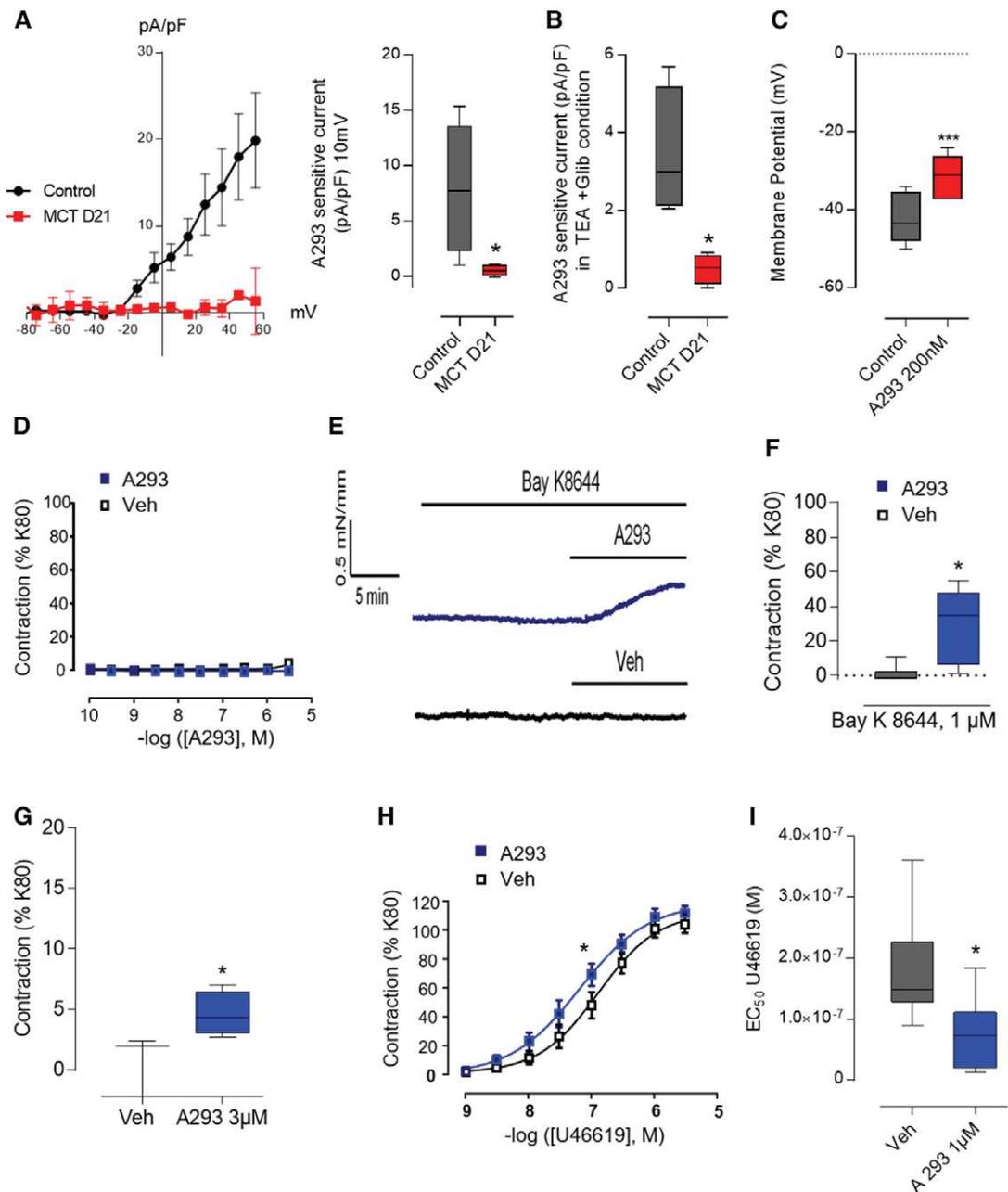


Figure 3. A293 inhibits endogenous potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) current in freshly isolated pulmonary artery (PA) smooth muscle cells (PASMCS) and modulates pulmonary arterial tone. **A**, Current-voltage relationship of the A293-sensitive current in control and monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH; 21 days) PASMCS. **Right**, Quantification of the A293-sensitive current (2 different rats, $n=6$). **B**, Current density of the A293-sensitive current in the presence of tetraethyl-ammonium (TEA) plus glibenclamide (Glib; 2 different rats $n=3$). **C**, Bar graph represents quantification of resting membrane potential (E_m) under basal conditions and after addition of A293 (200 nmol/L; 2 different rats, $n=7$). **D**, Concentration-response curves established by applying increasing concentrations of A293 (0.1 nmol/ \sim 3 μ mol/L) or vehicle to resting PA segments mounted on the myograph to record isometric tension (4 and 5 different rats per conditions). **E**, Representative traces showing the effect of A293 or vehicle on PA resting tone in the presence of 1 μ mol/L Bay-K8644 (L-type Ca^{2+} channel agonist; 6 different rats). **F**, Quantification of contractile responses induced by the addition of A293 or vehicle in the presence of 1 μ mol/L Bay-K8644 (7 and 8 different rats). **G**, Quantification of contractile responses induced by the addition of 10 mmol/L TEA in the presence of A293 or vehicle. **H**, Dose-response curve established by applying increasing concentrations of U46619 (thromboxane A2 mimetic, 1–3 μ mol/L) in the presence of 1 μ mol/L A293 or vehicle. **I**, Half-maximal effective concentration (EC_{50}) of U46619 in the presence of A293 or vehicle (**H** and **I**, 8 different rats). Dot plots with min and max. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.005$.

pharmacological approach, we confirmed that KCNK3 function was severely reduced in PASMCS from MCT-PH rats and that KCNK3 was involved in the maintenance of resting E_m (-40 to -30 mV; Figure 3C).

Using isolated vessels in organ bath experiments, we assessed the involvement of KCNK3 in controlling rat pulmonary arterial tone. We hypothesized that if KCNK3 significantly contributed to the resting tone of PA, then one would

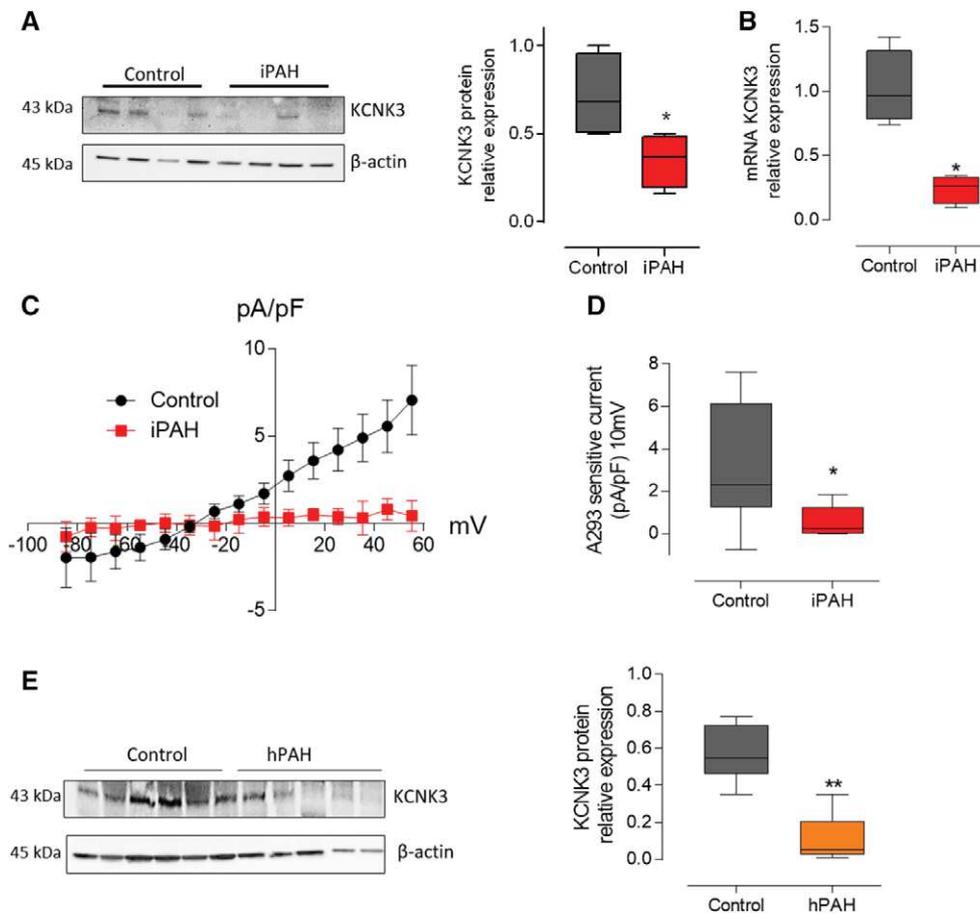


Figure 4. Pulmonary expression of potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) is reduced in patients with pulmonary arterial (PA) hypertension (PAH). **A**, Representative Western blot image to quantify KCNK3 expression in the lungs from control and patients with idiopathic PAH (iPAH; $n=4$). β -Actin was used as a loading control. **Right**, Mean values of **A** ($n=4$ for control subjects and patients with PAH). **B**, mRNA level expression of KCNK3 on PAs isolated from control subjects and patients with iPAH ($n=4$ for both control subjects and patients with PAH). **C**, Current-voltage relationship of the A293-sensitive current in human control and iPAH PA smooth muscle cells. **Right**, Quantification of the A293-sensitive current ($n=10$ and 7 cells). **E**, Representative Western blot image to quantify KCNK3 expression in lungs from control subjects ($n=6$ patients), patients with heritable PAH (hPAH) who were carriers of a *BMPR2* mutation ($n=5$ patients). β -Actin was used as a loading control. **Right**, Quantification of **D**. Dot plots with min and max. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

expect that KCNK3 inhibition would bring resting E_m to a value close to the opening threshold of L-type Ca^{2+} channels, thus facilitating the contraction of arteries. Unexpectedly, increasing the concentration of A293 (0.1–3 $\mu\text{mol/L}$) did not contract quiescent PAs (Figure 3D). However, if isolated arteries were pretreated with Bay-K8644, a drug that potentiates voltage sensitivity of L-type Ca^{2+} channels,¹⁷ A293 (at 1 $\mu\text{mol/L}$) induced significant contraction of PAs (35% of the response to the solution with $[K^+]$ at 80 mmol/L [K80]; Figure 3E and 3F). Used at 200 nmol/L, A293 also induced significant contraction of Bay-K8644-pretreated PAs (8%–10% of the K80 response) and shifted the concentration-effect curve to the left compared with vehicle (Figure IVD and IVE in the online-only Data Supplement). Additionally, in the presence of A293, the addition of 10 mmol/L tetraethylammonium, known to block other K^+ channels, including BK_{Ca} and some K_v ,¹⁴ evoked significant PA constriction (20% of the K80 response; Figure 3G). Finally, 1 $\mu\text{mol/L}$ A293 significantly potentiated the contractile response of the thromboxane A_2 mimetic U46619, shifting the concentration-effect curve

to the left compared with vehicle (Figure 3H and 3I). Taken together, these results demonstrate that KCNK3 inhibition with 1 $\mu\text{mol/L}$ A293 predisposes PAs to constrict.

Pulmonary Expression of KCNK3 Is Reduced in Patients With PAH

We analyzed the pulmonary expression of KCNK3 in mRNA (isolated PA) and protein (lung tissues) from patients with iPAH and control subjects (Figure 4A and 4B). As shown in Figure 4, protein ($n=4$) and mRNA ($n=5$) levels of KCNK3 were significantly reduced in patients with iPAH compared with the control subjects ($P<0.05$; Figure 4A and 4B). Using patch-clamp technique, we then evaluated KCNK3 function in cultured human PASMCS (control and iPAH) plus the selective KCNK3 blocker A293 at 200 nmol/L. In iPAH PASMCS, the A293-sensitive current was reduced by 80% compared with non-PAH human PASMCS (Figure 4C and 4D). We showed that lung protein expression of KCNK3 was significantly reduced in patients with hPAH carrying a *BMPR2* mutation ($n=5$; Figure 4E).

Chronic In Vivo Inhibition of KCNK3 Induced Exaggerated Proliferation of PAECs, PSMCs, and Adventitial Fibroblasts With Subsequent Distal Artery Neomuscularization and Early Hemodynamic Signs of PH

To evaluate whether the loss of function of KCNK3 can initiate PH, we chronically inhibited KCNK3 in rats using A293 (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ IP). After 7 and 28 days, the global K⁺ current was significantly reduced by 30% in isolated PSMCs (Figure 5A). Interestingly, the A293-sensitive current was strongly reduced after 7 and 28 days of A293 exposure (no significant differences were measured between 7 and 28 days; Figure 5B and 5C). Moreover, PSMCs isolated from A293-treated rats were significantly depolarized (−40 to −31 mV; not shown), whereas mRNA expression and protein expression of KCNK3 were not modified (Figure 5D–5F).

To evaluate the consequence of KCNK3 inhibition on *in situ* pulmonary cell proliferation, we visualized cells undergoing DNA replication in A293-exposed rats by measuring the incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; yellow arrows in Figure 5). As expected, we detected very few EdU-positive cells in control lung parenchyma (Figure 5G), whereas there were areas of intense microvascular EC proliferation (CD34⁺EdU cells) in A293-exposed rats (Figure 5Ga). Few PSMCs were EdU positive (α -smooth-muscle actin⁺EdU cells; Figure 5Gb). We also observed adventitial fibroblast cell proliferation in rats treated for 28 days with A293 (vimentin⁺EdU⁺ cells; Figure 5Gc).¹⁸ To ascertain the overproliferation of adventitial fibroblasts in A293-treated rats, we performed coimmunostaining with the fibroblast markers CD90 and fibronectin. As shown in Figure V in the online-only Data Supplement, many EdU-positive cells were also positive for CD90 (Figure VA in the online-only Data Supplement) and fibronectin (Figure VB in the online-only Data Supplement), confirming the fibroblast phenotype of adventitial EdU-positive cells.

Interestingly, some EdU-positive cells were CD4⁺ (T-helper cell markers) or CD8⁺ (cytotoxic T-cell markers), denoting the presence of active inflammation in A293-exposed rats (Figure VIA and VIB in the online-only Data Supplement). Moreover, in rats treated for 7 days, the number of proliferative cells was significantly increased compared with controls but was still 2-fold less than in rats treated for 28 days (Figure 5Gd). Accordingly, A293-treated rats presented with significant distal neomuscularization (Figure 5H). Interestingly, A293-treated rats displayed significantly increased right ventricular systolic pressure (Figure 5I), whereas the RV was not yet hypertrophied (not shown) and cardiac output was not altered (Figure 5I).

Western blot analysis demonstrated increased expression of the fibroblast markers vimentin and phosphorylated vimentin (Ser55) in the lungs from A293-exposed rats (28 days) compared with control rats (Figure 6A). We also observed significantly increased phosphorylation of ERK1/2 in the lungs of A293-exposed rats (proliferative pathway; Figure 6A). At 28 days (but not 7 days), long-term KCNK3 inhibition led to significantly increased mRNA levels of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor b, PDGF α , interleukin (IL)-17Ra, and α 1 antitrypsin (A1AT; Figure 6B and 6C).

Moreover, the serum levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and Gro-1 (melanoma growth stimulating activity, alpha 1) were significantly higher in A293-treated rats compared with vehicle-treated rats (Figure 6D and 6E). This was related to an increase in lung mRNA expression of MCP-1, TIMP-1, and Gro-1. Other markers of endothelial dysfunction and inflammation were not modified (caveolin-1, CTGF, Interleukin 6, plasminogen activator inhibitor-1, tumor necrosis factor- α , adiponectin, soluble E-selectin, soluble intracellular adhesion molecule-1, von Willebrand factor; not shown). Kv1.5 mRNA expression was significantly reduced in A293-exposed rats (28 days), whereas Kv2.1 mRNA expression was not affected (Figure 6F).

In Vivo Pharmacological Activation of KCNK3 Interferes With MCT-PH Development

Because we had demonstrated that KCNK3 is downregulated in the lungs and PA of patients with PAH and MCT-PH rats, we next evaluated the consequences of *in vivo* pharmacological activation of the KCNK3 channel using ONO-RS-082. In 2007, a patent explored the molecules associated with phosphorylation of the human KCNK3 channel. The authors of the patent found several molecules that could modulate human KCNK3, including the phospholipase A2 inhibitor ONO-RS-082.^{18a} In their work, which identified KCNK3 mutations in PAH, Ma and colleagues³ proposed that ONO-RS-082 could be a beneficial therapeutic approach to target KCNK3.

In vitro, we demonstrated, using the patch-clamp technique, that ONO-RS-082 (10 μ mol/L) improved KCNK3 current (tetraethylammonium-insensitive current; Figure VIIA and VIIB in the online-only Data Supplement). However, when administered *in vivo* from days 14 to 21 to MCT-PH rats, ONO-RS-082 was inefficient at alleviating PH in MCT-PH rats (Figure VIIC in the online-only Data Supplement). Of relevance, we demonstrated that KCNK3 expression was totally abolished at these time points (Figure 2). Hence, we used a long-term treatment of ONO-RS-082 at 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (from days 1–21; Figure 7A). At 3 weeks after treatment initiation, the hemodynamic measurements demonstrated that the long-term application of ONO-RS-082 significantly reduced PH induced by exposure to MCT. Compared with MCT-vehicle rats, a 50% reduction in RV systolic pressure (Figure 7B) and a 60% reduction in RV hypertrophy (Figure 7C) were observed in ONO-RS-082 rats receiving monocrotaline, whereas cardiac output was not improved by the ONO-RS-082 treatment (Figure 7D). Additionally, long-term administration of ONO-RS-082 induced a significant reduction in vascular wall thickness compared with MCT-vehicle rats (Figure 7E and 7F). Moreover, in the monocrotaline ONO-RS-082 group, Western blot analysis demonstrated lung KCNK3 expression similar to that in the control group (Figure 7G). These results demonstrate the potential efficacy and pharmacological therapeutic action on KCNK3 function to reduce PH when KCNK3 expression is still present.

Discussion

This study has 5 major findings. Using a combination of patch-clamp recording methods and biochemical and *ex vivo*

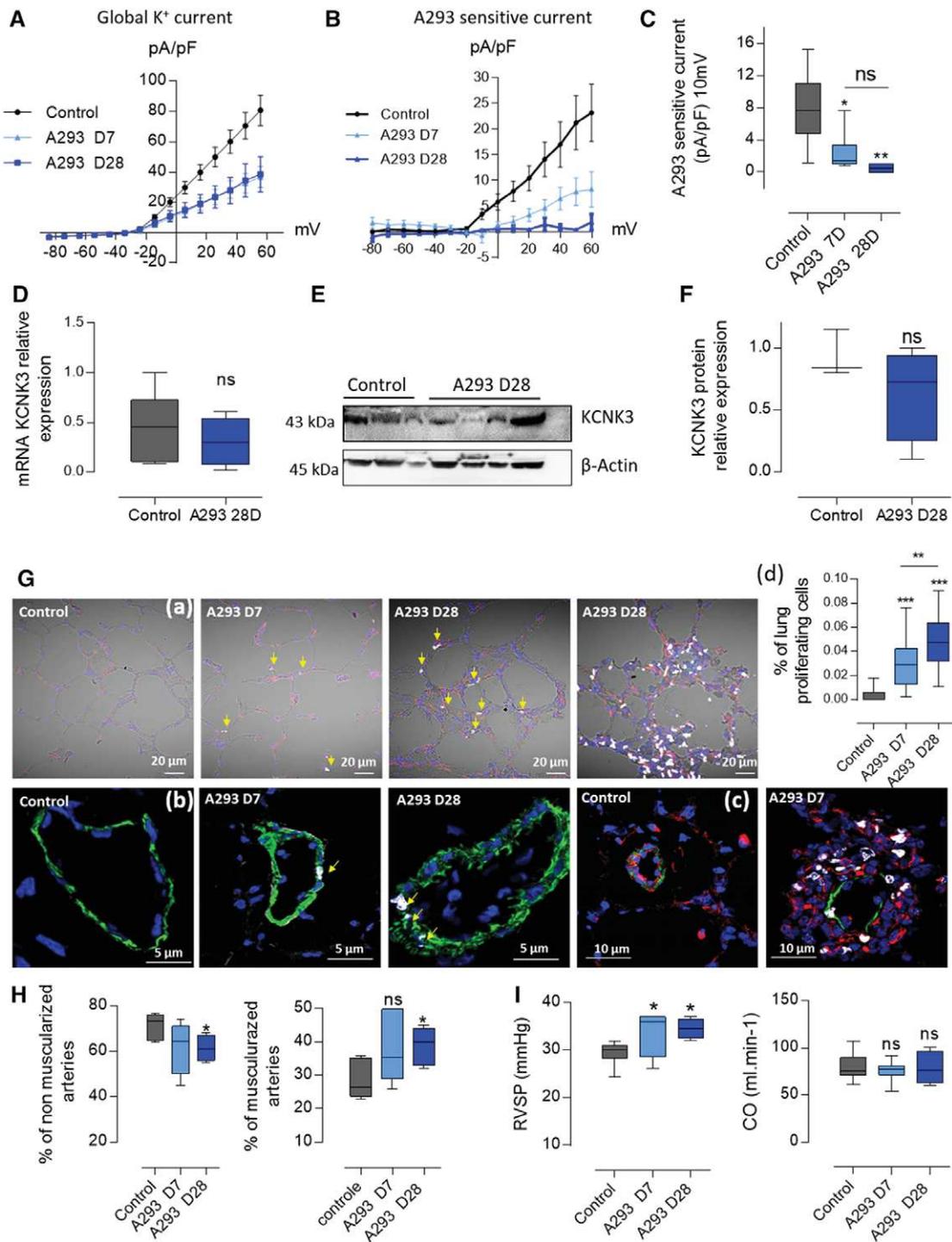


Figure 5. In vivo chronic inhibition of potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3)-induced exaggerated proliferation of pulmonary artery (PA) endothelial cells (ECs), PA smooth muscle cells (PASMCs), and adventitial fibroblasts; distal artery neomuscularization; and early hemodynamic signs of pulmonary hypertension (PH). **A**, Current-voltage relationship curves for global K⁺ current recorded in freshly isolated PASMCs from controls and A293-treated rats (at 7 and 28 days). **B**, Current-voltage relationship curves of A293-sensitive current in PASMCs from controls and A293-treated rats (2 different rats per conditions, 4<n<9 cells). **C**, Quantification of current density of A293-sensitive current measured in **B** (2 different rats per conditions, 4<n<9 cells). **D**, Lung mRNA expression of KCNK3 from control rats and A293-treated rats (28 days; n=4 different rats per condition). **E**, A representative Western blot image of lung protein expression of KCNK3 in control and A293-treated rats (28 days). β-Actin was used as a loading control. **F**, Quantification of **E** (n=4 different rats per condition). **G**, Immunofluorescent staining of frozen rat lung sections and confocal imaging with Click-iT 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; white nuclei=EdU-positive nuclei=proliferating cells) in combination with (a) CD34 (ECs in red), (b) α-smooth-muscle actin (α-SMA; in green, and (c) vimentin (fibroblast marker in red). Counterstain was DAPI (blue). (d) Quantification of the percentage of lung proliferating cells. **H**, Quantification of the percentage of nonmuscularized arteries (left) and muscularized arteries (right; n=6 different rats per condition). **I**, Right ventricular systolic pressure (RVSP; left) and cardiac output (CO; right) in control and A293-treated rats (n=10 different rats per condition). Dot plots with min and max. *P<0.05; **P<0.01.

