Nouveaux variants d'épissage de l'Adenylyl cyclase 8 : de la caractérisation fonctionnelle vers la cible thérapeutique

Yohan Legueux-Cajgfinger

▶ **To cite this version:**

Yohan Legueux-Cajgfinger. Nouveaux variants d'épissage de l'Adenylyl cyclase 8 : de la caractérisation fonctionnelle vers la cible thérapeutique. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS005 . tel-03297248

HAL Id: tel-03297248
https://theses.hal.science/tel-03297248

Submitted on 23 Jul 2021

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.

Sorbonne Université
Faculté des Sciences et Ingénierie
Campus Pierre et Marie Curie

THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

ED394 - École Doctorale *Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique*

Réalisée au sein de l'UMR8256 CNRS/SU
Adaptation Biologique et Vieillissement
Équipe *Dynamique de la Signalisation Intracellulaire et Cibles Thérapeutiques*

NOUVEAUX VARIANTS D'ÉPISSAGE DE L'ADENYLYL CYCLASE 8 : DE LA CARACTERISATION FONCTIONNELLE VERS LA CIBLE THERAPEUTIQUE

Présentée par
Yohan LEGUEUX—CAJGFINGER

Dirigée par
La **Professeure Isabelle LIMON**

*Soutenue publiquement le **26 janvier 2021** devant un jury composé de :*

Mme Patricia SERRADAS, Professeure des Universités *Université Pierre et Marie Curie, Paris, France*	**Présidente**
Mme Muriel LAFFARGUE, Directrice de Recherche INSERM *Université Paul Sabatier, Toulouse, France*	**Rapportrice**
Mr Franck RIQUET, Professeur des Universités *Université de Gent, Belgique*	**Rapporteur**
Mr Thierry HUBY, Chargé de Recherche INSERM *Université Pierre et Marie Curie, Paris, France*	**Examinateur**
Mr Laurent DUCA, Professeur des Universités *Université de Reims-Champagne Ardenne, Reims, France*	**Examinateur**

Adaptation Biologique & Vieillissement

REMERCIEMENTS

Par où commencer ?

Je n'aurais jamais imaginé, quelques années en arrière, écrire ces lignes dans un manuscrit tel que celui que vous vous apprêtez à lire. Le doctorat n'était pas vraiment sur ma feuille de route lorsque j'ai commencé mes études supérieures. Comment aurais-je pu savoirs, avant de vivre ces trois dernières années, tout ce que m'apporterait cette expérience du doctorat ? La remise en question constante, "suis-je vraiment à la hauteur ?", la soif d'apprendre, l'envie d'explorer… Chaque moment de ma vie de doctorant m'a permis de m'élever. Ces quelques pages représentent donc pour moi l'opportunité de remercier tous ceux qui m'ont soutenu, challengé, assisté et accompagné au cours de ce voyage.

À mon équipe, si bienveillante, et qui va beaucoup me manquer… Je ne suis pas encore parti et pourtant, j'ai déjà hâte de vous retrouver lorsqu'un bout de chemin nous aura séparés.

Merci tout d'abord à Isabelle Limon, pour ta sympathie et ton humour, pour ton enseignement, pour ton franc parler et pour ta patience (*car il t'en aura fallu avec mes excentricités*). Ceux qui te connaissent savent qu'il n'est pas toujours simple d'être ton doctorant, tant tu peux te montrer exigeante. Et tant mieux : c'est ainsi que j'ai tiré le meilleur de ton enseignement. Tu m'as appris à m'organiser, à me surpasser pour donner le meilleur de moi-même. Malgré tes attentes, tu ne m'as jamais empêché d'effectuer toutes les activités, permises grâce au doctorat, qui m'attiraient tant. Merci de m'avoir accompagné jusqu'à la fin de cette aventure. À bientôt, et bon courage pour la suite.
PS : tu feras un coucou à Boubou de ma part, il m'aura fait bien rire !

Merci à Régis Blaise, définitivement une source d'enrichissement personnel et scientifique. Merci pour ton sourire, ta bonne humeur et ta grande sympathie. Merci pour tout ce que tu as apporté à mon projet de thèse : tes idées nous ont sorti de l'impasse à de nombreuses reprises. Merci pour ton exposé de bonnes nouvelles qui a réchauffé un peu mon cœur de doctorant fatigué en ce début de 2021. Merci pour ces conversations gaming et pour ces histoires et anecdotes intéressantes à partager. On se retrouvera vite sur *Apex* !