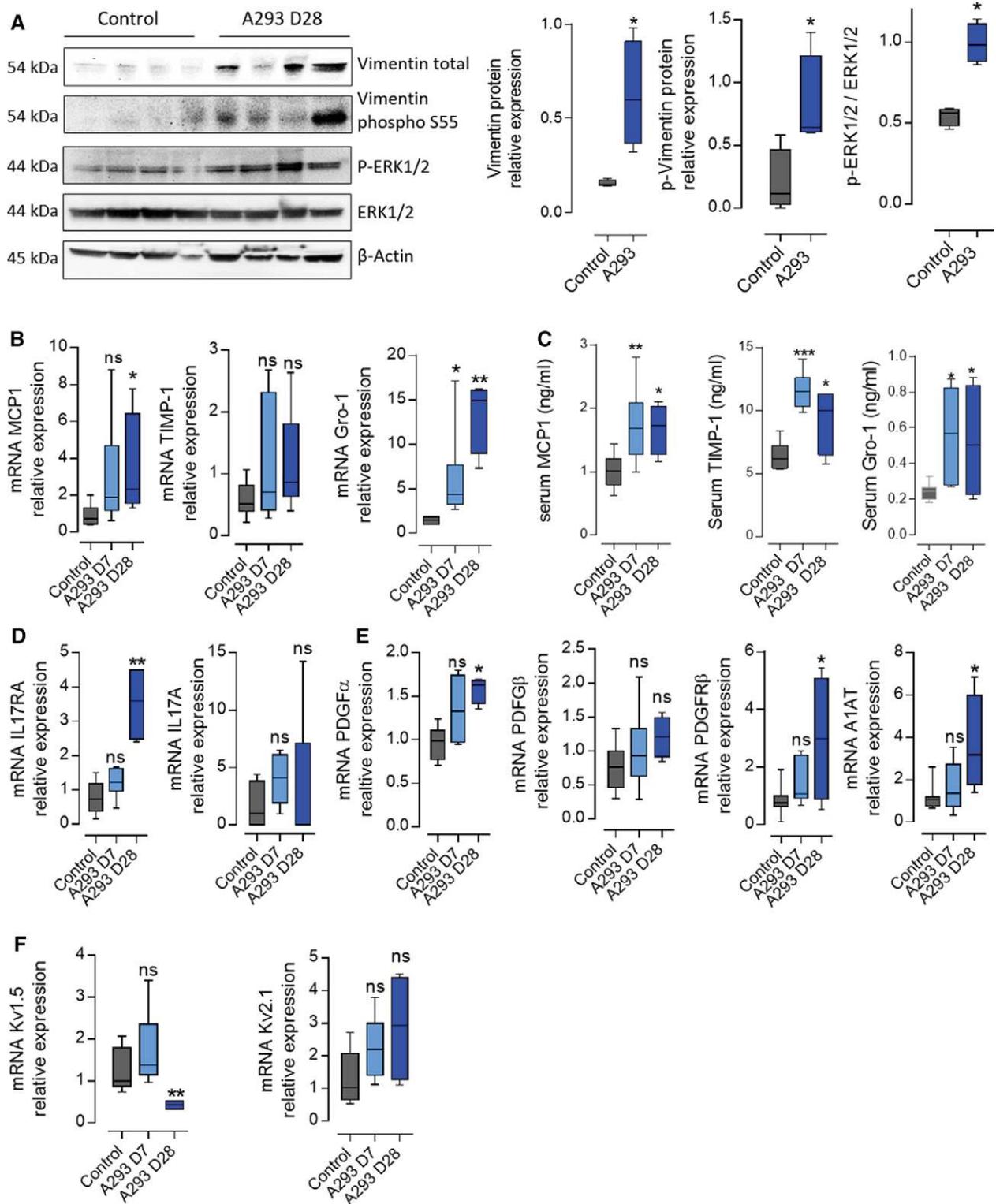


Figure 6. Molecular consequences of chronic potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) inhibition in lungs and sera. **A**, Vimentin, phosphorylated (p) vimentin (S55), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, and ERK1/2 expression in the lungs of control and A293-treated rats (28 days). β -Actin was used as a loading control. **Right**, Quantification of Western blots (n=4 different rats per condition). **B**, mRNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and Gro-1 (melanoma growth stimulating activity, alpha 1) in lungs from control and A293-treated rats (after 7 and 28 days treatment; n=5 different rats per conditions). **C**, Serum concentrations of MCP-1, TIMP-1, and Gro-1 in control and A293-treated rats (at 7 and 28 days; n=5). **D**, mRNA expression of interleukin IL-17RA and IL-17a mRNA in lungs from control and A293-treated rats (at 7 and 28 days; n=5 different rats per condition). **E**, mRNA expression of platelet-derived growth factor (PDGF) α , PDGF β , PDGF receptor (PDGFR) β , and α 1 antitrypsin (A1AT) in lungs from control and A293-treated rats (at 7 and 28 days; n=5 different rats per condition). **F**, mRNA expression of KCNA5 (Kv1.5) and KCNB1 (Kv2.1) in lungs from control and A293-treated rats (at 7 and 28 days; n=5 different rats per condition). Dot plots with min and max. * P <0.05; ** P <0.01.

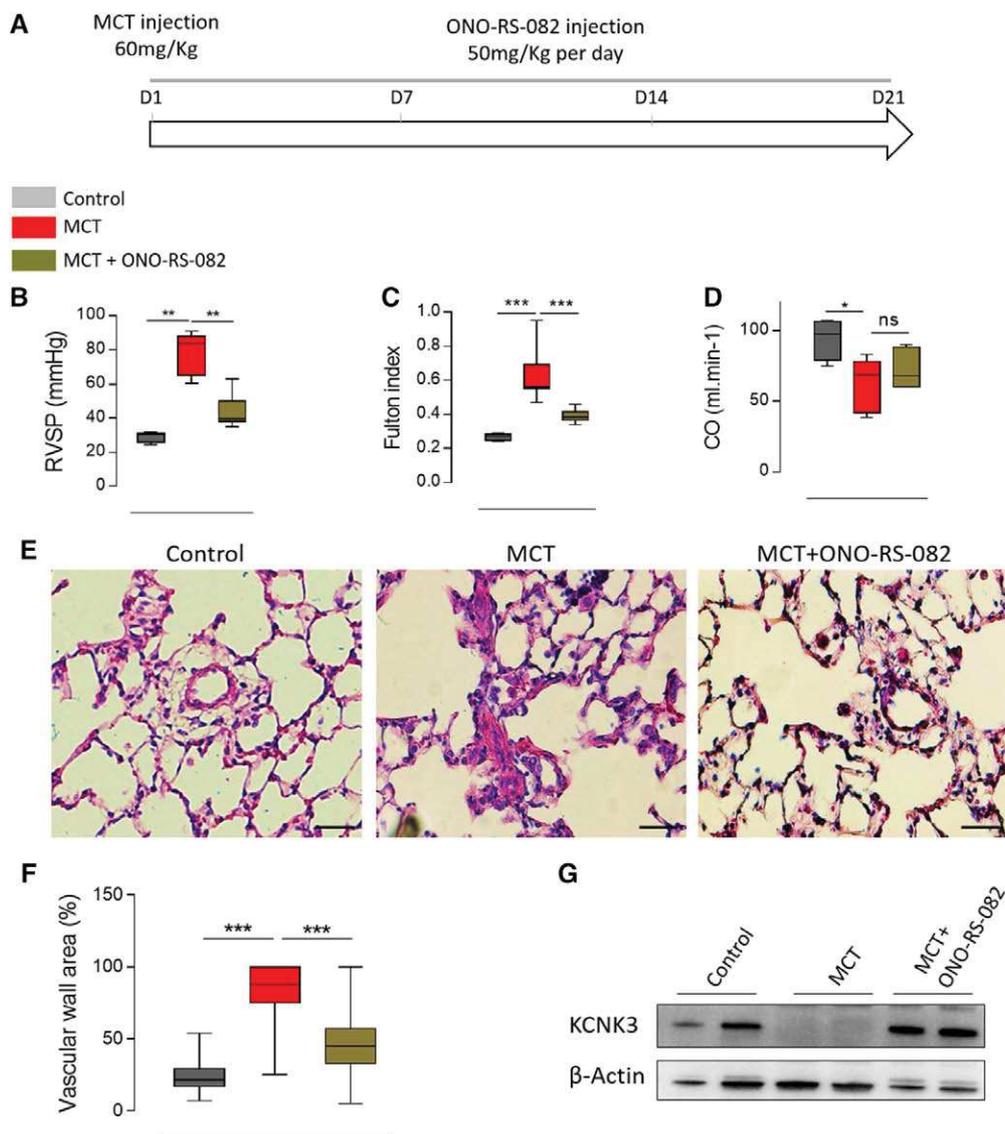


Figure 7. In vivo pharmacological activation of potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) interferes with monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH) development. **A**, In vivo experimental design. ONO-RS-082 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 3 weeks) was administered long term during MCT exposure by intraperitoneal injection. **B**, Right ventricular systolic pressure (RVSP; mm Hg; $n=4-7$ different rats per condition). **C**, Fulton index ($n=5-10$ different rats per condition). **D**, Cardiac output (CO; mL/min). **E**, Representative hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded lung sections from the control, MCT, and MCT+ONO-RS-082 groups. **F**, Vascular wall area (%) in the control, MCT, and MCT+ONO-RS-082 groups ($n=6$ different rats per condition). **G**, Representative Western blot image of protein KCNK3 expression in lungs from control, MCT, and MCT+ONO-RS-082 rats. β -Actin was used as a loading control ($n=2$ different rats per condition). Dot plots with min and max. Scale bar, $20 \mu\text{m}$. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

and in vivo approaches, we have provided, for the first time, strong evidence for the following. First, KCNK3 expression and function are severely reduced in iPAH, hPAH, and MCT-PH. Second, I_{KCNK3} current decreases progressively during the development of MCT-induced PH and was correlated with the depolarization of the resting plasma membrane. Third, KCNK3 modulates pulmonary arterial tone. Fourth, long-term inhibition of KCNK3 (with the compound A293) enhances distal artery neomuscularization, together with subsequent development of early hemodynamic signs of PH, and exacerbated proliferation of PAECs, PASMCs, and adventitial fibroblasts, in association with an increase in some markers of inflammation. Fifth, in vivo pharmacological activation of

KCNK3 reduces the development of PH in the monocrotaline rat model.

Interestingly, we have shown that reduction in KCNK3 expression and function are concomitant to PH induction and precedes hemodynamic changes, thus suggesting that reduction of I_{KCNK3} is not a mere consequence of PH but rather an active player in its pathogenesis. At 1 week after PH initiation, I_{KCNK3} is reduced, whereas protein expression of KCNK3 is as yet unaffected, suggesting that KCNK3 may be not correctly addressed to the plasma membrane or inhibited. Correlated to the decrease of I_{KCNK3} , the plasma membranes of PASMCs and PAECs from MCT-PH rats are depolarized by $\approx 10 \text{ mV}$, confirming the role of KCNK3 in resting Em, which has

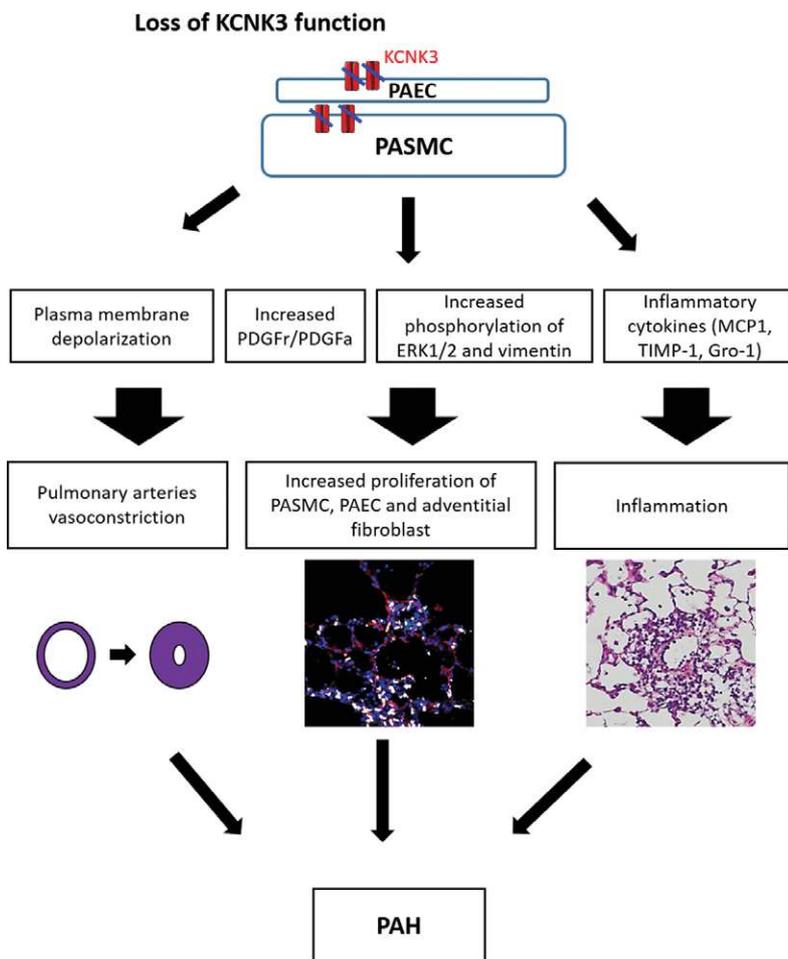


Figure 8. Proposed sequence of events arising from loss/inhibition of potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3). Loss of KCNK3 function in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) and pulmonary artery endothelial cells (PAECs) results in plasma-membrane depolarization, leading to pulmonary arterial vasoconstriction, pulmonary vascular cell proliferation (partly explained by increased expression of platelet-derived growth factor [PDGF]), and inflammation. All these events are responsible for pulmonary vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension (PAH). ERK indicates extracellular signal-regulated kinase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; PDGFr, platelet-derived growth factor receptor; and TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

been previously suggested as a nonspecific KCNK3 inhibitor (acidic pH or anandamide)¹⁵ or an siRNA strategy.¹⁹

In this study, we used a selective KCNK3 inhibitor (A293), which was originally described to inhibit 90% of KCNK3 current, 50% percent of KCNK9 current, and <10% of other K⁺ channels tested (TASK2, TASK4, TREK-1, Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv4.3, and hERG) at 1 μmol/L.⁷ Of note, KCNK9 is not expressed in rat PA¹⁵ (data not shown) and hence cannot be part of the K⁺ current. In line with the role played by KCNK3 in resting Em, we have demonstrated that KCNK3 inhibition modulates pulmonary arterial tone and contributes to vasoconstriction.

Manoury and coworkers²⁰ suggested a crucial role for KCNK3 function in PASMCs, which we have highlighted in our study. They demonstrated that KCNK3 is almost lost in culture conditions (a highly proliferative phenotype) compared with in situ conditions (contractile condition). In line with this observation, patch-clamp measurements of human cultured PASMCs revealed that the A293-sensitive current was smaller than the current recorded on PASMCs freshly isolated from rats (by 10-fold). Moreover, the A293-sensitive current was significantly reduced in human iPAH PASMCs compared with controls. Hence, in our study, we mainly used freshly isolated PASMCs or PAECs.

It is well established that the MCT-PH model is characterized by abnormal pulmonary vascular cell proliferation. In vivo

long-term KCNK3 inhibition experiments have revealed an exaggerated proliferation of PAECs, PASMCs, and adventitial fibroblasts, which are hallmarks of PAH,²¹ further demonstrating the role of KCNK3 in the loss of function and as an initial molecular trigger of PAH by promoting cell proliferation. Accordingly, knockdown of KCNK3 in mouse neuroblastoma N2A cells increases N2A cell proliferation rates by >25%,²² thus illustrating our finding. At a mechanistic level, long-term inhibition of KCNK3 induced increased expression of A1AT, which could participate in the hyperproliferative phenotype of adventitial fibroblasts. Indeed, high levels of A1AT are, for instance, observed in lung adenocarcinoma cell line,²³ and A1AT stimulates fibroblast proliferation in vitro²⁴; conversely, decreased expression of A1AT reduces cell migration and cell invasion.²³ Moreover, the vimentin overexpression observed in A293-treated lungs suggests the accumulation of pulmonary fibroblasts. Like A1AT, vimentin is a cancer marker involved in cell proliferation and migration processes²⁵ and in mesenchymal transition, which could potentially occur during the development of vascular pathologies.²⁶ We have recently demonstrated high expression of vimentin and of phosphorylated vimentin (Ser55) during the development of PAH.¹³ Ser55 on vimentin is phosphorylated in various types of cells only during the early mitotic phase by Cdk1.²⁷ Vimentin has been shown to interact with phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and to protect it against dephosphorylation,²⁸

extending its mitotic potential. Accordingly, we observed increased phosphorylation of ERK1/2, which certainly supports vascular proliferation induced by the inhibition of KCNK3. Our results also suggest that PA remodeling, induced by KCNK3 inhibition, may occur through the PDGF/PDGF receptor axis, a crucial promitotic axis in PAH.^{29,30}

We also observed an increase in MCP-1, TIMP-1, IL-17RA, and other inflammatory molecules known to be implicated in the immunopathology of PAH.³¹ This highlights the fact that KCNK3 inhibition acts on the whole spectrum of PAH pathomechanisms, from vasoconstriction and vascular cell proliferation to PAH-associated chronic inflammation. For instance and in accordance with our results, (1) TIMP-1 is overexpressed by cultured PSMCs from patients with iPAH,³² and in vivo TIMP-1 gene transfer occurs in rat-potentialized PAH induced by chronic hypoxia³³; (2) MCP-1/CCL2 is strongly involved in the development of human and experimental PAH^{34,35} and plays a key role in arterial remodeling through direct mitotic/chemotactic effects on PSMCs and PAECs but also recruits monocytes/mononuclear cells and populations of circulating progenitors^{36,37}; and (3) there is an IL-17-dependent (Th17) immune polarization in PAH³⁸ and IL-17 mRNA, and protein expression is significantly increased in hypoxia-induced PH mouse models.³⁹ Interestingly, IL-17 binds to its receptor composed of IL-17RA and IL-17RC subtypes, leading to activation of the canonical ERK1/2, phosphoinositide 3-kinase–Akt, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways.⁴⁰

We have shown that KCNK3 expression was reduced in patients with iPAH and hPAH and in MCT-PH rats. Interestingly, we have also previously demonstrated that PH induced by cyclophosphamide in rats is associated with a 70% reduction in KCNK3 expression.¹² Moreover, acute hypoxia blocks KCNK3 current in cultured PSMCs.¹⁹ Together, these findings suggest that inhibition of KCNK3 is involved in the development of diverse causes of PH. Indeed, KCNK3 is known to be regulated by several mechanisms involved in PH pathobiology. For instance, endothelin-1, an extremely powerful vasoconstrictor that is involved in vascular remodeling, has been shown to inhibit KCNK3 via Rho kinase in human PSMCs.^{41–42} Growth factor signaling, such as PDGF receptor and tyrosine kinase activity, act via a common pathway that influences the function and expression of K⁺ channels^{43–44} and could also partially explain the decrease in I_{KCNK3} . Moreover, downstream of the PDGF or tyrosine kinase receptors, Src kinase signaling is crucial for K⁺ channel function, including TASK1/KCNK3.⁴⁵

Our findings are summarized in Figure 8. We propose that the loss of function of KCNK3 is followed by the following sequence of events: (1) plasma-membrane depolarization; (2) PA vasoconstriction; (3) increase in pulmonary vascular cell proliferation (vascular ECs and PSMCs); (4) increase in adventitial fibroblast proliferation via upregulation of phosphorylated ERK1, PDGF, and vimentin; (5) pulmonary inflammation via upregulation of the MCP-1, Gro-1, IL-17 axes; and (6) increase in right systolic ventricular pressure

Limitations

ONO-RS-082 is a phospholipase A2 inhibitor. The impact of ONO-RS-082 treatment on phospholipase A2 activity could

also have contributed to alleviate MCT-PH. We have demonstrated here that KCNK3 expression was abolished whereas expression of phospholipase A2 was known to be upregulated in the MCT-PH models (more precisely, 3 and 4 weeks after PH initiation by monocrotaline exposure).⁴⁶ If the improvement in PH by ONO-RS-082 was caused by decreased phospholipase A2 activity, we would have observed a partial correction of PH as a curative strategy. This was not the case, suggesting that the improvement in PH by long-term ONO-RS-082 treatment was caused mainly by its pharmacological activation of KCNK3 channels.

Conclusions

In conclusion, we show, for the first time, several lines of evidence that KCNK3 channel dysfunction participates in the development of PH and may act as one of its triggers. As recently supported by the discovery of *KCNK3* mutations that cause hPAH, we show that decreased KCNK3 expression is an emerging hallmark of PAH. Lastly, and as suggested by Ma and collaborators,³ we show that in vivo KCNK3 activation with ONO-RS-082 is viable and effective at restoring/ameliorating PH in our monocrotaline experimental PH model when KCNK3 is expressed.

Acknowledgments

We acknowledge Sanofi for providing the A293 compound. We also acknowledge Maud Chétiveaux from the Cardiex-Terassay plateforme at the University of Nantes. We thank Newmed Publishing for editing the manuscript.

Sources of Funding

Dr Perros received funding from National Funding Agency for Research (grant ANR-13-JSV1-0011-01). Dr Perros received funding from National Funding Agency for Research (grant ANR-13-JSV1-0011-01). This study was also supported by IUCPQ Foundation, Fondation du Grand défi Pierre Lavoie, and the French Foundation for rare diseases (Fondation maladies rares). Dr Antigny was supported by a postdoctoral grant from Aviesan (ITMO IHP) and received funding from the Fondation du Souffle et du Fonds de Dotation “Recherche en Santé Respiratoire.” A. Hautefort was supported by a PhD grant from Région Ile de France (CORDDIM). Dr Ranchoux was supported by The Laboratoire d’Excellence en Recherche sur le Médicament et l’Innovation Thérapeutique. J. Meloche was awarded a Fonds de recherche du Québec-Santé PhD graduate scholarship. F. Potus was the recipient of a doctoral training award from the Center de Recherche de l’IUCPQ. Canada Research Chairs and CIHR grants to Dr Bonnet also supported this work. Dr Provencher is a Fonds de recherche du Québec-Santé clinical scientist.

Disclosures

Drs Simonneau and Humbert have received speaker fees or honoraria for consultations from Actelion, Bayer, Bristol-Myers-Squibb, GSK, Lilly, Novartis, Pfizer, and United Therapeutics. Dr Simonneau received reimbursement from Actelion and Lilly for attending French and international meetings and fees from Bristol-Myers-Squibb and Lilly for participating to advisory boards. The other authors report no conflicts.

References

- Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hooper M.

- 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPCC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*. 2015;46:903–975. doi: 10.1183/13993003.01032-2015.
2. Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grünig E, Aldred M, Geraci M, Loyd JE, Elliott CG, Trembath RC, Newman JH, Humbert M. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(suppl):D13–D21. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.035.
 3. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, Germain M, Tréguouët DA, Borczuk A, Rosenzweig EB, Girerd B, Montani D, Humbert M, Loyd JE, Kass RS, Chung WK. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369:351–361. doi: 10.1056/NEJMoa1211097.
 4. Girerd B, Perros F, Antigny F, Humbert M, Montani D. KCNK3: new gene target for pulmonary hypertension? *Expert Rev Respir Med*. 2014;8:385–387. doi: 10.1586/17476348.2014.909731.
 5. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F793–F801.
 6. Wanstall JC. The pulmonary vasodilator properties of potassium channel opening drugs. *Gen Pharmacol*. 1996;27:599–605.
 7. Putzke C, Wemhöner K, Sachse FB, Rinné S, Schlichthörl G, Li XT, Jaé L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Müller R, Daut J, Decher N. The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res*. 2007;75:59–68. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.025.
 8. Chaumais MC, Ranchoux B, Montani D, Dorfmueller P, Tu L, Lecerc F, Raymond N, Guignabert C, Price L, Simonneau G, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Perros F. N-acetylcysteine improves established monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res*. 2014;15:65. doi: 10.1186/1465-9921-15-65.
 9. Hong Z, Smith AJ, Archer SL, Wu XC, Nelson DP, Peterson D, Johnson G, Weir EK. Pergolide is an inhibitor of voltage-gated potassium channels, including Kv1.5, and causes pulmonary vasoconstriction. *Circulation*. 2005;112:1494–1499. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.556704.
 10. Paffett ML, Naik JS, Resta TC, Walker BR. Reduced store-operated Ca²⁺ entry in pulmonary endothelial cells from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L1135–L1142. doi: 10.1152/ajplung.00432.2006.
 11. Ward JP, Snetkov VA. Determination of signaling pathways responsible for hypoxic pulmonary vasoconstriction: use of the small vessel myograph. *Methods Enzymol*. 2004;381:71–87. doi: 10.1016/S0076-6879(04)81004-8.
 12. Ranchoux B, Günther S, Quarck R, Chaumais MC, Dorfmueller P, Antigny F, Dumas SJ, Raymond N, Lau E, Savale L, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G, Stenmark K, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Montani D, Perros F. Chemotherapy-induced pulmonary hypertension: role of alkylating agents. *Am J Pathol*. 2015;185:356–371. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.10.021.
 13. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Péchoux C, Bogaard HJ, Dorfmueller P, Remy S, Lecerc F, Planté S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegón I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2015;131:1006–1018. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750.
 14. Walsh JV Jr, Singer JJ. Penetration-induced hyperpolarization as evidence for Ca²⁺ activation of K⁺ conductance in isolated smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1980;239:C182–C189.
 15. Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2004;142:192–202. doi: 10.1038/sj.bjp.0705691.
 16. Feliciangeli S, Chatelain FC, Bichet D, Lesage F. The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol*. 2015;593:2587–2603. doi: 10.1113/jphysiol.2014.287268.
 17. Schramm M, Thomas G, Towart R, Franckowiak G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. *Nature*. 1983;303:535–537.
 18. Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*. 1990;63:144–161.
 - 18a. Feinmark SJ, Robinson RB, inventors; The Trustees of Columbia University In The City of New York, assignee. Method of treating a condition associated with phosphorylation of task-1. US patent 8,097,650. January 17, 2012.
 19. Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morfy RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 2006;98:1072–1080. doi: 10.1161/01.RES.0000219677.12988.e9.
 20. Manoury B, Etheridge SL, Reid J, Gurney AM. Organ culture mimics the effects of hypoxia on membrane potential, K(+) channels and vessel tone in pulmonary artery. *Br J Pharmacol*. 2009;158:848–861. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00353.x.
 21. Masri FA, Xu W, Comhair SA, Asosingh K, Koo M, Vasanji A, Drazba J, Anand-Apte B, Erzurum SC. Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L548–L554. doi: 10.1152/ajplung.00428.2006.
 22. Hao X, Li X. The knockdown of TASK-1 channels improved the proliferation of N2A cells. *J Mol Neurosci*. 2015;55:314–317. doi: 10.1007/s12031-014-0323-6.
 23. Chang YH, Lee SH, Liao IC, Huang SH, Cheng HC, Liao PC. Secretomic analysis identifies alpha-1 antitrypsin (A1AT) as a required protein in cancer cell migration, invasion, and pericellular fibronectin assembly for facilitating lung colonization of lung adenocarcinoma cells. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11:1320–1339. doi: 10.1074/mcp.M112.017384.
 24. Dabbagh K, Laurent GJ, Shock A, Leoni P, Papakrivopoulou J, Chambers RC. Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways. *J Cell Physiol*. 2001;186:73–81. doi: 10.1002/1097-4652(200101)186:1<73::AID-JCP1002>3.0.CO;2-Q.
 25. Du H, Chen D, Zhou Y, Han Z, Che G. Fibroblast phenotypes in different lung diseases. *J Cardiothorac Surg*. 2014;9:147. doi: 10.1186/s13019-014-0147-z.
 26. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L1–L8. doi: 10.1152/ajplung.00378.2006.
 27. Tsujimura K, Ogawara M, Takeuchi Y, Imajoh-Ohmi S, Ha MH, Inagaki M. Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis. *J Biol Chem*. 1994;269:31097–31106.
 28. Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, Ben-Yaakov K, Shaked M, Seger R, Eisenstein M, Fainzilber M. Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol*. 2006;364:938–944. doi: 10.1016/j.jmb.2006.09.056.
 29. Humbert M. Impression, sunset. *Circulation*. 2013;127:1098–1100. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001460.
 30. Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselien I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:81–88. doi: 10.1164/rccm.200707-1037OC.
 31. Huertas A, Perros F, Tu L, Cohen-Kaminsky S, Montani D, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M. Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay. *Circulation*. 2014;129:1332–1340. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004555.
 32. Lepetit H, Eddahibi S, Fadel E, Frisdal E, Munaut C, Noel A, Humbert M, Adnot S, D'Ortho MP, Lafuma C. Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2005;25:834–842. doi: 10.1183/09031936.05.00072504.
 33. Vieillard-Baron A, Frisdal E, Eddahibi S, Deprez I, Baker AH, Newby AC, Berger P, Levame M, Raffestin B, Adnot S, d'Ortho MP. Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats. *Circ Res*. 2000;87:418–425.
 34. Cohen-Kaminsky S, Hautefort A, Price L, Humbert M, Perros F. Inflammation in pulmonary hypertension: what we know and what we could logically and safely target first. *Drug Discov Today*. 2014;19:1251–1256. doi: 10.1016/j.drudis.2014.04.007.
 35. Kasahara Y, Kimura H, Kurosu K, Sugito K, Mukaida N, Matsushima K, Kuriyama T. MCAF/MCP-1 protein expression in a rat model for pulmonary hypertension induced by monocrotaline. *Chest*. 1998;114(suppl):67S.

36. Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, Dartevielle P, Simonneau G, Adnot S, Eddahibi S. Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:1041–1047. doi: 10.1164/rccm.200610-1559OC.
37. Gambaryan N, Cohen-Kaminsky S, Montani D, Girerd B, Huertas A, Seferian A, Humbert M, Perros F. Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2012;39:210–212. doi: 10.1183/09031936.00039811.
38. Hautefort A, Girerd B, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Price L, Lambrecht BN, Humbert M, Perros F. T-helper 17 cell polarization in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2015;147:1610–1620. doi: 10.1378/chest.14-1678.
39. Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawa S, Sawa Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata Y, Nakaoka Y. Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:E2677–E2686. doi: 10.1073/pnas.1424774112.
40. Liu AC, Lee M, McManus BM, Choy JC. Induction of endothelial nitric oxide synthase expression by IL-17 in human vascular endothelial cells: implications for vascular remodeling in transplant vasculopathy. *J Immunol*. 2012;188:1544–1550. doi: 10.4049/jimmunol.1102527.
41. Tang B, Li Y, Nagaraj C, Morty RE, Gabor S, Stacher E, Voswinckel R, Weissmann N, Leithner K, Olschewski H, Olschewski A. Endothelin-1 inhibits background two-pore domain channel TASK-1 in primary human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41:476–483. doi: 10.1165/rcmb.2008-0412OC.
42. Seyler C, Duthil-Straub E, Zitron E, Gierten J, Scholz EP, Fink RH, Karle CA, Becker R, Katus HA, Thomas D. TASK1 (K(2P)3.1) K(+) channel inhibition by endothelin-1 is mediated through Rho kinase-dependent phosphorylation. *Br J Pharmacol*. 2012;165:1467–1475. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01626.x.
43. Boucherat O, Chabot S, Antigny F, Perros F, Provencher S, Bonnet S. Potassium channels in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2015;46:1167–1177. doi: 10.1183/13993003.00798-2015.
44. Chittajallu R, Aguirre AA, Gallo V. Downregulation of platelet-derived growth factor-alpha receptor-mediated tyrosine kinase activity as a cellular mechanism for K⁺-channel regulation during oligodendrocyte development in situ. *J Neurosci*. 2005;25:8601–8610. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2122-05.2005.
45. Nagaraj C, Tang B, Bálint Z, Wygrecka M, Hrzenjak A, Kwapiszewska G, Stacher E, Lindenmann J, Weir EK, Olschewski H, Olschewski A. Src tyrosine kinase is crucial for potassium channel function in human pulmonary arteries. *Eur Respir J*. 2013;41:85–95. doi: 10.1183/09031936.00211811.
46. Tanabe Y, Saito-Tanji M, Morikawa Y, Kamataki A, Sawai T, Nakayama K. Role of secretory phospholipase A(2) in rhythmic contraction of pulmonary arteries of rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *J Pharmacol Sci*. 2012;119:271–281.

CLINICAL PERSPECTIVE

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe cardiopulmonary condition leading to right-sided heart failure and ultimately death. In the last 20 years, the development of drugs that specifically target pathways involved in disease pathogenesis has led to improvements in the quality of life and clinical outcomes in patients with PAH, but there is still no cure for this devastating disease. Recently, the identification of loss-of-function mutations in the gene encoding the potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) in some patients with PAH has highlighted a novel dysfunctional pathway and a potential therapeutic target. In the present study, we demonstrate that loss of function of KCNK3 is a hallmark of idiopathic and heritable PAH and experimental pulmonary hypertension. Moreover, we show that in vivo pharmacological activation of KCNK3 with the phospholipase A2 inhibitor ONO-RS-082 alleviates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats when KCNK3 is still expressed in pulmonary arteries. This suggests that this strategy might be of interest in patients with PAH who retain a residual level of KCNK3 expression, possibly within the frame of personalized therapy. A major limitation of the ONO-RS-082 compound is its phospholipase A2 inhibitory activity, which can have deleterious side effects. Identification or development of more specific molecules is thus needed to envision KCNK3 activation in humans. Alternatively, targeted gene therapy allowing KCNK3 re-expression in affected pulmonary arteries could be another possible approach.

Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension

Fabrice Antigny, Aurélie Hautefort, Jolyane Meloche, Milia Belacel-Ouari, Boris Manoury, Catherine Rucker-Martin, Christine Péchoux, François Potus, Valérie Nadeau, Eve Tremblay, Grégoire Ruffenach, Alice Bourgeois, Peter Dorfmueller, Sandra Breuils-Bonnet, Elie Fadel, Benoît Ranchoux, Philippe Jourdon, Barbara Girerd, David Montani, Steeve Provencher, Sébastien Bonnet, Gérald Simonneau, Marc Humbert and Frédéric Perros

Circulation. 2016;133:1371-1385; originally published online February 24, 2016;
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/133/14/1371>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2016/02/24/CIRCULATIONAHA.115.020951.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Supplemental data

Materials and methods

Animal models

Rats were housed at the Faculty of Pharmacy of Châtenay-Malabry (ANIMEX platform, Châtenay Malabry, France). Experiments were conducted according to the European Union regulations (Directive 86/609 EEC) for animal experiments and complied with our institution's guidelines for animal care and handling. The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N° B92-019-01). This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments CEEA26 CAP Sud. Animal experiments were supervised by Dr. Frederic Perros (agreement delivered by the French Ministry of Agriculture for animal experiment N° A92-392) and with the approval of Laval University and the IUCPQ Biosafety and Ethics Committees.

Male Wistar and Sprague–Dawley rats (200–150 g) were maintained in a temperature-controlled room with a 12:12 light–dark cycle. Both species were used in the electrophysiological experiments. Sprague–Dawley rats were used for organ-bath studies and *in vivo* plasmid transfection experiments.

In vivo experimental design: Pulmonary hypertension was induced in rats by a single monocrotaline (MCT) injection (60 mg/kg, s.c.). MCT was dissolved in 1 N HCl and neutralized with 1 N NaOH.

MCT-exposed Wistar rats were treated with ONO-RS-082 (50 mg/kg/day in **DMSO**, daily intraperitoneal injection) from days 14 to 21 in a short and late protocol, and from days 1 to day 21 with a chronic protocol. Control animals received the same volume of DMSO.

In an induction protocol, Wistar rats were exposed daily during one month to the selective KCNK3 blocker, A293. The A293 (10 mg/kg, i.p.) was dissolved in DMSO, as described by the manufacturer. Control animals received the same volume of DMSO.

Isolation of pulmonary artery smooth-muscle cells (PASMCs)

Hearts and lungs were rapidly excised into ice-cold physiological Ca²⁺-free Hank's solution-containing (in mM): 140 NaCl, 4.2 KCl, 1 MgCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 10 Hepes, and 0.1 EGTA, **10 Glucose**, at pH 7.4 (NaOH). First- to third-order intrapulmonary arteries with diameters of 2–0.2 mm were dissected and kept at 4°C for 10 min in Hank's buffer. Vessel endothelium was disrupted by rubbing the luminal

surface with a cotton swab; the fibroblast-containing adventitial layer was removed, and the PASMC-containing media was dissociated with a cocktail containing papain, DTT, and BSA. Briefly, the vessels were maintained at 4°C for 30 min in Hank's solution (without EGTA), containing papain (1 mg/mL), DTT (0.85 mg/mL), and BSA (0.75 mg/mL), and then at 37°C for 13 min. The arteries were finally washed with Hank's solution (without EGTA) supplemented with 1 mg/mL of glucose and isolated PASMCs were obtained by gentle pipetting. The external calcium concentration was progressively increased and isolated cells were plated in gelatin-coated petri dishes.

Isolation of pulmonary artery endothelial cells (PAECs)

Briefly, pulmonary arteries were treated with 0.2 mg/mL of DTT and 0.2 mg/mL of papain in HBSS for 45 min at 37°C. The pulmonary arteries (PA) were then removed from the enzymatic solution and placed in 1 mL of HBSS containing 2 mg/mL BSA. Single pulmonary endothelial cells and endothelial sheets were then released by gentle trituration with small-bore fire-polished Pasteur pipettes. Isolated cells were incubated for 10 min with fluorescein lectin (Tomato Lectin from Vector Labs; FL-1171). Tomato Lectin from *Lycopersicon esculentum* is an effective marker for vascular endothelium in rodents.

Isometric tension measurement

Briefly, second-order IPA segments (length: 1.4–2 mm) were mounted on the jaws of a myograph using a 25- μ m tungsten wire. The tissues were bathed in Krebs–Henseleit (KH) solution containing (in mM): NaCl 119, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.17, KH₂PO₄ 1.18, NaHCO₃ 25, and glucose 11, at 37°C and continuously aerated with a mixture of CO₂ and O₂ (5%/95%). Each vessel was then submitted to a normalization procedure¹³. Afterwards, the internal circumference of the vessels was set to 90% of the circumference that the vessels would have *in situ* if held with a transmural pressure of 30 mmHg. Vessels were allowed to equilibrate for 40–60 min. Vessels were then contracted with a solution containing 80 mM of K⁺ (K80). Its composition was otherwise similar to the KH solution except that NaCl that was exchanged on an equimolar basis for KCl. After 10 min, the vessels were washed with KH solution for 30 min and a challenge with K80 was repeated. The contractile responses were expressed as a percentage of the response to the second K80 challenge.

Multiplex data

We performed simultaneous quantification of recognized serum biomarkers of cardiovascular diseases in sera from control and A293-treated rats with Millipore's Milliplex (Millipore, Molsheim, France). The Milliplex Map Rat Vascular Injury Magnetic Bead Panel 1 – Toxicity Multiplex Assay (Millipore, RV1MAG-26K) was used for simultaneous quantification of Caveolin-1, CINC-1/GRO/KC, CTGF, IL-6, MCP-1, PAI-1 (total), TIMP-1, TNF α , VEGF. The Milliplex Map Rat Vascular Injury Magnetic Bead Panel 2 – Toxicity Multiplex Assay (Millipore, RV2MAG-26K) was used for simultaneous quantification of Adiponectin, sE-Selectin, sICAM-1, von Willebrand Factor (vWF). Milliplex plates were read with a Luminex 200 (Millipore). Data were analyzed with Bioplex manager software, version 6.1 (Biorad). Milliplex experiments were performed at the Plate-forme Cardiex-Therassay (University of Nantes, France).

Western-blot analyses

Human or rat lung-tissue samples were prepared as previously described¹⁴: i.e., 40 μ g of protein was separated on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. After blocking, membranes were incubated in T-TBS and 5% nonfat milk overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit anti-KCNK3 polyclonal antibody (1:800, Abcam, ab49433), mouse anti-Vimentin (1/200 Santa Cruz Biotechnology clone V9, sc-6260) rabbit anti-ERK1/2 (Cell Signaling, 9102), rabbit anti-Phospho-ERK1/2 (Cell Signaling, 9101S), rabbit anti-phospho-S55-vimentin (Abcam, ab22651), and mouse monoclonal antibody against β -Actin (Sigma, A2228) 1:2000. Blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse diluted 1:10,000 (Cell Signaling) or with HRP-conjugated goat anti-rabbit diluted 1:5000 (Cell Signaling), respectively. Antibodies were revealed using ECL reagents (Perkin–Elmer). Image-J Software was used to quantify the level of protein expression.

Immunofluorescence staining

Frozen lung sections (6 μ m) were air dried. Sections were fixed with paraformaldehyde (PFA 4%) for 10 min at room temperature. Free aldehyde groups from PFA fixation were quenched for 10 min with

50 mM NH₄Cl solution. Sections were saturated with human (10%) or rat serum (10%) in PBS for 1 h at room temperature. We used primary antibodies against KCNK3 (1/300, Abcam, ab49433) and α -Smooth Muscle Actin (α -SMA, Sigma, F3777) (1/200). Detection of primary antibodies was with secondary antibodies from goat anti-mouse and goat anti-rabbit (1/200). Slides were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

To evaluate cell proliferation in rats, we visualized incorporation of exogenously supplied 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) to identify cells undergoing DNA replication. EdU was injected intraperitoneally into the rats at 50 μ g/g, at 24 h before sacrifice. EdU staining was performed using a Click-iT EdU imaging kit (C10337, Life Technologies) on frozen sections according to the manufacturer's instructions. To characterize EdU-positive cells, we performed double immunostains with mouse anti-CD34 (Clone QBEnd 10, Dako, 1/200) or mouse anti-Vimentin-TRITC (Santa Cruz Biotechnology clone V9, 1/100), rabbit anti-CD4 (Cell signaling, 1/100), rabbit anti-CD8 (Cell Signaling, 1/100), FITC-labelled anti- α -SMA FITC (clone 1A4, Sigma-Aldrich, Lyon, France, 1/100), and mouse anti-CD68 (Serotec) after EdU staining. Images were recorded under a LSM 700 microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with 405-, 488-, 555-, and 639-nm lasers (Carl Zeiss), and analyzed with ZEN software (Carl Zeiss).

Transmission electron microscopy (TEM) and correlative light and electron microscopy (CLEM)

To determine the ultrastructural localization of KCNK3, correlative light and electron microscopy (CLEM) was used after immuno-labeling. This approach allowed pre-selection of areas with features of interest for detailed ultrastructural study by TEM. Samples of human lung specimens (~2 cm³) were embedded and frozen after fixation in 4% paraformaldehyde and immersed in 10% and then 40% sucrose solutions. Indirect immunofluorescence was performed on frozen sections (10 μ m) collected onto Correlative Microscopy Coverslips® (Delta Microscopies, France). After overnight incubation at 4°C, rabbit polyclonal antibody (KCNK3 1/300 Ab83725 from Abcam) was revealed by goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488 FluoroNanogold™ (Nanoprobes, LGF Distribution Echirrolles, France), the slides were examined with a confocal microscope (LSM700; Carl Zeiss, Le Pecq, France), and images were

acquired with Zen software (Centre Chirurgical Marie Lannelongue Microscopy and Imaging Facility, Le-Plessis-Robinson, France).