Merci à Pierre Vincent pour ton temps et ton oreille attentive, pour ta patience et ta sympathie, pour tes nombreux conseils, ton enseignement et pour ta confiance. À bien des égards, tu portes un regard sur la société dans lequel je me retrouve, ces nombreuses conversations étaient donc très enrichissantes. Puissions-nous en avoir davantage à l'avenir.

Merci à Mégane Babiak, un jour une collègue qui m'a énormément assisté, aujourd'hui une précieuse amie avec qui converser. Avant, maintenant et toujours, je te souhaite le meilleur.

Merci à Julie Stoufflet, pour tes conseils, ton attention et ta sagesse. Sache que je suis heureux que tu aies fait une quatrième année : passer cette dernière année sans toi aurait été bien moins sympathique. Au plaisir de nous revoir. Je te souhaite le meilleur.

Merci à Éric Bun, pour tout ce que tu es. Tu es l'une des rencontres les plus intrigantes de ma thèse.

Merci à tous les autres : Merci à **Justine Hur**, à **Ségolène Bompierre**, à **Célia Moulin**, à **Liliana Castro** et à **Bernard Brugg** pour vos conseils, votre aide et votre sympathie ; Merci à **Samar Fathallah** pour ton aide si précieuse et pour ton implication sans failles, je te souhaite bon courage pour la suite ; Merci à **Benjamin Vallin**, directement et indirectement, tu m'as beaucoup apporté, tant sur le plan personnel que scientifique.

Enfin, Merci à toi, Martine Glorian. Merci pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Tu m'as toujours accompagné dans tout ce que j'ai entrepris au cours de ce doctorat. Pour toutes mes expériences de communication, tu m'as aidé à travailler mes textes, à trouver les mots justes. Tu m'as invité à participer à la Fête De la Science et, grâce à toi, j'ai eu l'opportunité d'échanger sur notre métier et de sensibiliser au travers de multiples approches, toutes plus formatrices les unes que les autres. Le doctorat est une formation riche en enseignement, mais une chose est sûre : sans toi à mes côtés, je n'aurais pas autant appris.

À mon unité,

Merci à Bertrand Friguet, une personne sympathique avec qui tous les échanges sont source de bonne humeur.

Merci au personnel administratif de l'UMR8256, aux techniciens de surface, aux membres des autres équipes de recherche avec qui j'ai tant interagi : l'équipe de O. Agbulut, de B. Friguet, de C. Neri, de Z. Li, d'A. Trambleau.

Merci à Khadija El Hadri-Zegouagh, échanger avec toi et partager ces expériences de la Fête de La Science aura été un immense privilège.

À mon équipe Vis Ma Vie de Chercheur,

Merci à vous – **Yoann Kovacs**, **Helena Moguel**, **Elsa Charifou**, **Flaminia Zane**, **Natalia Belén**, **Virginia Ribeiro De Andrade** et **Leonor Keating** – pour avoir supporté toute l'année mes exigences et m'avoir fait confiance pour co-créer ce TP avec vous. Vous avez été une bouffer d'air, une connexion réelle et amicale pendant cette dernière année de thèse, et m'avez tous beaucoup apporté. Sachez qu'en écrivant ces lignes, je suis déjà nostalgique des TP avec nos lycéens. Merci aux maîtres de conférences qui nous ont accompagnés, sans qui cette aventure n'aurait pas pu se produire : **Mélanie Passes-Fessy**, **Caroline Dubacq** et **Régine Hepp**.

Il n'est pas simple de remercier tout le monde au travers de ces quelques lignes. Le laboratoire est un lieu plein de vie, où l'on fait de nombreuses rencontres. Certaines, juste de passage, d'autres, déterminantes, nous poussent à nous questionner, à nous dépasser. Alors Merci pour tous ces échanges qui, d'une certaine manière, ont formé le scientifique et l'homme que je suis aujourd'hui.

À mon jury de thèse,

Merci à chacun d'entre vous d'avoir accepté d'évaluer et de discuter de mon travail de thèse. Merci pour votre temps et votre implication. J'espère que ce travail, au travers de ce manuscrit, puis de la soutenance, saura vous satisfaire et vous interloquer.