Afterwards, the thick cryo-sections were fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 5 min at room temperature, quenched with glycine 50 mM, and rinsed before processing for gold amplification. One drop of gold preparation (Gold enhance EM/blot, Nanoprobes, LGF Distribution Echirolles, France) was applied onto sections for 20 min. After rinsing, the sections were post-fixed with 0.5% osmium tetroxide, gradually dehydrated in ethanol (50–100%) and embedded in Epon. Sections (0.5-micron) were placed on glass slides and counter-stained with methylene blue-azur II. Sections were imaged with an epifluorescent microscope (DMRB, Leica, France) and a 25× plan apochromat oil immersion lens. Acquisition was performed using a CCD camera (Olympus DP50) and processed with Adobe Photoshop CS software (VWR, France). Thin sections (70 nm) were collected onto 150-mesh Cooper grids, and counter-stained with 0.05% Oolong Tea Extract for 30 min (DeltaMicroscopies, France) and lead citrate before examination under a HITACHI HT7700 electron microscope operated at 80 kV and equipped with an 8-million pixel format CCD camera driven by AMT image-capture software, version 6.02 (MIMA2 MET – UMR 1313 GABI, INRA, Equipe Plateformes, 78352 Jouy-en-Josas, France).

Supplemental figures

Supplemental Figure 1. K2P and Kv channel expression in pulmonary arteries from Wistar and Sprague–Dawley rats. mRNA expression of several K2P and Kv channels on isolated pulmonary arteries from control Wistar and control Sprague–Dawley rats ($n=4$ for both Wistar and Sprague–Dawley rats).

Supplemental Figure 2. Transmission electron microscopy of arteries from control rats and MCT-PH rat lungs after KCNK3 labeling. **A**, Electron microscopy of a pulmonary artery from control rats. At higher magnification, Smooth muscle cells (SMC) (A1–A2) and endothelial cells (EC) (A3) exhibited gold particles (white arrows) mainly localized along the plasma membrane or at the EC cell junction (A3). **B**, Electron microscopy of a pulmonary artery from a MCT-PH rat. At higher magnification, SMC (B1-B3) and EC (B4) exhibited a low number of gold particles (white arrows), which are mainly trapped in the ER compartment (B3) and are absent from the cell-plasma membrane.

Col = Collagen, ECM = extracellular matrix, E = elastic, N = nucleus, RBC = red blood cell, WPB = Weibel–Palade body.

Supplemental Figure 3, Function and expression of Kv channels during PH development. **A**, mRNA-level expression of several K2P and Kv channels (known to be expressed on isolated PA) from control and MCT-PH rats (3 weeks after MCT exposure) ($n=3$). **B**, Current–voltage relationship between global K^+ current obtained by the depolarizing step protocol (holding potential at -40mV , step -80 mV to $+60\text{ mV}$) in freshly isolated PASMCs from control and MCT-PAH rats (1 and 3 weeks after MCT exposure). **C**, Quantification of I_K measured at 10 mV recorded in freshly isolated PASMCs (controls and MCT-PH, $n=13-25$). Data are means \pm SEM. ns: not significant, ***: $P < 0.005$

Supplemental Figure 4, Characterization of the A293-sensitive current in freshly isolated PASMCs from control rats. **A**, Current–voltage relationship curve of global K^+ current under basal conditions in the presence of 200 nM and $1\text{ }\mu\text{M}$ of A293. **B**, Percentage of K^+ current inhibition with different concentrations of A293. **C**, Inward ramp current ($+60\text{mV}$ to -100mV for 100 ms) with tetraethyl-ammonium (TEA) plus glibenclamide (Glib) (black curve) and after addition of A293 (200 nM) ($n=4$). Data are means \pm SEM. ns: not significant, ***: $P < 0.005$ Effect of 200 nM of A293 on rat pulmonary-artery tone. **D**, Quantification of the contractile responses induced by the addition of A293 (200 nM) to resting PA in the presence of Bay K 8644 ($1\text{ }\mu\text{M}$) or vehicle. Data are means \pm SEM. $n=5-6$. *: $P < 0.05$ (Mann–Whitney comparison); #: $P < 0.05$ (Wilcoxon paired test). **E**, Dose response curve established by applying increasing concentrations of U46619 (thromboxane A2 mimetic, 1 nM to $3\text{ }\mu\text{M}$) in the presence of A293 (200 nM) or vehicle. $n=5$.

Supplemental Figure 5. Excessive microvascular EC, SMC, and fibroblast proliferation in A293-treated rats. Immunofluorescent staining of frozen sections from control and A293-treated animals and confocal imaging with Click-iT EdU stain (white nuclei = proliferating cells) and α -smooth-muscle actin (α -SMA in green), in combination with **A**. CD90 stain (in red), **B**. Fibronectin stain (in red). Counterstain = 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, in blue).

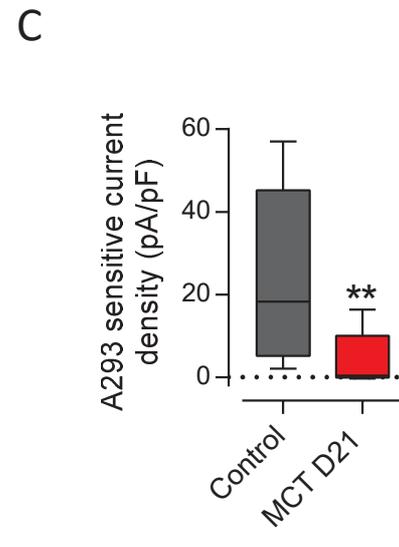
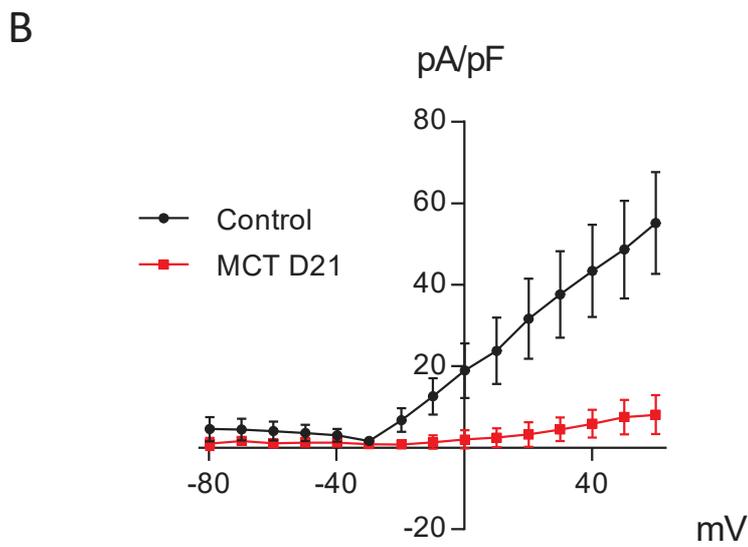
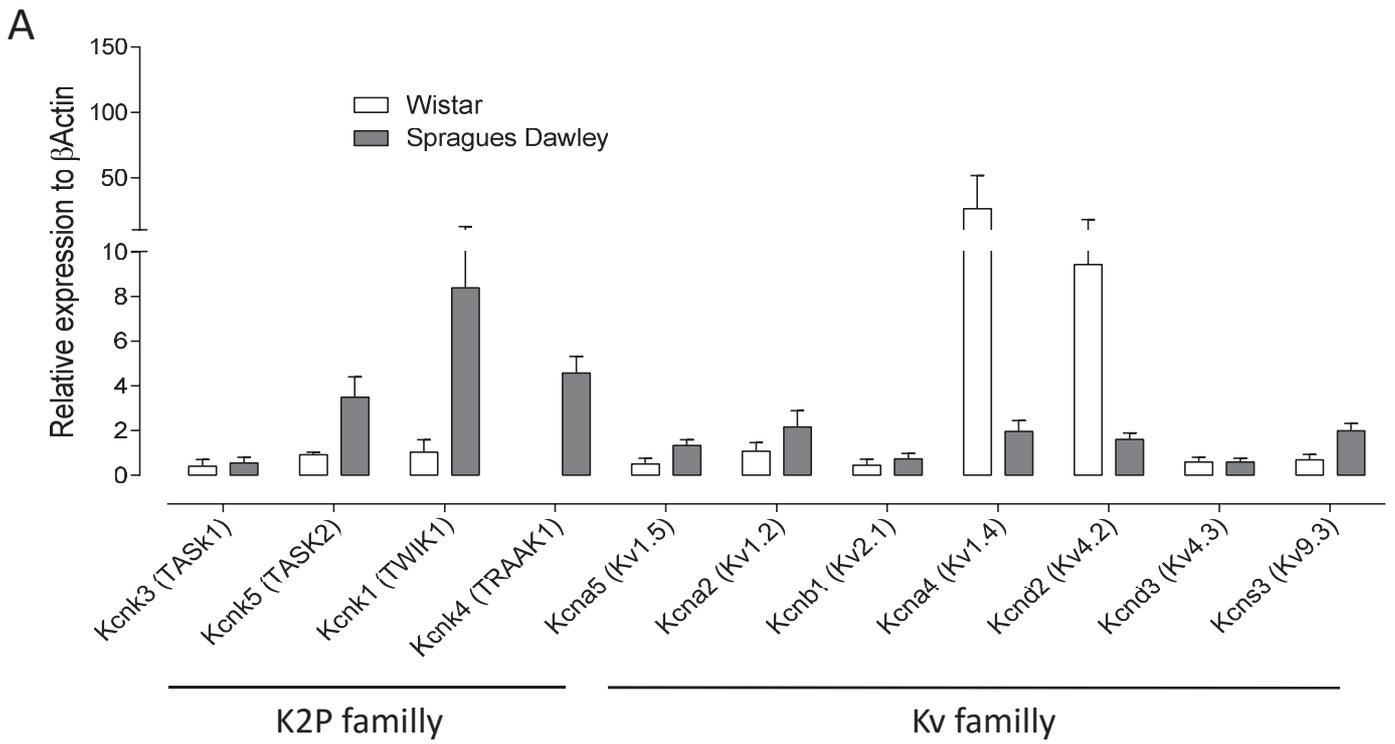
Supplemental Figure 6: Abnormal proliferation of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells in A293-treated rats. Immunofluorescent staining of frozen sections from control and A293-treated animals and confocal imaging with Click-iT EdU stain (white nuclei = proliferating cells) and α -smooth-muscle actin (α -SMA

in green), in combination with **A.** CD4 stain (in red), **B.** CD8 stain (in red). Counterstain = 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, in blue).

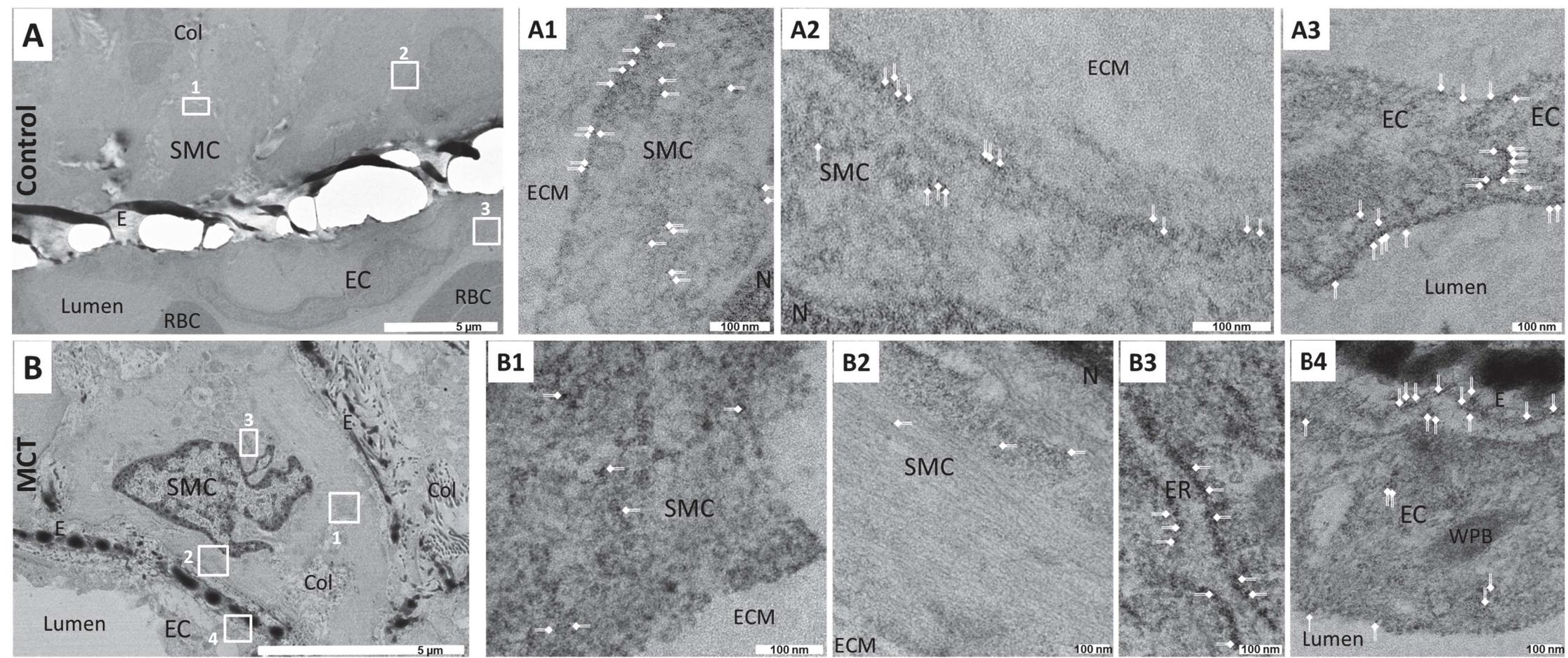
Supplemental Figure 7. Targeting KCNK3 activity from days 14 to 21 via ONO-RS-082 treatment is inefficient at alleviating pulmonary hypertension (PH) in MCT-rats. **A,** Each cell was treated with tetraethyl-ammonium (TEA) plus glibenclamide (Glib) plus 4 aminopyridine (**AP**) for 1–2 min (to inhibit all K⁺ current excepted for KCNK3), then ONO-RS-082 was applied (10 μM) for 8 min. At maximal current amplitude, acidic pH (pH 6.3) was applied to inhibit KCNK3 (*n*=2). **B,** The current–voltage relationship curve for global K⁺ current in basal conditions (black trace), in the presence of 10 μM of ONO-RS-082 (red trace), and after addition of 10 mM TEA + 10 μM Glib + 3 mM 4- AP) (blue trace). **C,** *In vivo* experiments. ONO-RS-082 (50 mg/kg per day) was administrated to MCT-PH rats by intraperitoneal injection during the last week of developing PH. Cardiac output (mL.min⁻¹) (left panel), right ventricular systolic pressure (RVSP) (mmHg) (middle panel), Fulton index (right panel). Data are means ± SEM. ns: not significant. **: *P* <0.01

Gene	Primer reference	Species
KCNK3	Rn04223042_m1	Rat
KCNK5	Rn01755927_m1	Rat
KCNK1	Rn00572452_m1	Rat
KCNK4	Rn00587450_m1	Rat
KCNA5	Rn00564245_s1	Rat
KCNA2	Rn02769834_s1	Rat
KCNB1	Rn00755102_m1	Rat
KCNA4	Rn02532059_s1	Rat
KCND2	Rn00581941_m1	Rat
KCND3	Rn04339183_m1	Rat
KCNS3	Rn00582330_s1	Rat
Serpina1	Rn00574670_m1	Rat
KCNK3	Hs00605529_m1	Human
β -Actin	Hs01060665_g1	Human
β -Actin	Rn00667869_m1	Rat
CXCL1	Rn00578225_m1	Rat
CCl2	Rn00580555_m1	Rat
TIMP-1	Rn01430873_g1	Rat
IL17Ra	Rn01493027_m1	Rat
IL17a	Rn01757168_m1	Rat
CxCl12	Rn00573260_m1	Rat
PDGFRb	Rn00709573_m1	Rat
PDGFb	Rn01502596_m1	Rat
Kv1.5	Rn00564245_s1	Rat
Kv2.1	Rn00755102_m1	Rat

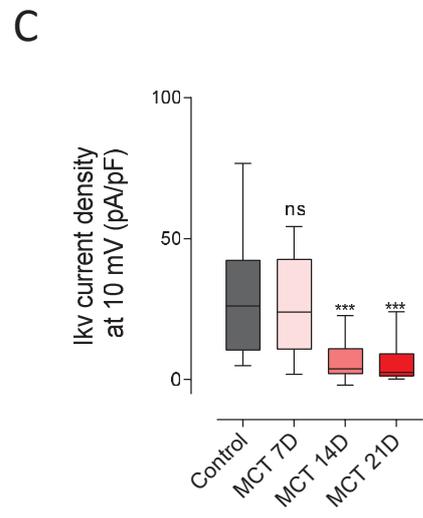
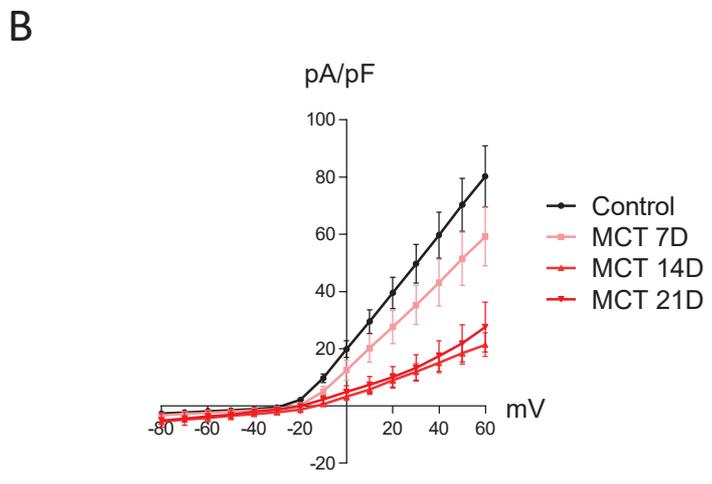
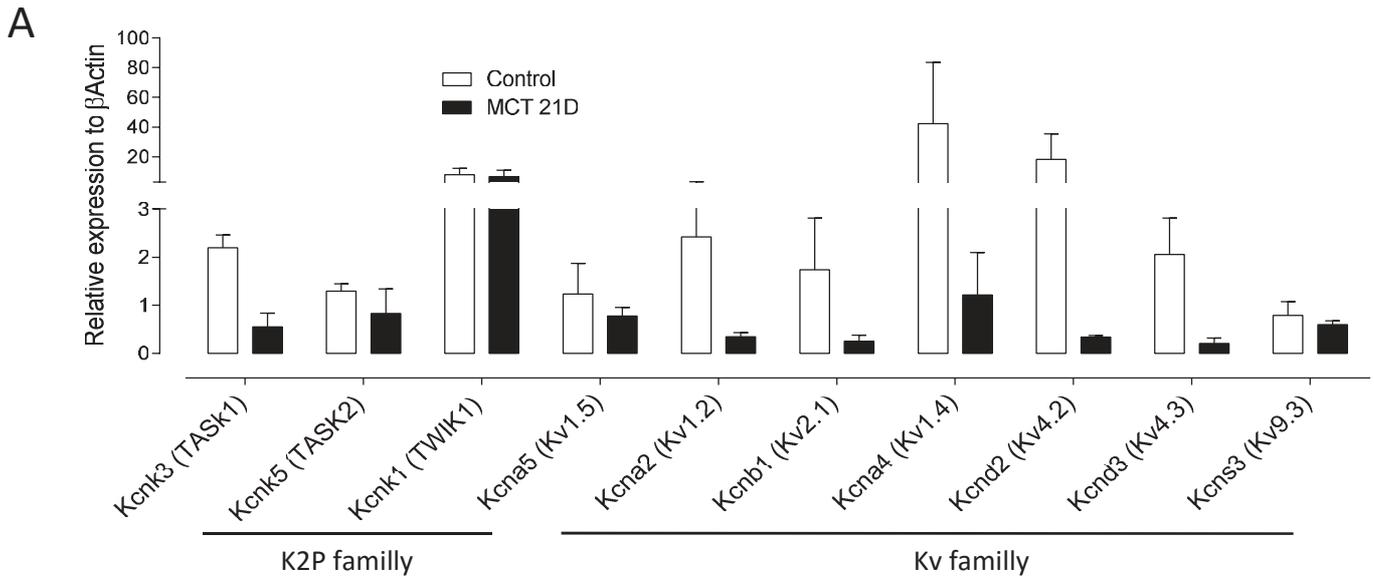
Table 1 : Sequence of primers used for Quantitative RT-PCR.



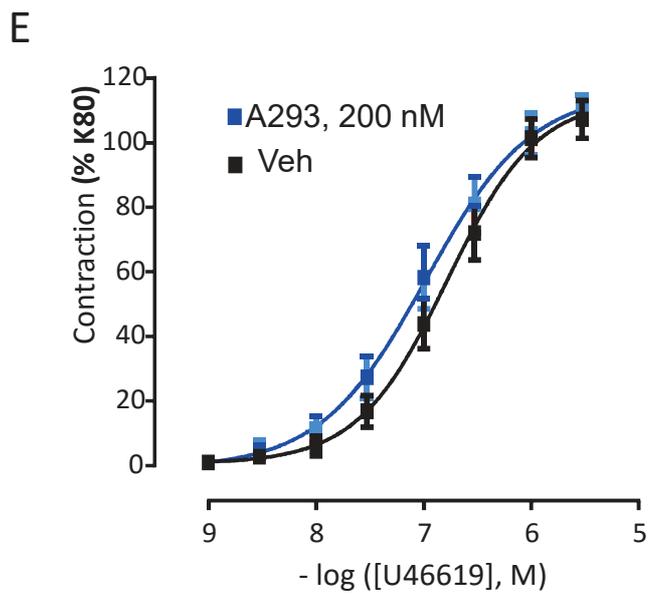
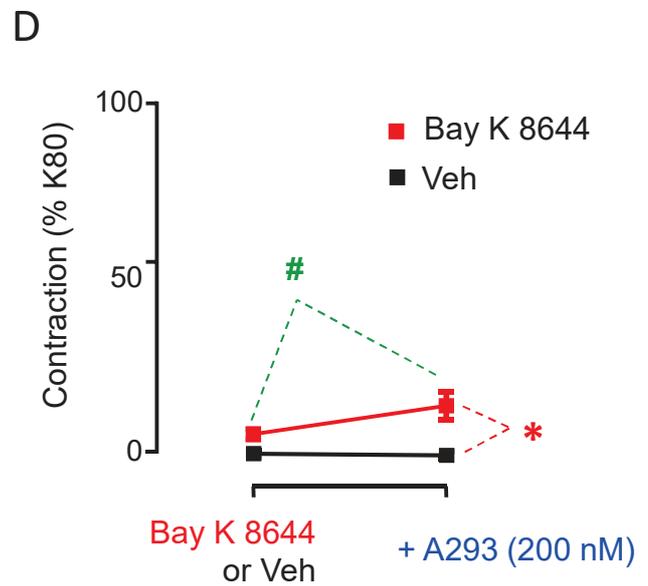
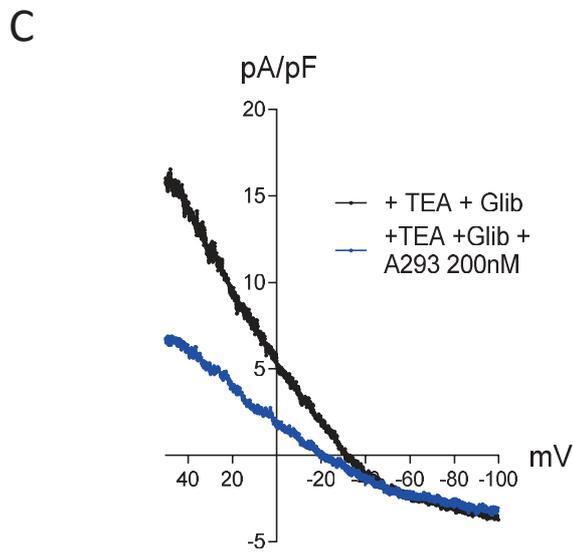
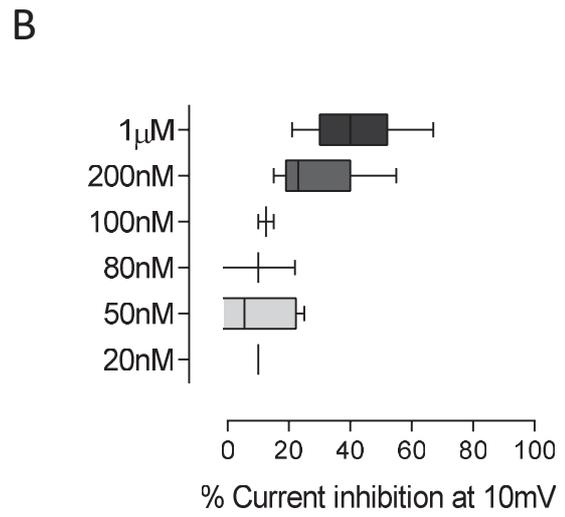
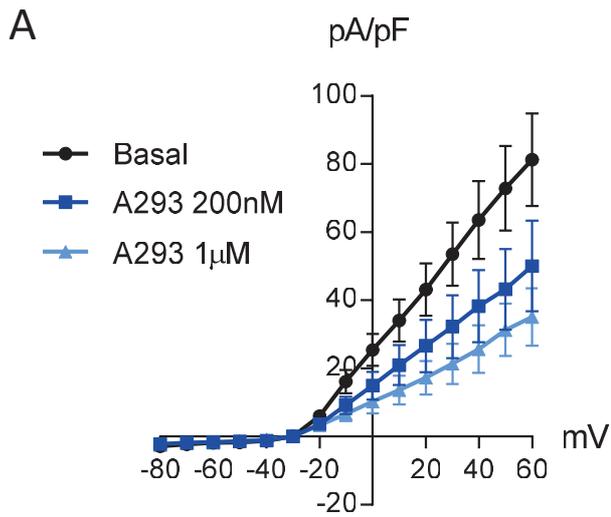
Supplemental Figure 1



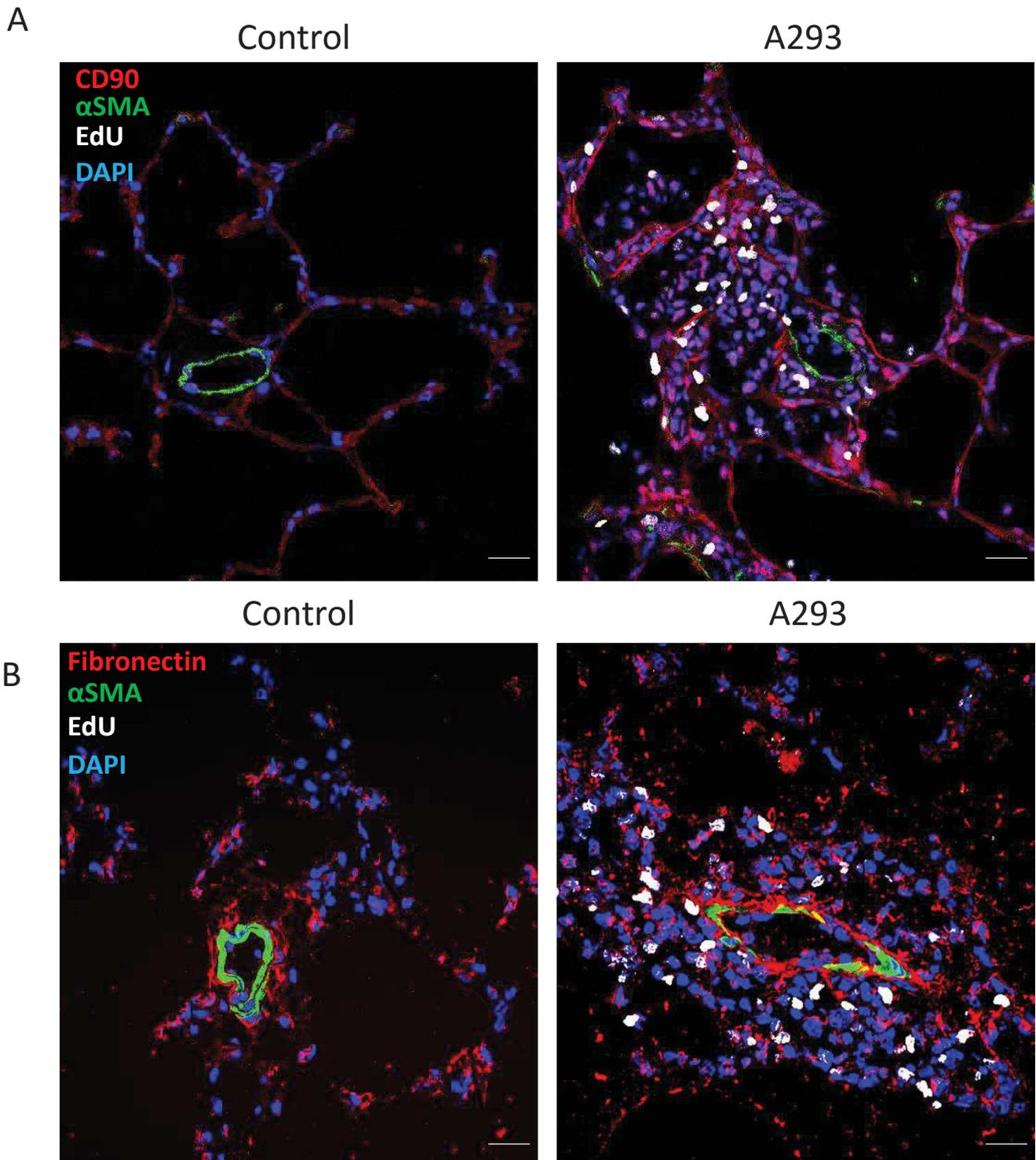
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3

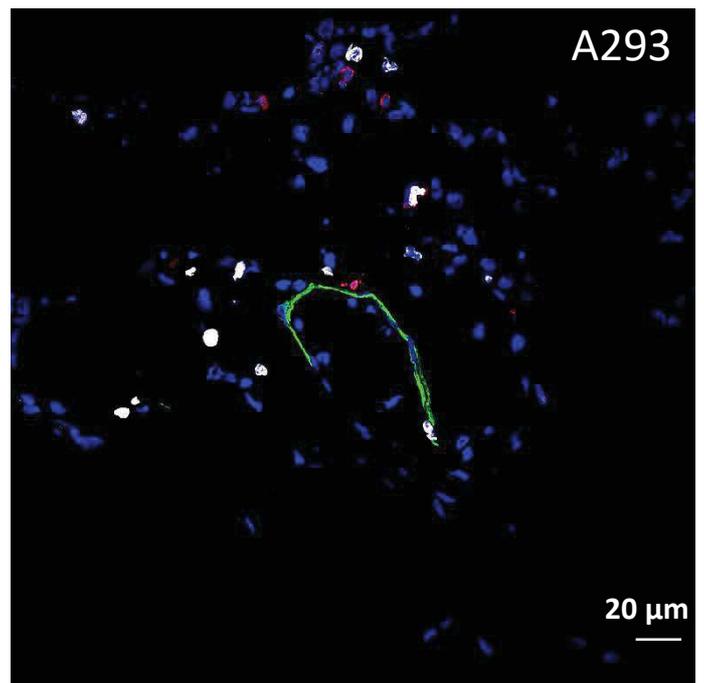
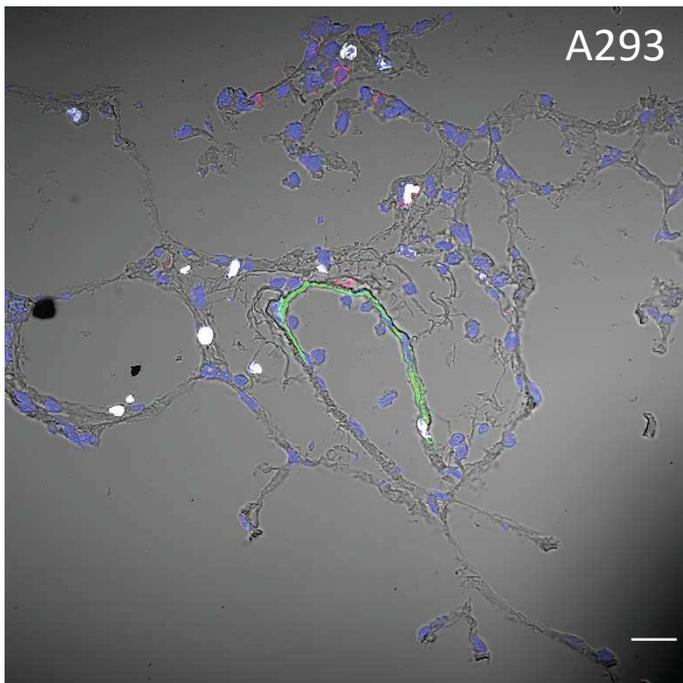
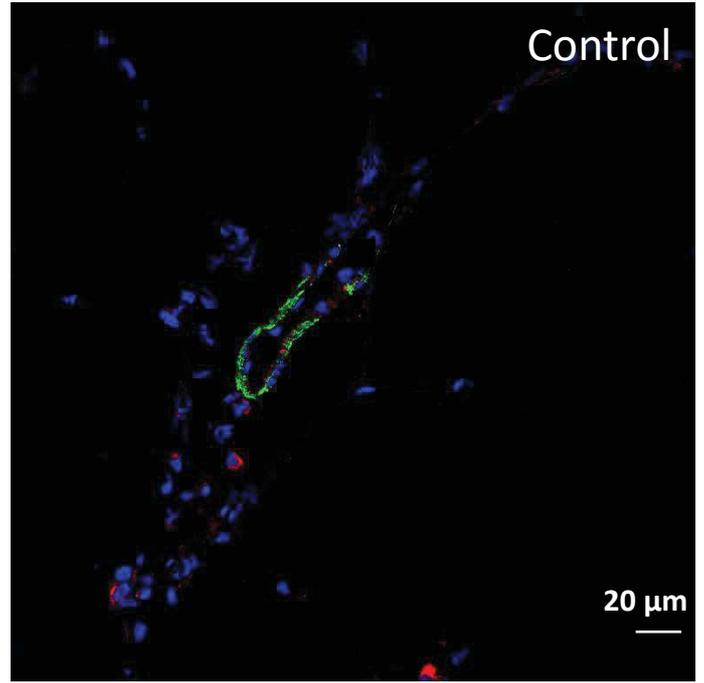
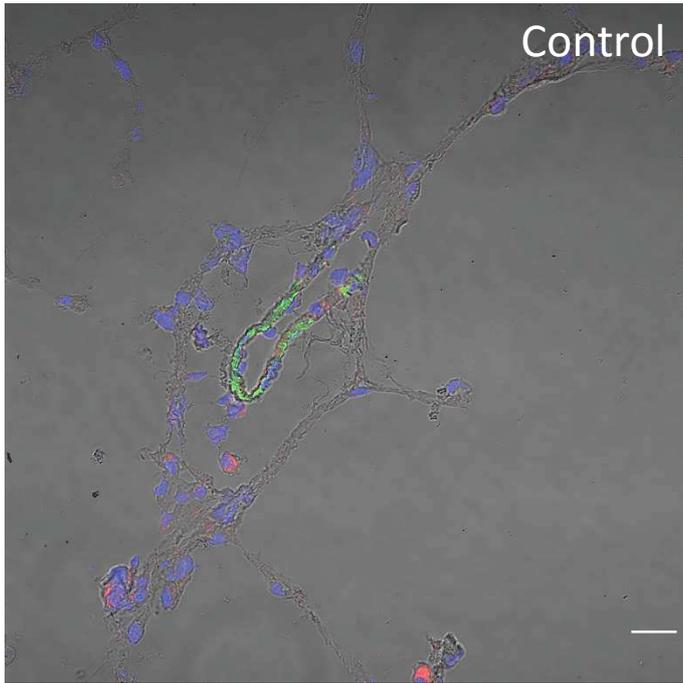


Supplemental Figure 4



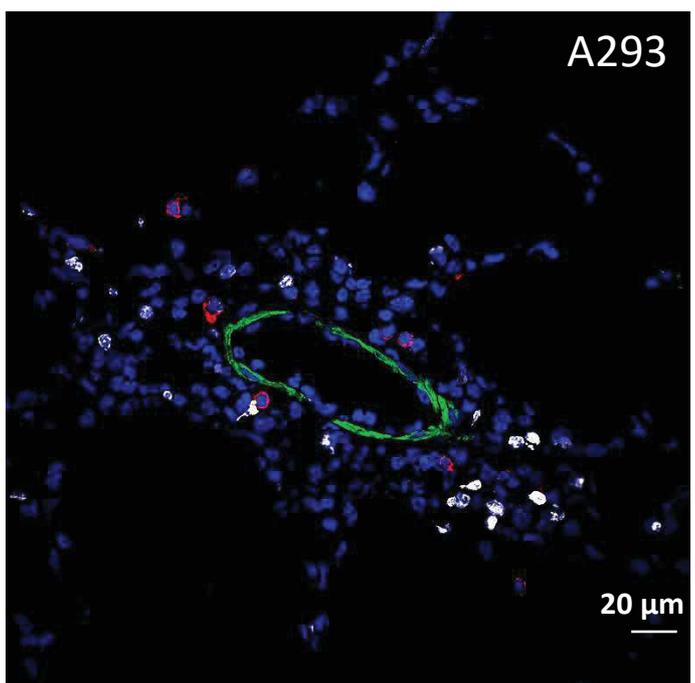
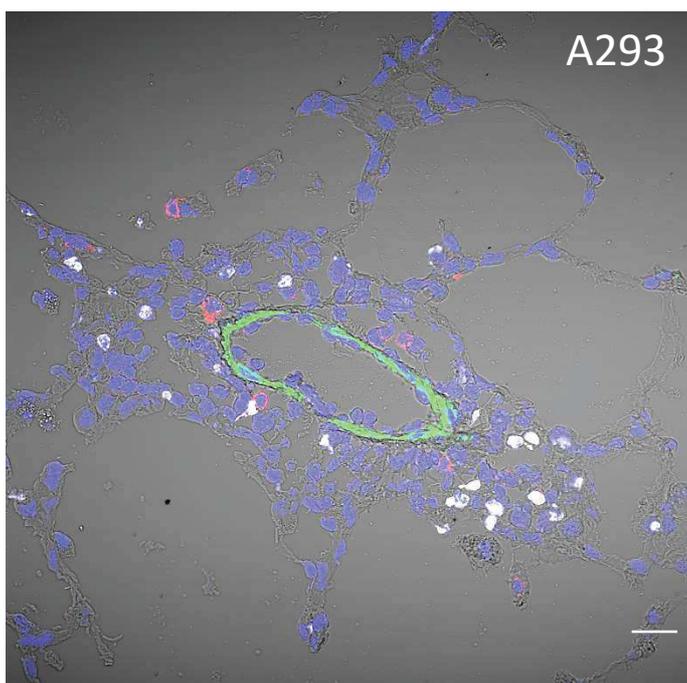
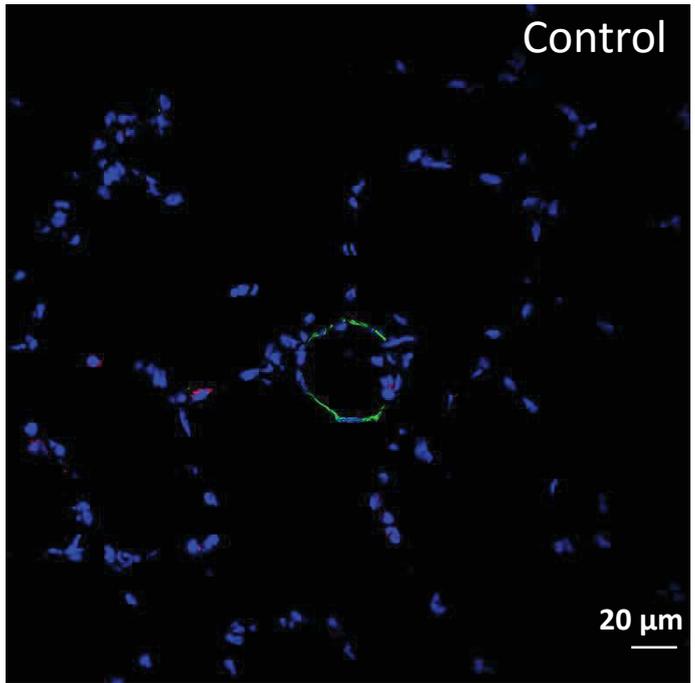
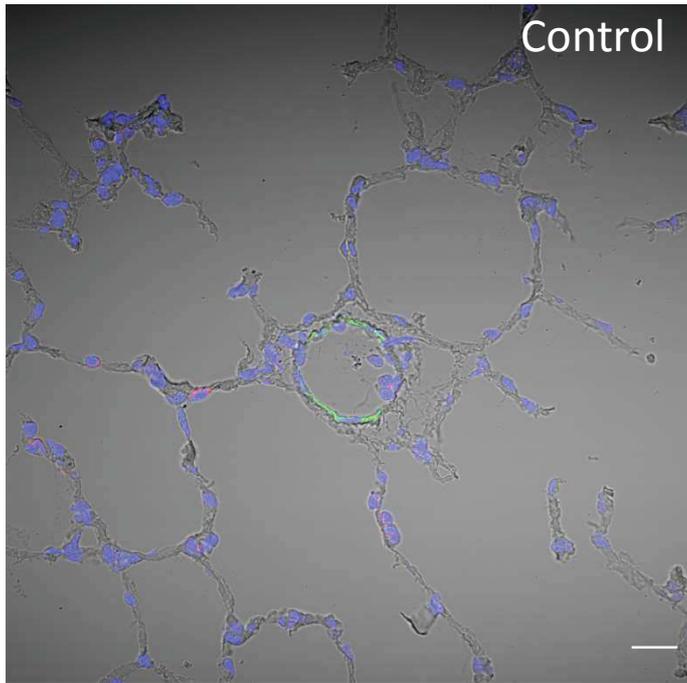
Supplemental Figure 5

A Dapi+Edu+ α SMA+CD4

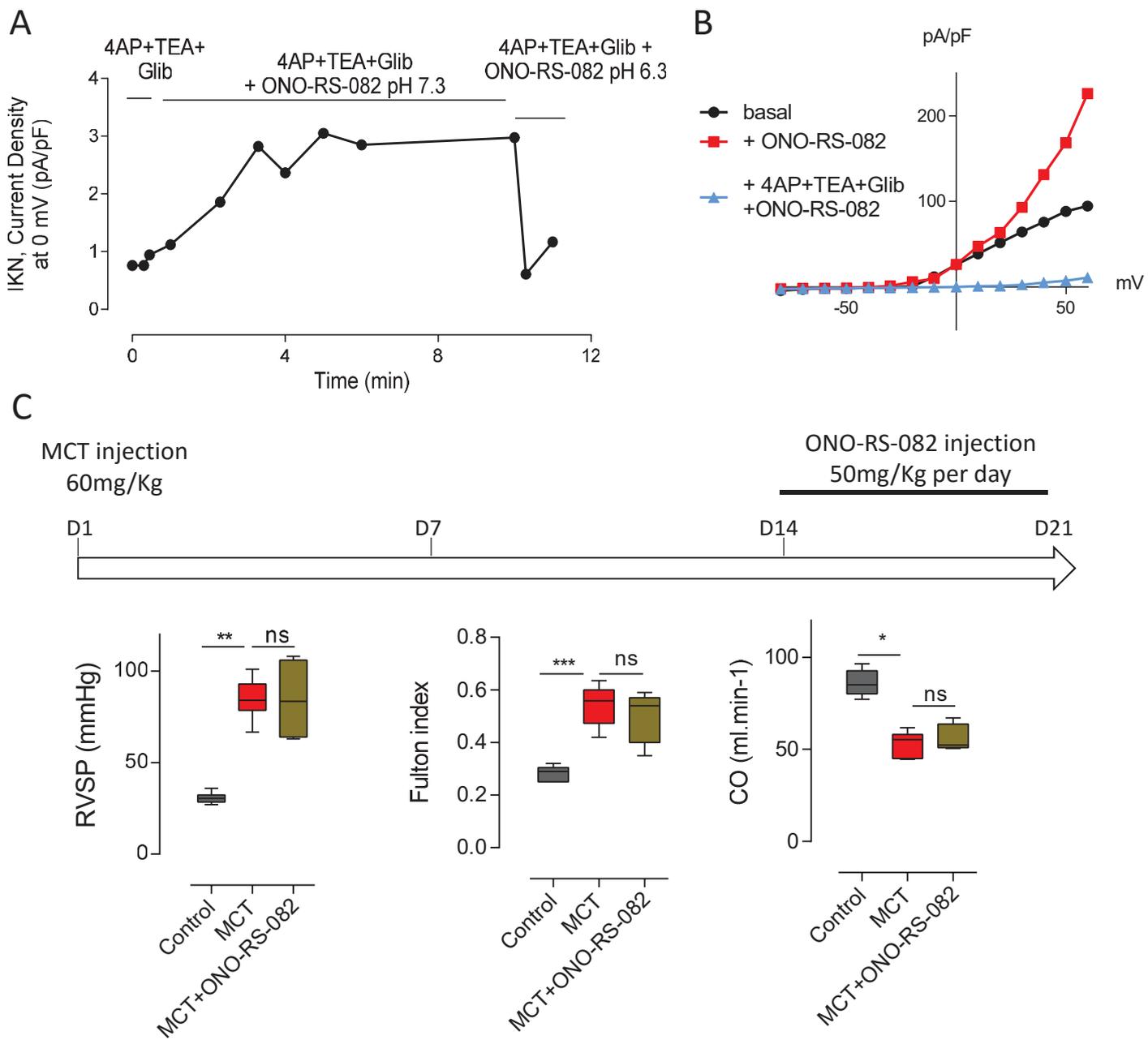


Supplemental Figure 6A

B Dapi+Edu+ α SMA+CD8



Supplemental Figure 6B



Supplemental Figure 7

II. Revue : *"Cyclic nucleotide Phosphodiesterases in cardiac and vascular smooth muscles : a therapeutic perspective"*

Bobin P*, **Belacel-Ouari M***, Bedioune I, Zhang L, Leroy J, Leblais V, Fischmeister R, Vandecasteele G.