À mes proches,

Merci à ma famille, qui m'a encouragé, écouté, et a suivi mes différentes aventures. J'espère que ce petit bout de ma vie vous aura rendu fiers. Merci à vous d'être toujours présents, toujours à mes côtés. Je vous aime à jamais.

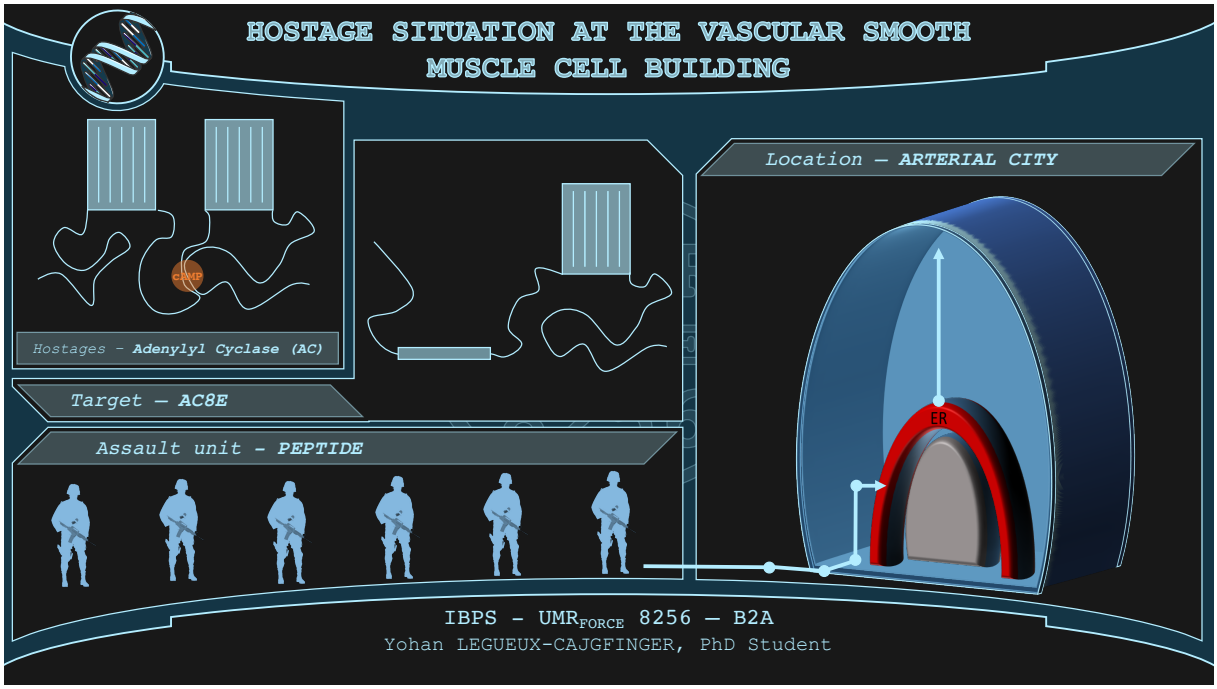
Merci à mes proches amis, **Chef**, **Goulox**, **Sara**, **Louise**, **Margaux**, **Jeff**, vous qui partagez ma route depuis toutes ces années…

Et pour finir, Merci à toi, Marina Nagel. Toi, toujours présente dans l'adversité, toi qui as supporté toutes mes humeurs, mes absences, ma fatigue, mes projets. Depuis toujours tu es mon rock, mon tout et ma moitié ; alors de cette épreuve, on a fait qu'une bouchée. L'avenir nous appartient et une chose est sure : il n'existe aucun terme ou superlatif pour te dire comme je t'aime.