*: Equal contributors.

Archives of Cardiovascular Diseases. 109(6-7): 431-43, 2016.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



REVIEW

Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective



Phosphodiesterases des nucléotides cycliques dans le cœur et les vaisseaux : une perspective thérapeutique

Pierre Bobin¹, Milia Belacel-Ouari¹,
Ibrahim Bedioune, Liang Zhang, Jérôme Leroy,
Véronique Leblais, Rodolphe Fischmeister*,
Grégoire Vandecasteele*

UMR-S 1180, INSERM, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

Received 3 December 2015; received in revised form 28 January 2016; accepted 2 February 2016
Available online 13 May 2016

KEYWORDS

cAMP;
cGMP;

Summary Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) degrade the second messengers cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP), thereby regulating multiple aspects of cardiac and vascular muscle functions. This highly diverse class of enzymes encoded by 21 genes encompasses 11 families that are not only responsible for the

Abbreviations: AKAP, A-kinase anchoring protein; β -AR, β -adrenergic receptor; Ca^{2+} , calcium; CaMKII, Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; Epac, exchange protein directly activated by cAMP; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GC, guanylate cyclase; Gs, heterotrimeric G-protein stimulating adenylyl cyclase; HF, heart failure; KO, knock out; LTCC, L-type Ca^{2+} channel; NO, nitric oxide; PAH, pulmonary arterial hypertension; PDE, phosphodiesterase; PLB, phospholamban; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; RyR2, ryanodine receptor; SERCA, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -adenosine triphosphatase; SMC, smooth muscle cell; VEGF, vascular endothelial growth factor; VSMC, vascular smooth muscle cell.

* Corresponding authors. UMR-S1180, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

E-mail addresses: rodolphe.fischmeister@inserm.fr (R. Fischmeister), gregoire.vandecasteele@u-psud.fr (G. Vandecasteele).

¹ Equal contributors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.acvd.2016.02.004>

1875-2136/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Cyclic nucleotide phosphodiesterases; Cardiovascular diseases

termination of cyclic nucleotide signalling, but are also involved in the generation of dynamic microdomains of cAMP and cGMP, controlling specific cell functions in response to various neuro-hormonal stimuli. In the myocardium and vascular smooth muscle, the PDE3 and PDE4 families predominate, degrading cAMP and thereby regulating cardiac excitation-contraction coupling and smooth muscle contractile tone. PDE3 inhibitors are positive inotropes and vasodilators in humans, but their use is limited to acute heart failure and intermittent claudication. PDE5 is particularly important for the degradation of cGMP in vascular smooth muscle, and PDE5 inhibitors are used to treat erectile dysfunction and pulmonary hypertension. There is experimental evidence that these PDEs, as well as other PDE families, including PDE1, PDE2 and PDE9, may play important roles in cardiac diseases, such as hypertrophy and heart failure, as well as several vascular diseases. After a brief presentation of the cyclic nucleotide pathways in cardiac and vascular cells, and the major characteristics of the PDE superfamily, this review will focus on the current use of PDE inhibitors in cardiovascular diseases, and the recent research developments that could lead to better exploitation of the therapeutic potential of these enzymes in the future.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

AMPC ;
GMPc ;
Phosphodiesterase des nucléotides cycliques ;
Maladies cardiovasculaires

Résumé Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE) dégradent les seconds messagers AMPc et GMPc, régulant ainsi de multiples aspects des fonctions cardiaque et vasculaire. Cette classe d'enzymes très diversifiée, codée par vingt et un gènes, englobe onze familles responsables de la terminaison des signaux transmis par les nucléotides cycliques, et sont impliqués dans la génération de microdomaines dynamiques d'AMPc et de GMPc contrôlant des fonctions spécifiques des cellules en réponse à divers stimuli neuro-hormonaux. Dans le myocarde et le muscle lisse vasculaire, les PDE3 et PDE4 sont prédominantes pour dégrader l'AMPc et régulent le couplage excitation-contraction cardiaque et le tonus contractile des muscles lisses. Les inhibiteurs de PDE3 sont inotropes positifs et vasodilatateurs chez l'homme, mais leur utilisation est limitée au traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë et de la claudication intermittente. La PDE5 est importante pour dégrader le GMPc dans le muscle lisse vasculaire, et les inhibiteurs de PDE5 sont utilisés pour traiter la dysfonction érectile et l'hypertension pulmonaire. Des travaux expérimentaux suggèrent que ces PDE ainsi que d'autres familles de PDE, en particulier PDE1, PDE2 et PDE9 jouent également un rôle important dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque ainsi que dans plusieurs maladies vasculaires. Après avoir donné un bref aperçu des voies des nucléotides cycliques dans les cellules cardiaques et vasculaires et des principales caractéristiques des PDEs, cette revue présentera les utilisations actuelles des inhibiteurs de PDE dans les maladies cardiovasculaires et les progrès de recherche récents susceptibles de conduire à une meilleure exploitation du potentiel thérapeutique de ces enzymes dans le futur.

© 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Background

The cyclic nucleotides cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) participate in the main pathways regulating cardiac and vascular functions; they act as second messengers for sympathetic and parasympathetic systems, nitric oxide (NO) and natriuretic peptides. Cyclic nucleotides may exert beneficial or deleterious effects on the heart and vessels, depending on the strength and duration of the stimulation. Acute elevation of cyclic nucleotides regulates cardiac excitation-contraction coupling and vascular contractile tone. However, chronic elevation of cAMP contributes to the development of cardiac hypertrophy and progression to

heart failure (HF), while cGMP possesses antihypertrophic properties. In vessels, cAMP and cGMP exert antiproliferative and antimigratory properties, therefore limiting atherosclerosis and angiogenesis. These second messengers also regulate endothelial barrier function, the disruption of which is associated with several pathological conditions, such as oedema and sepsis. The amplitude, duration and localization of cyclic nucleotide responses are determined by the balance between synthesis of cAMP and cGMP by adenylyl and guanylyl cyclases, respectively, and degradation by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs).

PDEs represent the main route to the rapid lowering of cyclic nucleotide concentrations inside the cells, and constitute a highly diverse superfamily of enzymes. The

different enzymatic properties and localization patterns of the multiple PDE isoforms within the cell play a role in cyclic nucleotide compartmentation, which is critical for determining specific physiological responses [1,2]. In addition, modification of the expression and activity of specific PDEs is observed in several cardiovascular diseases. Thus, the members of the PDE superfamily are well placed to be targets for pharmacological interventions in cardiovascular diseases; indeed, some PDE inhibitors have already been approved for the treatment of acute heart failure, erectile dysfunction, pulmonary hypertension and intermittent claudication.

In the following review, we present an overview of the roles of PDEs in cardiac and vascular muscles, the current indications for PDE inhibitors in cardiovascular diseases and recent research advances, which hold promise for future therapeutic developments in cardiovascular diseases.

Regulation of cardiac and vascular cells by cyclic nucleotide pathways

In cardiac and vascular cells, cAMP is produced mainly by transmembrane adenylyl cyclases in response to catecholamines and various hormones or circulating factors acting on seven transmembrane receptors coupled to heterotrimeric G protein stimulating adenylyl cyclase (G_s). Two types of guanylate cyclase (GC) produce cGMP: the soluble GC that is activated by NO and particulate GCs, which constitute the receptors for natriuretic peptides (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide). Once synthesized, cyclic nucleotides exert their effects by acting through a number of cellular effectors, including cAMP- or cGMP-activated protein kinases (protein kinase A [PKA] or protein kinase G [PKG], respectively), cyclic nucleotide-gated ion channels and cAMP-activated guanine nucleotide exchange proteins (Epacs).

During the fight or flight response, epinephrine and norepinephrine bind to β -adrenoceptors (β -ARs) in cardiomyocytes, leading to cAMP elevation and PKA activation. PKA phosphorylation of sarcolemmal L-type calcium (Ca^{2+}) channels (LTCCs), ryanodine receptors (RyR2s), phospholamban (PLB, which controls the activity of the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -adenosine triphosphatase [Ca^{2+} -ATPase], SERCA2) and troponin I enhances the amplitude and kinetics of Ca^{2+} transients and contraction in cardiomyocytes (Fig. 1), underlying the classical positive inotropic and lusitropic effects of acute sympathetic stimulation. However, sustained stimulation of β -ARs, as occurs during hypertension or in chronic heart diseases, is detrimental to the heart, as it favours maladaptive hypertrophic remodelling, apoptosis and arrhythmias. Along with PKA, Epac is activated by cAMP, and may play an important role in this context. Epac activation triggers a signalling pathway involving the phosphates calcineurin and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), stimulating hypertrophic growth [3]. CaMKII activation, which can also result from PKA-dependent increases in Ca^{2+} , also phosphorylates RyR2, and promotes a proarrhythmogenic sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak, which may ultimately lead to chamber dilatation and HF [4] (Fig. 1).

In the heart, cGMP is often viewed as the mirror of cAMP, opposing its effects on cardiac function. Indeed, cGMP can exert negative inotropic effects via PKG-mediated inhibition of the L-type Ca^{2+} current [5,6] and phosphorylation of troponin I, to decrease myofilament sensitivity to Ca^{2+} [7]. In addition, cGMP can modulate cAMP concentrations through regulation of distinct PDEs (see below). One proposed mechanism by which cGMP-PKG signalling exerts its antihypertrophic action is by inhibiting the calcineurin pathway [8] (Fig. 1).

Cyclic nucleotides are also critical in vessels. Both cAMP-elevating factors, such as prostacyclin I2 and catecholamines through β -AR stimulation, and cGMP-elevating factors, such as NO and natriuretic peptides, relax contractile vascular smooth muscle cells (VSMCs) and inhibit the proliferation and migration of synthetic VSMCs (Fig. 2). In addition, cAMP and cGMP control endothelial cell permeability and ability to release vasoactive agents, such as NO, prostacyclin I2 or C-type natriuretic peptide [9]. Most of the effects of cAMP and cGMP appear to be mediated by the activation of PKA or PKG, leading to phosphorylation of several key proteins controlling the different vascular functions, although increasing evidence suggests a role for Epac in the regulation of endothelial barrier function and VSMC migration by cAMP [9,10].

Overview of the PDE superfamily

Eleven PDE families, which differ in their primary structure, catalytic properties, affinities for cAMP and/or cGMP and mechanisms of regulation, are known in mammals. Most PDE families are encoded by several genes, which together generate close to 100 different PDE isoforms by the use of different translation initiation sites and alternative splicing of messenger ribonucleic acid (mRNA). Specific isoforms are designated according to a common nomenclature: PDE is followed by a family number (1–11), a capital letter indicating the gene (A, B, C or D) and a final number corresponding to the splice variant. Some PDE families selectively hydrolyze cAMP (PDE4, PDE7 and PDE8), while others are specific for cGMP (PDE5, PDE6 and PDE9). A third category, the so-called dual PDEs, hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 and PDE11).

PDEs share a conserved catalytic domain (C-domain), showing approximately 25–52% amino acid sequence identity, but differ markedly in their regulatory N-domains. N-domains contain diverse elements involved in enzyme dimerization, binding of regulatory small molecules, phosphorylation and localization; they are characteristic to each family and their variants. For instance, the unique distinguishing feature of the PDE1 family is the existence of two binding sites for the Ca^{2+} -binding protein calmodulin in the N-domain, which are responsible for enzyme stimulation by Ca^{2+} . Other important domains found in several PDE families (PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 and PDE11) are the so-called GAF domains (this acronym is based on the first letters of the three proteins in which they were first identified: G for cGMP-stimulated phosphodiesterases; A for *Anabaena* adenylyl cycles; F for FhlA transcription factor), which are involved in enzyme dimerization and allosteric regulation by cyclic nucleotides. In particular, for PDE2 and

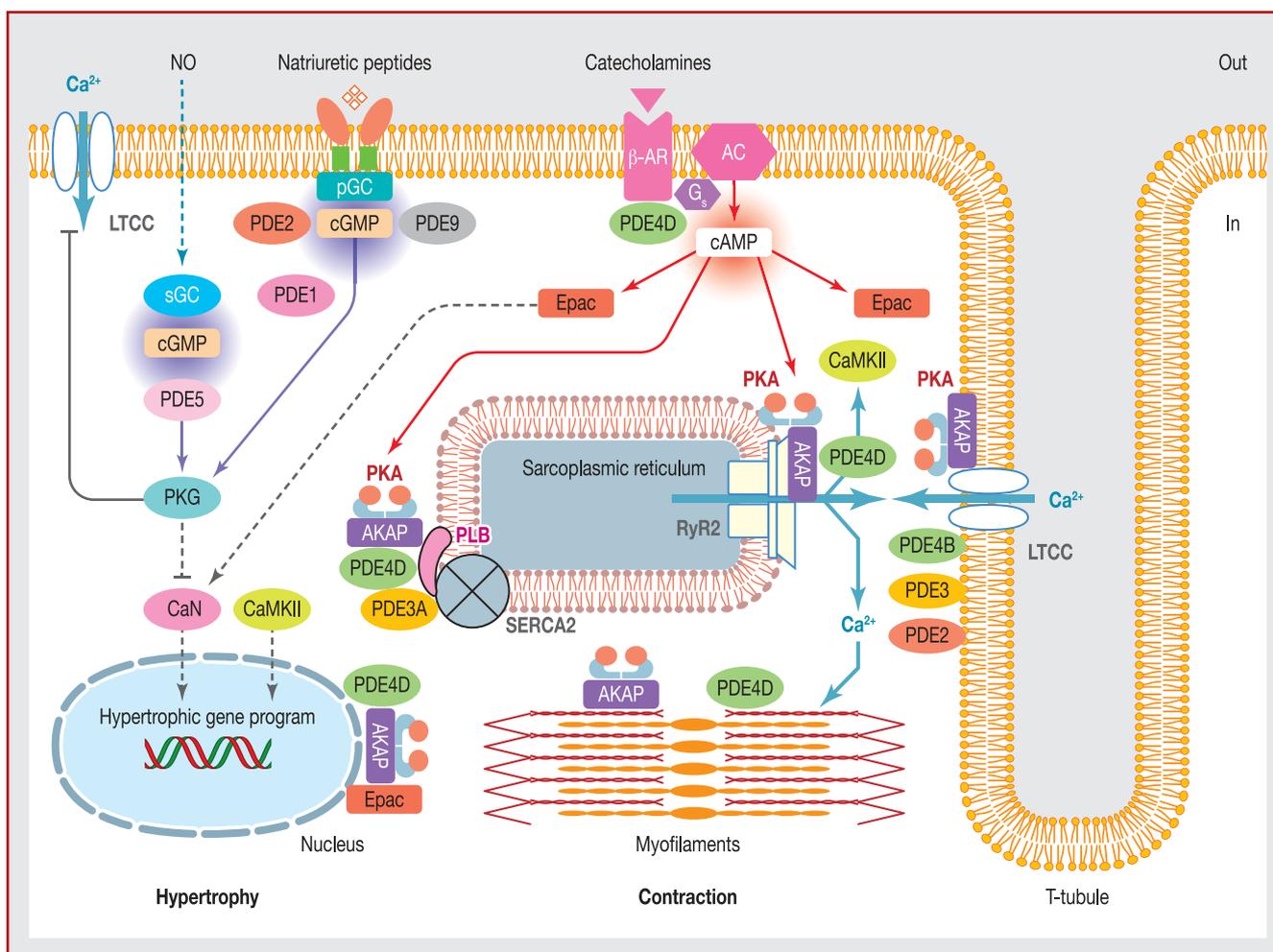


Figure 1. Cyclic nucleotides metabolism in cardiac myocytes. The major phosphodiesterases (PDEs) expressed in cardiac myocytes are indicated, together with their subcellular localization in relation to their role in regulating hypertrophic growth and excitation-contraction coupling. For simplicity, the PDE family and – when relevant – the gene are indicated, but not the specific splice variants. AC: adenylate cyclase; AKAP: A-kinase anchoring protein; β -AR: β -adrenergic receptor; Ca^{2+} : calcium; CaMKII: Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; CaN: calcineurin; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; Epac: exchange protein directly activated by cAMP; Gs: heterotrimeric G-protein stimulating adenylyl cyclase; LTCC: L-type Ca^{2+} channels; NO: nitric oxide; pGC: particulate guanylate cyclase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKG: cGMP-dependent protein kinase; PLB: phospholamban; RyR: ryanodine receptor; SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -adenosine triphosphatase; sGC: soluble guanylate cyclase.

PDE5, cGMP binding to their respective GAF domains stimulate enzymatic activity [11,12]. In contrast to PDE2, PDE3 is inhibited by cGMP, by direct competition at the catalytic site. The N-domains of various PDEs contain phosphorylation sites for distinct kinases that modulate enzymatic activity. For instance, long isoforms of PDE4 are phosphorylated by PKA, leading to an increase in cAMP hydrolytic activity [13], whereas PKG phosphorylation of PDE5 increases cGMP hydrolytic activity [14]. Long isoforms of PDE4D have been widely studied in this respect, and were shown to be phosphorylated by many other kinases, particularly the extracellular signal-regulated kinases ERK2 and ERK5, and CaMKII [15,16]. N-domains are also important for intracellular localization, through specific regions that provide membrane association or protein-protein interaction. PDEs can associate with multiple protein partners, including scaffold proteins, such as A-kinase anchoring proteins (AKAPs) or β -arrestin strategically located within the cells. More

detailed descriptions of PDEs, including their structure, regulation, physiological roles and pharmacology, are available in several recent reviews [14,17–19].

PDEs as therapeutic targets in cardiovascular diseases

Heart failure

In the 1970s and 1980s, PDE3 inhibitors were discovered to exhibit cardiotoxic, inotropic, bronchodilatory and vasodilatory activities in several species, and were initially developed as cardiotoxic agents to replace or add to cardiac glycosides in the treatment of HF [20]. However, despite beneficial haemodynamic effects in the short term, chronic use of PDE3 inhibitors was associated with increased cardiac arrhythmias and sudden death [21]. Thus, the use of PDE3

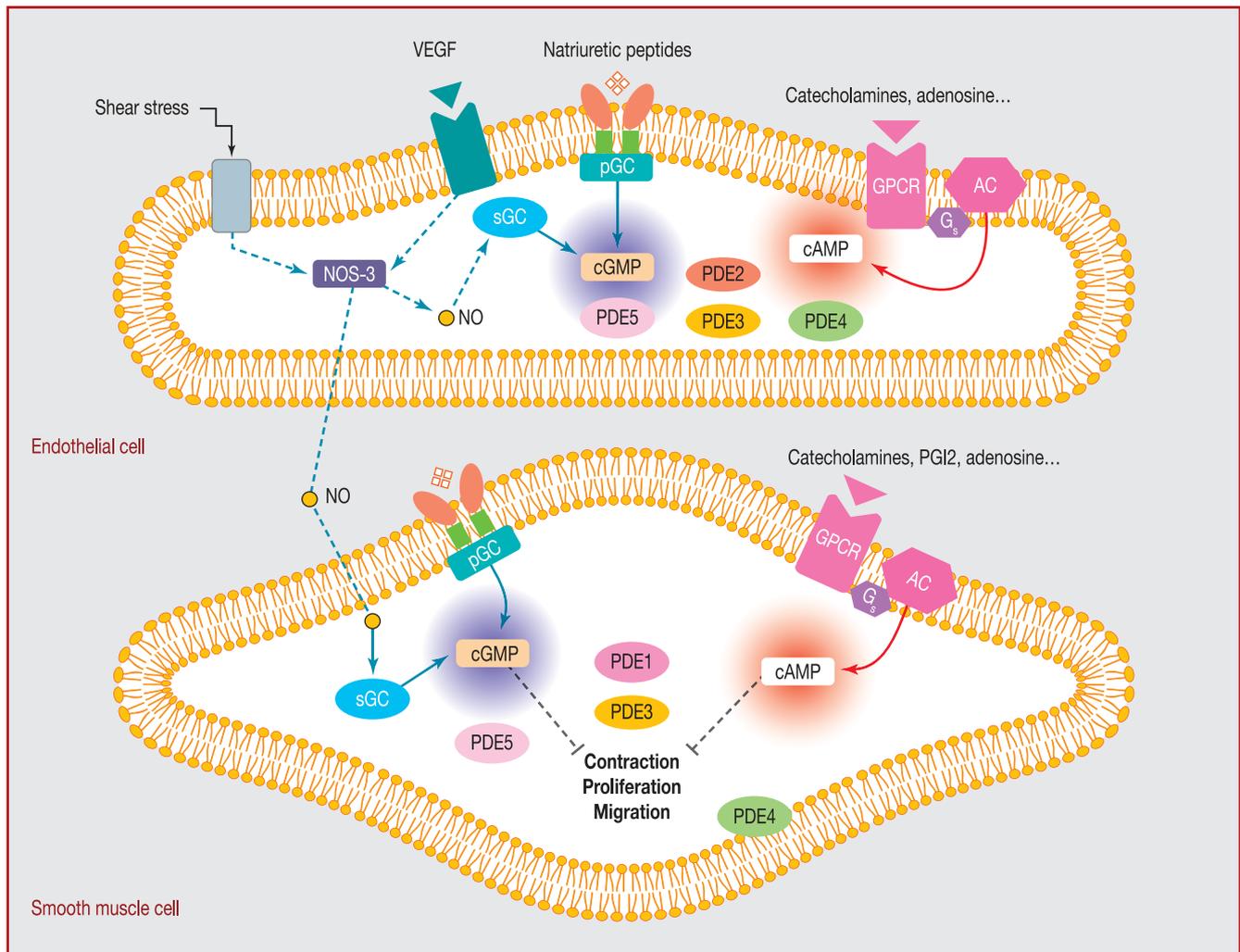


Figure 2. Cyclic nucleotide metabolism in vascular endothelial and smooth muscle cells. For each cell type, the main pathways leading to cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) synthesis as well as the major phosphodiesterase (PDE) families involved in their degradation are indicated. AC: adenylate cyclase; GPCR: G-protein coupled receptor; G_s: heterotrimeric G-protein stimulating adenylyl cyclase; NO: nitric oxide; NOS: NO synthase; pGC: particulate guanylate cyclase; PGI₂: prostacyclin I₂; sGC: soluble guanylate cyclase; VEGF: vascular endothelial growth factor.

inhibitors is now limited to acute decompensated HF. Nevertheless, PDE3 inhibitors are targeting several functionally distinct isoforms that are co-expressed in the heart, raising the hope that more selective targeting might provide some benefits.

PDE3 is encoded by two genes, *PDE3A* and *PDE3B*. Evidence from global *PDE3A* and *PDE3B* knockout (KO) mice indicate that *PDE3A*, but not *PDE3B*, is responsible for the inotropic and chronotropic effects of PDE3 inhibitors [22]. Three isoforms of *PDE3A* are expressed in cardiomyocytes, which differ only in their N-terminal domain, giving rise to different intracellular localization [23]. In mice and humans, *PDE3A1* controls PLB-SERCA2 activity and Ca²⁺ reuptake in the sarcoplasmic reticulum [24,25] (Fig. 1). Because dephosphorylated PLB and depressed SERCA2 activity are a hallmark of HF, PDE3 inhibitors specifically targeting the *PDE3A1* associated with PLB-SERCA2 may improve contractile performance and provide therapy for HF [26]. However, currently available PDE3 inhibitors have little selectivity for

PDE3A versus *PDE3B* isoforms, which have similar catalytic domains, and no selectivity for individual *PDE3A* isoforms, which have identical catalytic domains. Phosphorylation of *PDE3A1* was recently shown to regulate its interaction with SERCA2 [25]. Targeting this mechanism may offer an alternative to selectively enhance contractility without the harmful effects of global inhibition of PDE3 activity.

The second major PDE involved in cAMP hydrolysis in the heart is the cAMP-specific PDE4. The PDE4 family is encoded by four genes (*PDE4A–D*). Most of our knowledge of the roles of individual PDE4 subtypes in the heart is limited to *PDE4D*. KO of the *PDE4D* gene in mice leads to PKA hyperphosphorylation of RyR2, increased sensitivity to exercise-induced arrhythmias and late-onset dilated cardiomyopathy [27]. *PDE4D* isoforms are localized in multiple compartments of the cardiomyocyte. For instance, *PDE4D3* is localized at the perinuclear region, where it is part of a macromolecular complex organized by the scaffold protein muscle AKAP and comprising Epac1 and the kinase ERK5 to regulate

cardiomyocyte hypertrophy [28]. This isoform is also present at the sarcolemma, where it associates through another AKAP with slowly activating delayed rectifier potassium channels controlling cardiac repolarization [29], and at myofilaments, in association with another scaffold protein, myomegalin [30]. In addition, distinct PDE4D isoforms have been shown to interact with β_1 -ARs and β_2 -ARs, either directly or indirectly through β -arrestin, and to shape specific physiological or pathophysiological responses [31–35]. Finally, similar to PDE3A, PDE4D also associates with the PLB/SERCA2 complex and regulates SERCA pump activity in the mouse heart [36] (Fig. 1).

A role for PDE4B in the heart emerged recently when it was identified as an integral component of the LTCC complex, and the main PDE regulating the LTCC current during β -AR stimulation (Fig. 1). *PDE4B* KO mice, like *PDE4D* KO mice, have an increased susceptibility to ventricular arrhythmias during catecholamine stimulation, which may be the result of enhanced Ca^{2+} influx through the LTCC [37]. Although RyR2 phosphorylation by PKA did not seem to be affected in adult hearts from *PDE4B* KO mice [37], a recent study indicates that it was increased in neonatal myocytes lacking PDE4B [38] suggesting that altered RyR2 regulation may also contribute to this arrhythmic phenotype. In a recent study in rat ventricular myocytes, we showed that under β -AR stimulation, inhibition of PDE4 (as well as inhibition of PDE3) exerted inotropic effects via PKA but led to spontaneous diastolic Ca^{2+} waves via both PKA and CaMKII, suggesting the potential use of CaMKII inhibitors as adjuncts to PDE inhibition to limit their proarrhythmic effects [39].

As stated above, phosphorylation of certain PDE3 and PDE4 isoforms by PKA activates these enzymes, and this constitutes powerful negative feedback for cAMP signals in cardiomyocytes. This regulation has been shown to be facilitated by spatial proximity of PKA and PDEs assembled by the perinuclear muscle AKAP [28] or by phosphoinositide 3-kinase γ isoform, which, in addition to its lipid kinase function, also acts as an AKAP, facilitating the phosphorylation of PDE3A, PDE3B, PDE4A and PDE4B by PKA [40].

Although these studies underline the critical role of PDE4 in controlling β -AR stimulation in rodents, this family contributes less to the regulation of cardiac contractility in humans, where PDE3 predominates [41]. However, in human atrial strips, inhibition of PDE3 and also PDE4 potentiates the arrhythmogenic effect of β -AR stimulation, and PDE4 activity tends to decrease in the atria of patients with atrial fibrillation [42]. Further understanding of the role of PDE4 in humans may also be important for the proarrhythmic effect of PDE3 inhibitors, because PDE3 inhibitors, such as milrinone and enoximone, may also inhibit PDE4 in cardiac preparations [43,44]. In cardiac hypertrophy and HF, there are profound alterations of the expression and activity of PDE3 and PDE4. In a model of pathological hypertrophy induced by pressure overload in rats, we found that the expression and activity of PDE3A, PDE4A and PDE4B were decreased, and that this was associated with a blunted regulation of subsarcolemmal cAMP generated by β -ARs by PDE3 and PDE4 [45]. In contrast, in a model of cardiac hypertrophy induced by angiotensin II, increased PDE4 activity was observed, accompanied by an increase in the 69-kDa-PDE4A isoform and a decrease in the expression of the 52- and 76-kDa PDE4D isoforms. These results suggest that

the level of expression of the isoforms of PDE3 and PDE4 is specifically regulated by the type of stimulus used to induce cardiac hypertrophy and the stage of the disease. While an increase in cAMP-PDE can participate in desensitization of the β -AR pathway, a decrease could represent a compensatory mechanism to restore cAMP concentrations and inotropism. However, lower PDE also alters the degree of cAMP confinement, which could lead to illegitimate or excessive activation of certain pools of PKA or Epac, hence promoting maladaptive remodelling and rhythmic disturbances. This is supported by the results of a recent study showing that the specific PDE4D5 isoform regulates activation of hypertrophic programme by Epac1 upon stimulation of β_2 -AR receptors [31]. In a very recent study, the local regulation of cAMP by PDEs in the vicinity of SERCA2 was compared using transgenic mice with cardiac expression of a PLB-targeted cAMP biosensor subjected to transaortic constriction [46]. In agreement with their known localization within the SERCA2 complex [22,32], both PDE3 and PDE4 were found to regulate cAMP in this microdomain. Interestingly, during hypertrophy and early HF, there was a specific rearrangement of PDEs regulating this specific cAMP pool, with a decreased contribution from PDE4 and an increased contribution from PDE2 [46]. These results indicate that PDE alterations in cardiac disease include redistribution of PDE variants in discrete microcompartments of cardiomyocytes.

PDE3 and PDE4 also provide the major cAMP-degrading activities in VSMCs [47] (Fig. 2), and their expression is also modified in the aorta of rats with HF [48]. Importantly, endothelial dysfunction in HF leads to activation of PDE3 in VSMCs because of the loss of endothelial NO production and, consequently, of PDE3 inhibition by cGMP. This leads to a loss of relaxation induced by β -AR and PDE4 inhibition, thus suggesting that inhibition of vascular PDE3 may constitute an attractive approach to restoring normal vasorelaxation in HF [48].

The dual specific PDE2 represents a minor part of cAMP hydrolytic activity in the normal heart, but the cAMP hydrolytic activity of this PDE is stimulated 5- to 30-fold by cGMP, which was shown to inhibit cardiac LTCC in various species, including humans [49]. Subsequently, measurements with Förster resonance energy transfer-based sensors in neonatal rat cardiomyocytes showed that by decreasing the concentration of cAMP, PDE2 counteracts the effects of β -AR stimulation downstream of β_3 -ARs [50]. In contrast to PDE3 and PDE4, the expression and activity of which are generally decreased in pathological hypertrophy and HF [45,51,52], we found recently that PDE2 is increased in animal models as well as in human HF [53]. PDE2 inhibition partially restores β -AR responsiveness in diseased cardiomyocytes, suggesting that PDE2 enhancement in HF constitutes a protective mechanism against excessive β -AR stimulation. However, according to another recent study, PDE2 could exert a prohypertrophic effect by blunting PKA-mediated phosphorylation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) [54]. Further studies are needed to fully understand the role of PDE2 in HF.

Similar to PDE2, PDE1 and PDE5 have been reported to be overexpressed in pathological hypertrophy and HF [55–57]. Because PDE1 and PDE5 preferentially (PDE1A) or specifically (PDE5) degrade cGMP, their increase in HF can clearly be seen as maladaptive. Accordingly, transgenic mice with

cardiac-specific overexpression of PDE5 are predisposed to adverse remodelling after myocardial infarction [57], whereas pharmacological inhibition of PDE1 [55] or PDE5 [58] reduces hypertrophy and improves cardiac pressure and volume overload. Numerous animal studies have shown that PDE5 inhibitors protect against ischaemia/reperfusion injury, doxorubicin cardiotoxicity, ischaemic and diabetic cardiomyopathy and Duchenne muscular dystrophy [59]. However, it remains controversial whether significant concentrations of PDE5 are expressed in the myocardium, raising the possibility that the beneficial effects of PDE5 inhibitors involve other mechanisms, including inhibition of PDE1 [60,61]. In patients with systolic HF, the PDE5 inhibitor sildenafil decreased pulmonary vascular pressure and increased peak oxygen consumption and cardiac index [62]. Sildenafil also improved left ventricular diastolic function, cardiac geometry and clinical status in patients with systolic HF [63] and improved diabetic cardiomyopathy [64]. However, despite encouraging results in an initial single-centre study [65], chronic therapy with sildenafil was not associated with clinical benefit in patients with diastolic HF in a larger multicentre study [66]. Ongoing trials with PDE5 inhibitors include testing for gender response to tadalafil in left ventricular hypertrophy associated with diabetic cardiomyopathy (NCT01803828).

Two other PDEs were recently proposed to participate in cGMP degradation in the heart. Experiments performed in isolated cardiomyocytes from transgenic mice expressing a Förster resonance energy transfer-based cGMP biosensor have suggested that PDE3, which is classically known to degrade cAMP preferentially, may also be involved in the control of cGMP concentrations [67]. In addition, the cGMP-specific PDE9 was found to be expressed in rodent and human hearts, and to be upregulated in hypertrophy and HF [68]. PDE9 genetic ablation or pharmacological inhibition appears to protect the heart against pathological remodelling during pressure overload. Moreover, PDE9 inhibition reverses pre-established heart disease in a NO synthase activity-independent manner, whereas PDE5 inhibition requires active NO synthase, which is decreased in HF; this is because PDE9 seems to hydrolyze specifically cGMP generated by natriuretic peptides, whereas PDE5 controls cGMP generated by NO [69,70]. We have shown previously that PDE2 is critical for the regulation of subsarcolemmal cGMP concentrations in response to particulate GC activation in adult cardiomyocytes [69], thus raising the question of whether PDE2 and PDE9 exert redundant or distinct regulation of natriuretic peptide signalling.

Ischaemia/reperfusion injury

Manipulation of PDE activity may also prove protective in the context of ischaemia-reperfusion injury. Indeed, PDE5 inhibitors were shown to reduce infarct size in rabbits and mice; they also decreased cell death in isolated cardiomyocytes, suggesting that part of this effect is independent of vasodilation. Several mechanisms appear to be involved in these effects, including increased NO synthase expression, cGMP elevation, PKG activation and the opening of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and Ca²⁺-activated potassium channels [59]. PDE3 inhibitors have also been reported to reduce infarct size

when applied before sustained ischaemia, thus mimicking the cardioprotection conferred by ischaemic preconditioning [71–73]. A recent study using KO mice for either *PDE3A* or *PDE3B* strongly suggested that PDE3B is the isoform mediating the cardioprotective effect of PDE3 inhibitors in this context. Indeed, *PDE3B* KO mice, but not *PDE3A* KO mice, were protected against ischaemia-reperfusion injury. This protective effect appears to involve cAMP/PKA-mediated opening of mitochondrial Ca²⁺-activated potassium channels and assembly of ischaemia-induced caveolin 3-enriched fractions [74]. Somehow at odds with the above-mentioned cardioprotective effect of PDE3 inhibitors, mice with cardiac-specific overexpression of PDE3A1 were protected during ischaemia-reperfusion injury. In addition to regulating SERCA2, PDE3A1 also acts as a negative regulator of cardiomyocyte apoptosis, by controlling the expression of the transcriptional repressor and proapoptotic factor, inducible cAMP early repressor (ICER) [75]. Inhibition of this mechanism in mice with cardiac-specific overexpression of PDE3A1 was associated with protection during ischaemia-reperfusion [76]. Collectively, these studies suggest that PDE3A and PDE3B may play an opposite role during ischaemia-reperfusion, which may be linked to their differential localization and the control of discrete cAMP pools in cardiomyocytes [74].

Erectile dysfunction

PDE5 is highly abundant in vascular smooth muscle, and by limiting the breakdown of cGMP, PDE5 inhibition potentiates the vasorelaxant effect of the NO/cGMP pathway initiated by endothelial NO production or exogenous NO produced by NO donors [77,78] (Fig. 2). Thus, PDE5 inhibitors were initially proposed as potent vasodilators to treat coronary heart disease. In the mid-1980s, the Pfizer group developed sildenafil (UK-92480, a derivative of zaprinast) as an orally available PDE5 inhibitor (half maximal inhibitory concentration [IC₅₀] for PDE5 ~5 nM and 10× selectivity over other PDEs). Sildenafil turned out to be ineffective against angina, but was reported to induce enhanced penile erections in a number of volunteers participating in these trials. Thereafter, extensive research focused on this unexpected side effect.

Penile erection is dependent on the NO/cGMP pathway. Upon sexual stimulation, NO released in the corpora cavernosa by non-cholinergic/non-adrenergic neurons and endothelial cells promotes relaxation of surrounding smooth muscle cells (SMCs) by increasing intracellular cGMP concentrations. Relaxation of intracavernosal smooth muscle and dilatation of penile arteries promote the expanding of sinusoidal spaces, resulting in blood filling and penile erection. PDE5 is the predominant PDE in penile SMCs [79,80]. Thus, PDE5 inhibitors enhance the erectile response by potentiating the effects of cGMP triggered by NO release [81].

In 1998, sildenafil (Viagra®; Pfizer, New York City, NY, USA) received approval as the first oral treatment for erectile dysfunction in men. Three other PDE5 inhibitors (tadalafil, vardenafil and, more recently, avanafil) are now commercialized. No current evidence suggests a difference in their efficacy. However, sildenafil and vardenafil exhibit lower selectivity for PDE5 over PDE6, the retinal PDE, which might explain the visual disturbances experienced by some

patients. According to their action mechanism, all PDE5 inhibitors require sexual stimulation to be effective, and their association with organic nitrates is contraindicated. Nevertheless, an increase in vascular PDE expression, especially PDE1A and PDE5A, has been observed in rat models of nitrate tolerance; PDE inhibition, with zaprinast [82,83] and vinpocetine [84,85], respectively, was effective in reversing this tolerance, suggesting that PDE upregulation is involved in the development of nitrate tolerance. The potential application of PDE inhibitors, especially PDE1 and PDE5 inhibitors, in limiting the development of nitrate tolerance remains to be evaluated in humans.

Pulmonary hypertension

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by an increase in mean pulmonary arterial pressure, leading to a progressive functional decline with right HF and, eventually, death [86]. The pulmonary artery remodelling underlying this disease includes pulmonary vasoconstriction, in situ thrombosis, medial hypertrophy and intimal proliferation, leading to occlusion of the small- to mid-sized pulmonary arterioles and the formation of plexiform lesions. Endothelial dysfunction, leading to an imbalance in the production of vasodilator/antiproliferating factors in favour of vasoconstrictor/proliferating factors, appears to be one of the main pathobiological mechanisms of the disease, and is the rationale for current therapeutics. Impairment of the arterial pulmonary NO/cGMP/PDE5 pathway is supported by a decrease in NO synthase expression in endothelial cells from PAH patients [87], and upregulation of PDE5 in their VSMCs. Thus, PDE5 inhibition counteracts this deleterious process, promoting cGMP accumulation, resulting in inhibition of pulmonary vasoconstriction and VSMC growth and remodelling.

In the SUPER study, a 12-week treatment with the PDE5 inhibitor sildenafil showed improvements in exercise capacity, New York Heart Association functional class and pulmonary haemodynamics in patients with symptomatic PAH [88]. The improvements were largely sustained after 3 years of treatment (SUPER-2 study) [89]. Sildenafil (Revatio®; Pfizer) was approved in 2005 for the long-term treatment of patients with class II and III PAH. Tadalafil (Adcirca®; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) was also commercialized based on similar clinical benefits [90,91].

Other PDE families may be critical in the pathogenesis of PAH. It has been shown that not only cGMP-PDE activity, but also cAMP-PDE activity is increased in rat pulmonary arteries isolated from a model of chronic hypoxia-induced PAH [92].

Expression of PDE1A, PDE1C and PDE3B is enhanced in pulmonary artery SMCs from both idiopathic and secondary PAH patients compared with control pulmonary artery SMCs [93,94]. Methylxanthine derivatives, which exhibit low PDE1 selectivity, were shown to be protective in different pre-clinical models of PAH [94]. More recently, the selective PDE2 inhibitor BAY 60-7550 was shown to have beneficial effects on pulmonary vasoconstriction, remodelling and right ventricular hypertrophy in both hypoxia- and bleomycin-induced pulmonary hypertension in mice. The authors also reported that BAY 60-7550 reduced the proliferation of isolated pulmonary artery SMCs from PAH patients

[95]. Additional benefits were observed when BAY 60-7550 was given in conjunction with cAMP- or cGMP-elevating agents (the prostacyclin analogue treprostinil, sildenafil, atrial natriuretic peptide or NO donor). The dual promotion of cGMP and cAMP signalling upon PDE2 inhibition might be an attractive perspective in the treatment of PAH.

Post-angioplasty restenosis/atherosclerosis

Intimal hyperplasia and luminal stenosis are the key characteristics of several different vascular disorders, such as atherosclerosis and post-angioplasty restenosis [96,97].

To prevent restenosis after percutaneous coronary interventions, the most effective therapy is local delivery of antiproliferative reagents via drug-eluting stents, containing drugs, such as sirolimus [98] and paclitaxel [99]. However, first-generation drug-eluting stents also attenuate re-endothelialization and can lead to increased in-stent thrombosis [100]; they also remain ineffective in treating vascular disorders with diffuse neointimal lesions. Thus, the development of novel therapeutic strategies is currently in high demand.

Under normal conditions, SMCs residing in the media of vessels are quiescent, with a low turnover rate and insignificant secretory activity. These SMCs are highly differentiated cells that exhibit a contractile phenotype by expressing large amounts of contractile proteins, and principally function to maintain vascular tone. However, SMCs also retain a degree of plasticity to allow phenotypic modulation. Under vascular injury, SMCs undergo profound metamorphosis, changing from a quiescent/contractile phenotype to an active/synthetic phenotype with proliferative and migratory properties [101]. Interestingly, this phenotype switch is associated with modification of PDE expression profile. Given the antiproliferative and antimigratory properties of cyclic nucleotides, PDEs appear of great interest in these vascular proliferative diseases.

The properties of PDE3 inhibition, leading to vasodilatation and inhibition of platelet aggregation and VSMC proliferation, appeared to be favourable in this context. Several clinical trials were designed to evaluate the benefits of the already approved and orally available PDE3 inhibitor, cilostazol. On a background of usual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel, cilostazol was shown to be effective in attenuating post-angioplasty restenosis, especially in patients at high risk of restenosis 6 months after stent implantation (CREST trial) [102], and in patients with diabetes mellitus implanted with a drug-eluting stent (DECLARE-DIABETES trial) [103]. Cilostazol compared with aspirin also reduced the progression of carotid atherosclerosis at 2 years in patients with type 2 diabetes (DAPC trial) [104]. Despite the possible benefit of cilostazol in vascular diseases, its use is limited by tolerability, as some patients often report drug discontinuation because of headache, diarrhoea, dizziness or increased heart rate [105].

PDE1C is considered as a marker of VSMC proliferation in rodent as well as in human vessels (Fig. 2). Indeed, PDE1C expression was reported to be minor in the normal human aorta or saphenous vein, but readily upregulated ex vivo in SMCs cultured from these vessels [106,107] or isolated from aortic atherosclerosis lesions [108], as well as in vivo in neointimal human coronary artery lesions [107]. Ex vivo

inhibition of PDE1C using antisense oligonucleotides or a PDE1 inhibitor resulted in suppression of proliferation of SMCs isolated from the normal aorta or from lesions of atherosclerosis [108]. More importantly, in vivo deficiency of PDE1C (*PDE1C* KO) or inhibition of PDE1 through perivascular application of IC86340 was shown to attenuate injury-induced neointimal formation in mouse carotid artery [107]. In this study, the authors identified a novel mechanism involved in the beneficial effects of PDE1C inhibition, a decrease in platelet-derived growth factor receptor β expression, via a cAMP/PKA-dependent mechanism contributing to lysosomal-dependent receptor degradation in a low-density lipoprotein receptor-related protein 1-dependent manner. Thus PDE1C inhibition appears to offer novel therapeutic strategies in vascular hyperplastic disorders.

Angiogenesis

Cyclic nucleotide signalling pathways are considered to modulate several components of tumorigenesis, among them angiogenesis, which is a fundamental process in tumour growth and metastasis. The vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway is well established as one of the key regulators of this process [109], and current antiangiogenic therapies rely on blocking VEGF activity. VEGF-induced angiogenesis is partly mediated by NO through endothelial NO synthase activation and the subsequent increase in endothelial cGMP concentration. In human umbilical vein endothelial cells, VEGF has been shown to increase PDE2 and PDE4 activities and decrease PDE5 activity. Treatment of these cells with a combination of PDE2 and PDE4 inhibitors increased cAMP concentrations and decreased VEGF-induced human umbilical vein endothelial cell migration, proliferation and cell cycle progression. This treatment also reduced the total capillary surface of the chicken embryo chorioallantoic membrane, used as an in vivo preclinical model of angiogenesis [110]. More recently, it was reported that a PDE4 inhibitor (intraperitoneal administration for 36 days) reduced in vivo the growth of A549 lung tumour xenografts in nude mice by attenuating proliferation and angiogenesis, evaluated by Ki67 and CD31 staining, respectively [111]. Overall, these preclinical data assessing the role of PDEs in the angiogenesis process strengthen the interest in PDE inhibitors in cancer therapy.

Systemic hypertension

PDE inhibitors are currently not indicated as antihypertensive drugs, despite their vasodilatory properties. Indeed, milrinone was reported to decrease arterial pressure after intravenous infusion [112], but as its chronic oral administration in HF patients was shown to increase mortality, most probably because of arrhythmias and cardiac arrest [21], its clinical use was restricted to acute and end-stage treatment of HF. Recently, Maass et al. [113] identified six missense *PDE3A* mutations causing an autosomal dominant hypertension in brachydactyly type E patients. The mutated *PDE3A* exhibited a gain-of-function, with increased cAMP hydrolytic activity, responsible for VSMC hyperplasia and increased vascular resistance. This elegant study should boost the interest

in selective PDE3 inhibitors in the treatment of hypertension, especially in association with brachydactyly.

Intermittent claudication

Cilostazol, a selective PDE3 inhibitor, was approved for intermittent claudication, a relatively common lower-extremity peripheral arterial disease, characterized by ischaemia-induced leg pain or cramping, and for which pharmacological therapy is limited. Cilostazol exerts dual inhibitory properties on PDE3 and adenosine uptake, which might explain the minimal cardiac effects compared with other PDE3 inhibitors [114]. By inhibiting platelet aggregation and promoting arterial vasodilation, cilostazol was shown to increase walking distance and to reduce the clinical symptoms of intermittent claudication [115]. However, its use is controversial because of the modest benefit-risk balance (in particular, because of the risk of side effects affecting the heart or serious bleeding), and it has been withdrawn in some countries (e.g. France).

Concluding remarks

Soon after the discovery of cAMP and cGMP by Sutherland and colleagues more than 50 years ago, an enzymatic activity that could degrade these second messengers was described [116]. Since then, the large diversity and complexity of the PDE superfamily has been unveiled, and the critical role of these enzymes in the cardiovascular system has been demonstrated. After several disappointments in the development of PDE3 and PDE4 inhibitors, because of their adverse effects (mortality and emesis, respectively), the success of PDE5 inhibitors in treating erectile dysfunction combined with an increasing understanding of PDE biology has raised new hopes that manipulating PDE activity with greater specificity is possible and should yield therapeutic benefits. However, the targeting of individual PDE isoforms located in distinct subcellular compartments to regulate local cAMP and/or cGMP concentrations and specific cell functions is challenging. Knowledge of the protein partners and the molecular mechanisms that govern this specific localization enables envisaging of the displacement of specific PDE pools by small molecules or peptides that disrupt protein–protein interactions, with potentially fewer adverse effects than the global inhibition of an entire PDE family. Recent examples of such a strategy include the disruption of PDE4 from heat shock protein 20 (HSP20) in cardiomyocytes, resulting in hyperphosphorylation of HSP20 and attenuated cardiac hypertrophic growth [117,118], and the disruption of Epac1-PDE3B and Epac1-PDE4D complexes involved in the control of endothelial cell adhesion, spreading and permeability [119,120]. Another interesting strategy is the development of allosteric inhibitors of PDEs, for instance, targeting the GAF domain of PDE5 to block enzyme activation, but not its basal activity [121], or exploiting sequence differences outside the active site to reach isoform selectivity in the case of PDE4B and PDE4D [122,123]. The allosteric mode of regulation could also facilitate the discovery of small molecules acting as activators for specific PDEs, which may actually be useful in correcting the

detrimental effects of excessive β -AR stimulation observed in HF.

Sources of funding

This work was supported by the Fondation de France (G.V.) and the Agence Nationale de la Recherche 2010 BLAN 1139-01 (G.V.). P.B. is supported by PhD fellowships from the Ile-de-France region (CORDDIM) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20140931029). I.B. is supported by a PhD fellowship from CORDDIM. M.B.-O. is supported by PhD fellowships from the French Ministry of Research and the GRRC/French Society of Cardiology. L.Z. is supported by a PhD fellowship from the China Scholarship Council.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Steinberg SF, Brunton LL. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:751–73.
- [2] Conti M, Mika D, Richter W. Perspectives on: cyclic nucleotide microdomains and signaling specificity: cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Gen Physiol* 2014;143:29–38.
- [3] Metrich M, Lucas A, Gastineau M, et al. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 2008;102:959–65.
- [4] Ruiz-Hurtado G, Morel E, Dominguez-Rodriguez A, et al. Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2012.
- [5] Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca^{2+} current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1197–201.
- [6] Yang L, Liu G, Zakhari SI, Bellinger AM, Mongillo M, Marx SO. Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 $\alpha 1c$ and $\beta 2$ subunits. *Circ Res* 2007;101:465–74.
- [7] Layland J, Solaro RJ, Shah AM. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2005;66:12–21.
- [8] Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 2009;122:216–38.
- [9] Maurice DH, Tilley DG. Regulation of PDE expression in arteries: role in controlling vascular cyclic nucleotide signaling. In: Beavo JA, Francis SH, Houslay MD, editors. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease*. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 441–63.
- [10] Metrich M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomez AM, Lezoualc'h F. Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflugers Arch* 2010;459:535–46.
- [11] Martins TJ, Mumby MC, Beavo JA. Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem* 1982;257:1973–9.
- [12] Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, Beavo JA. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J* 2003;22:469–78.
- [13] Sette C, Conti M. Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* 1996;271:16526–34.
- [14] Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 2011;91:651–90.
- [15] Mika D, Richter W, Conti M. A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:2023–8.
- [16] Mika D, Conti M. PDE4D phosphorylation: a coincidence detector integrating multiple signaling pathways. *Cell Signal* 2015 [Epub ahead of print].
- [17] Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 2007;76:481–511.
- [18] Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* 2012;165:1288–305.
- [19] Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:290–314.
- [20] Movsesian M, Wever-Pinzon O, Vandeput F. PDE3 inhibition in dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:707–13.
- [21] Amsallem E, Kasparian C, Haddour G, Boissel JP, Nony P. Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;CD002230.
- [22] Sun B, Li H, Shakur Y, et al. Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cell Signal* 2007;19:1765–71.
- [23] Wechsler J, Choi YH, Krall J, Ahmad F, Manganiello VC, Movsesian MA. Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002;277:38072–8.
- [24] Beca S, Ahmad F, Shen W, et al. PDE3A regulates basal myocardial contractility through interacting with SERCA2a-signaling complexes in mouse heart. *Circ Res* 2013;112:289–97.
- [25] Ahmad F, Shen W, Vandeput F, et al. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium: phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2. *J Biol Chem* 2015;290:6763–76.
- [26] Movsesian M. New pharmacologic interventions to increase cardiac contractility: challenges and opportunities. *Curr Opin Cardiol* 2015.
- [27] Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, et al. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 2005;123:25–35.
- [28] Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, et al. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 2005;437:574–8.
- [29] Terrenoire C, Houslay MD, Baillie GS, Kass RS. The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem* 2009;284:9140–6.
- [30] Verde I, Pahlke G, Salanova M, et al. Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* 2001;276:11189–98.
- [31] Baillie GS, Sood A, McPhee I, et al. beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:940–5.
- [32] De Arcangelis V, Liu R, Soto D, Xiang Y. Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with beta2-adrenoceptor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2009;284:33824–32.

- [33] Richter W, Day P, Agrawal R, et al. Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J* 2008;27:384–93.
- [34] Richter W, Mika D, Blanchard E, Day P, Conti M. beta1-adrenergic receptor antagonists signal via PDE4 translocation. *EMBO Rep* 2013;14:276–83.
- [35] Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Sauliere A, et al. Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate beta-adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal* 2013;25:970–80.
- [36] Beca S, Helli PB, Simpson JA, et al. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and cardiac contractility, independently of L-type Ca²⁺ current. *Circ Res* 2011;109:1024–30.
- [37] Leroy J, Richter W, Mika D, et al. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca²⁺ channel complex regulates Ca²⁺ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest* 2011;121:2651–61.
- [38] Mika D, Richter W, Westenbroek RE, Catterall WA, Conti M. PDE4B mediates local feedback regulation of beta1-adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes. *J Cell Sci* 2014;127:1033–42.
- [39] Fischmeister R, Vandecasteele G, Leroy J. Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca²⁺ waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Cardiovasc Res* 2016;110:151–61.
- [40] Ghigo A, Perino A, Mehel H, et al. PI3Kgamma protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through PKA-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. *Circulation* 2012;126:2073–83.
- [41] Molenaar P, Christ T, Hussain RI, et al. PDE3, but not PDE4, reduces beta(1) - and beta(2)-adrenoceptor-mediated inotropic and lusitropic effects in failing ventricle from metoprolol-treated patients. *Br J Pharmacol* 2013;169:528–38.
- [42] Molina CE, Leroy J, Richter W, et al. Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:2182–90.
- [43] Shakur Y, Fong M, Hensley J, et al. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on cAMP-PDE activity, intracellular cAMP and calcium in the heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:417–27.
- [44] Bethke T, Eschenhagen T, Klimkiewicz A, et al. Phosphodiesterase inhibition by enoximone in preparations from nonfailing and failing human hearts. *Arzneimittelforschung* 1992;42:437–45.
- [45] Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, et al. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res* 2009;105:784–92.
- [46] Sprenger JU, Perera RK, Steinbrecher JH, et al. In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease. *Nat Commun* 2015;6:6965.
- [47] Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, Leblais V. beta-Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS ONE* 2012;7:e47826.
- [48] Hubert F, Belacel-Ouari M, Manoury B, et al. Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol* 2014;171:5361–75.
- [49] Fischmeister R, Castro L, Abi-Gerges A, Rochais F, Vandecasteele G. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 2005;142:136–43.
- [50] Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, et al. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts {beta}-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 2005;98:226–34.
- [51] Osadchii OE. Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:171–94.
- [52] Ding B, Abe J, Wei H, et al. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 2005;111:2469–76.
- [53] Mehel H, Emons J, Vettel C, et al. Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1596–606.
- [54] Zoccarato A, Surdo NC, Aronsen JM, et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by a local pool of camp regulated by phosphodiesterase 2. *Circ Res* 2015.
- [55] Miller CL, Oikawa M, Cai Y, et al. Role of Ca²⁺/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 2009;105:956–64.
- [56] Vandeput F, Wolda SL, Krall J, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2007;282:32749–57.
- [57] Pokreisz P, Vandewijngaert S, Bito V, et al. Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2009;119:408–16.
- [58] Takimoto E, Champion HC, Li M, et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2005;11:214–22.
- [59] Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther* 2015;147:12–21.
- [60] Lukowski R, Krieg T, Rybalkin SD, Beavo J, Hofmann F. Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunction: boom, bust, and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35:404–13.
- [61] Degen CV, Bishu K, Zakeri R, Ogut O, Redfield MM, Brozovich FV. The emperor's new clothes: PDE5 and the heart. *PLOS ONE* 2015;10:e0118664.
- [62] Lewis GD, Lachmann J, Camuso J, et al. Sildenafil improves exercise hemodynamics and oxygen uptake in patients with systolic heart failure. *Circulation* 2007;115:59–66.
- [63] Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circ Heart Fail* 2011;4:8–17.
- [64] Giannetta E, Isidori AM, Galea N, et al. Chronic inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. *Circulation* 2012;125:2323–33.
- [65] Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a target of phosphodiesterase-5 inhibition in a 1-year study. *Circulation* 2011;124:164–74.
- [66] Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, et al. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013;309:1268–77.
- [67] Gotz KR, Sprenger JU, Perera RK, et al. Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes. *Circ Res* 2014;114:1235–45.
- [68] Lee DI, Zhu G, Sasaki T, et al. Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* 2015;519:472–6.

- [69] Castro LR, Verde I, Cooper DM, Fischmeister R. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 2006;113:2221–8.
- [70] Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, et al. Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* 2007;115:2159–67.
- [71] Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, et al. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* 2001;104:705–10.
- [72] Tosaka S, Makita T, Tosaka R, et al. Cardioprotection induced by olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, involves phosphatidylinositol-3-OH kinase-Akt and a mitochondrial permeability transition pore during early reperfusion. *J Anesth* 2007;21:176–80.
- [73] Fukasawa M, Nishida H, Sato T, Miyazaki M, Nakaya H. 6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)quinolinone (cilostazol), a phosphodiesterase type 3 inhibitor, reduces infarct size via activation of mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels in rabbit hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:100–4.
- [74] Chung YW, Lagranha C, Chen Y, et al. Targeted disruption of PDE3B, but not PDE3A, protects murine heart from ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E2253–62.
- [75] Yan C, Miller CL, Abe J. Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res* 2007;100:489–501.
- [76] Oikawa M, Wu M, Lim S, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2013.
- [77] Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237:539–47.
- [78] Harris AL, Lemp BM, Bentley RG, Perrone MH, Hamel LT, Silver PJ. Phosphodiesterase isozyme inhibition and the potentiation by zaprinast of endothelium-derived relaxing factor and guanylate cyclase stimulating agents in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;249:394–400.
- [79] Taher A, Meyer M, Stief CG, Jonas U, Forssmann WG. Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human cavernous smooth muscle. *World J Urol* 1997;15:32–5.
- [80] Kuthe A, Wiedenroth A, Magert HJ, et al. Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. *J Urol* 2001;165:280–3.
- [81] Boolell M, Gopi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol* 1996;78:257–61.
- [82] Pagani ED, VanAller GS, O'Connor B, Silver PJ. Reversal of nitroglycerin tolerance in vitro by the cGMP-phosphodiesterase inhibitor zaprinast. *Eur J Pharmacol* 1993;243:141–7.
- [83] Kass DA, Champion HC, Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circ Res* 2007;101:1084–95.
- [84] Kim D, Rybalkin SD, Pi X, et al. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation* 2001;104:2338–43.
- [85] Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 2005;97:618–28.
- [86] McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006;114:1417–31.
- [87] Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995;333:214–21.
- [88] Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005;353:2148–57.
- [89] Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, et al. Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. *Chest* 2011;140:1274–83.
- [90] Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2000;343:1342.
- [91] Steiner MK, Preston IR, Klinger JR, Hill NS. Pulmonary hypertension: inhaled nitric oxide, sildenafil and natriuretic peptides. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:245–50.
- [92] Maclean MR, Johnston ED, McCulloch KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G. Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:619–24.
- [93] Murray F, Patel HH, Suda RY, et al. Expression and activity of cAMP phosphodiesterase isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension: role for PDE1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L294–303.
- [94] Schermuly RT, Pullamsetti SS, Kwapiszewska G, et al. Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. *Circulation* 2007;115:2331–9.
- [95] Bubb KJ, Trinder SL, Baliga RS, et al. Inhibition of phosphodiesterase 2 augments cGMP and cAMP signaling to ameliorate pulmonary hypertension. *Circulation* 2014;130:496–507.
- [96] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801–9.
- [97] Kearney M, Pieczek A, Haley L, et al. Histopathology of intimal restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1997;95:1998–2002.
- [98] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003;349:1315–23.
- [99] Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004;350:221–31.
- [100] Pendyala LK, Yin X, Li J, Chen JP, Chronos N, Hou D. The first-generation drug-eluting stents and coronary endothelial dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv* 2009;2:1169–77.
- [101] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004;84:767–801.
- [102] Douglas Jr JS, Holmes Jr DR, Kereiakes DJ, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation* 2005;112:2826–32.
- [103] Lee SW, Park SW, Kim YH, et al. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARE-DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients). *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1181–7.
- [104] Katakami N, Kim YS, Kawamori R, Yamasaki Y. The phosphodiesterase inhibitor cilostazol induces regression of carotid atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes mellitus: principal results of the Diabetic Atherosclerosis Prevention by Cilostazol (DAPC) study: a randomized trial. *Circulation* 2010;121:2584–91.
- [105] Rogers KC, Oliphant CS, Finks SW. Clinical efficacy and safety of cilostazol: a critical review of the literature. *Drugs* 2015;75:377–95.
- [106] Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Sonnenburg WK, et al. Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. *J Clin Invest* 1997;100:2611–21.

- [107] Cai Y, Nagel DJ, Zhou Q, et al. Role of cAMP-phosphodiesterase 1C signaling in regulating growth factor receptor stability, vascular smooth muscle cell growth, migration, and neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2015;116:1120–32.
- [108] Rybalkin SD, Rybalkina I, Beavo JA, Bornfeldt KE. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2002;90:151–7.
- [109] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011–27.
- [110] Favot L, Keravis T, Holl V, Le Bec A, Lugnier C. VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. *Thromb Haemost* 2003;90:334–43.
- [111] Pullamsetti SS, Banat GA, Schmall A, et al. Phosphodiesterase-4 promotes proliferation and angiogenesis of lung cancer by crosstalk with HIF. *Oncogene* 2013;32:1121–34.
- [112] Grose R, Strain J, Greenberg M, LeJemtel TH. Systemic and coronary effects of intravenous milrinone and dobutamine in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:1107–13.
- [113] Maass PG, Aydin A, Luft FC, et al. PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nat Genet* 2015;47:647–53.
- [114] Kambayashi J, Shakur Y, Liu Y. Bench to bedside: multiple actions of the PDE3 inhibitor cilostazol. In: Beavo JA, Francis SH, Houslay MD, editors. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease*. Boca Raton: Boca Raton; 2007. p. 627–48.
- [115] Money SR, Herd JA, Isaacsohn JL, et al. Effect of cilostazol on walking distances in patients with intermittent claudication caused by peripheral vascular disease. *J Vasc Surg* 1998;27:267–74, discussion 74–5.
- [116] Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 1958;232:1077–91.
- [117] Sin YY, Edwards HV, Li X, et al. Disruption of the cyclic AMP phosphodiesterase-4 (PDE4)-HSP20 complex attenuates the beta-agonist induced hypertrophic response in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:872–83.
- [118] Martin TP, Hortigon-Vinagre MP, Findlay JE, Elliott C, Currie S, Baillie GS. Targeted disruption of the heat shock protein 20-phosphodiesterase 4D (PDE4D) interaction protects against pathological cardiac remodeling in a mouse model of hypertrophy. *FEBS Open Bio* 2014;4:923–7.
- [119] Wilson LS, Baillie GS, Pritchard LM, et al. 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* 2011;286:16285–96.
- [120] Rampersad SN, Ovens JD, Huston E, et al. Cyclic AMP phosphodiesterase 4D (PDE4D) Tethers EPAC1 in a vascular endothelial cadherin (VE-Cad)-based signaling complex and controls cAMP-mediated vascular permeability. *J Biol Chem* 2010;285:33614–22.
- [121] Schultz JE, Dunkern T, Gawlitta-Gorka E, Sorg G. The GAF-tandem domain of phosphodiesterase 5 as a potential drug target. *Handb Exp Pharmacol* 2011:151–66.
- [122] Burgin AB, Magnusson OT, Singh J, et al. Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nat Biotechnol* 2010;28:63–70.
- [123] Fox 3rd D, Burgin AB, Gurney ME. Structural basis for the design of selective phosphodiesterase 4B inhibitors. *Cell Signal* 2014;26:657–63.

Titre : Contrôle de la voie de l'AMPC vasculaire par les phosphodiésterases en situation physiopathologique.

Mots clés : Muscle lisse vasculaire, récepteur β -adrénergique, AMPc, phosphodiésterases, densité cellulaire, insuffisance cardiaque.

Résumé : L'AMPC est un second messager exerçant un rôle vasculoprotecteur majeur, par ses effets relaxants et inhibiteurs de la prolifération et de la migration cellulaires. Les concentrations intracellulaires d'AMPC sont finement régulées par leur synthèse via les adénylates cyclases et leur dégradation par les phosphodiésterases (PDEs).

Nous avons évalué l'impact de l'environnement cellulaire sur la voie de signalisation couplée au récepteur β -adrénergique (β -AR/AMPC/PDE) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), ainsi que les altérations potentielles de celle-ci en situation pathologique d'insuffisance cardiaque (IC).

Notre première étude montre que dans les CMLs d'aorte de rat en culture, adoptant un phénotype synthétique, la voie de signalisation β -AR/AMPC/PDE est hautement modulée par la densité cellulaire.

Ainsi, une faible densité cellulaire est associée à une régulation négative de l'expression fonctionnelle du récepteur β_1 -AR, à une activité hydrolytique des PDEs-AMPC plus faible et à des concentrations d'AMPC intracellulaire plus élevées que celles observées dans des cellules confluentes.

Notre deuxième étude montre que dans l'aorte de rat, l'IC est associée à une dysfonction endothéliale (DE), une hyperréactivité aux agents contractants et une altération de la fonction et de l'expression des PDEs-AMPC. Nos résultats suggèrent que l'altération de la voie du NO/GMPc suite à la DE conduit à une hyper-activation de la PDE3, qui masque la fonction de la PDE4 et altère la relaxation β -AR.

L'ensemble de ce travail met en évidence le rôle critique de l'environnement cellulaire dans le contrôle de la voie β -AR/AMPC/PDE des CMLVs

Title: Contribution of the phosphodiesterases in the regulation of vascular cAMP in pathophysiological situation.

Keywords Vascular smooth muscle, β -adrenoceptor, cAMP, phosphodiesterases, cellular density, heart failure.

Abstract: cAMP is second messenger which plays a prominent vasculoprotective role by its relaxing effects and inhibition of cell proliferation and migration. Intracellular cAMP level is regulated by its synthesis by adenylate cyclase and its degradation by phosphodiesterases (PDEs).

We evaluated the influence of cellular environment on signaling pathway coupled to β -adrenoceptors (β -AR/cAMP/PDE) on vascular smooth muscle cells (VSMCs), as well as potential alterations in heart failure (HF).

The first study showed that in cultured rat aortic SMCs exhibiting synthetic phenotype, the β -AR/cAMP/PDE signaling pathway is highly modulated by the cellular density.

Thus, the low density state being associated to a downregulation of the β_1 -AR, a lower cAMP-PDE activity and a higher basal [cAMP]_i compared to confluent cells.

Our second study showed that in rat aorta, HF is associated with endothelial dysfunction, hyper-reactivity to contractile agents and an alteration of function and expression of cAMP-PDEs. Our results suggest that NO/cGMP pathway alteration following the ED in HF leads to hyper-activation of PDE3 which masks PDE4 function and alters β -adrenoceptor relaxation

Thus, our works highlights the critical role of the cellular environment in controlling the vascular β -AR signaling.