RÉALISATIONS

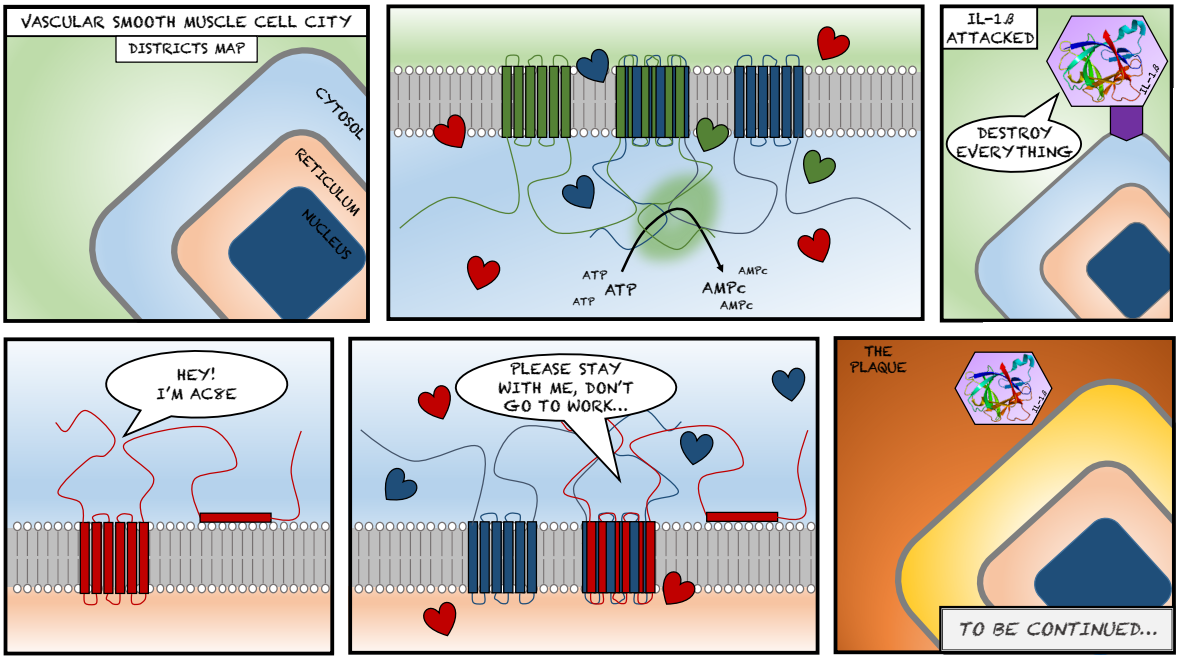
Poster Teasing – année 1

Ladies and gentlemen, we have a hostage situation at the vascular smooth muscle building of arterial city. It started after an interleukin-1 alert causing the building to go DEFCON-1. Then everything turned kind of crazy. The hostages, adenylyl cyclases, code name AC, were supposed to produce cAMP in response to our signals but went dark. We have identified the attackers, they come from inside and are designated under code name AC8E. They retain captive innocent ACs within the endoplasmic reticulum section of the building. Recent intels indicate that we already have casualties.
Peptide unit, your mission is simple: infiltrate VSMC building and save the hostages from AC8E fellows. Escort them to the plasma membrane section of the building. Be quick and sharp.
This message will now self-destroy.



Poster Teasing – année 2

Once upon a time, at Vascular Smooth Muscle Cell City, adenylyl cyclases were working hard to produce cAMP. They had a particular way of working: they dimerized with each other to work more efficiently. But one day, the IL-1β attacked, bringing a whole batch of nasty proteins along with it. Among them: AC8E. Its rebellious style with its five lost transmembrane domains really pleased the endogenous cyclases, which could not refrain their desire of dimerizing with it. The problem was that AC8E was lazy, quite persuasive, it convinced the endogenous cyclases to quit their job at the plasma membrane and to stay in the reticulum, to do nothing… Getting the situation from bad to worst...



Vis Ma Vie de Chercheur (VMVDC) :

TP créé dans le cadre de la demie-mission doctorale Vis Ma Vie De Chercheur (VMVDC), exercée au cours de ma troisième année de thèse. Une à deux fois par mois nous recevions plusieurs classes de lycéens de Première ou Terminale pour effectuer une enquête de police scientifique, discuter de l'orientation post-bac et présenter les règles d'éthique qui régissent la recherche en biologie.
Les lycéens devaient résoudre le meurtre de Paméla ROUGE, cheffe d'une équipe de l'institut de Biologie Paris-Seine retrouvée morte lors d'une retraite avec son laboratoire dans une région forestière isolée.

Le corps retrouvé au milieu de la forêt laissait apparaître des signes de lutte violente avec une plaie à l'arrière engendrée par un objet contondant. Pour autant, la victime avait de l'eau dans les poumons, révélant que la cause du décès était la noyade, et que le corps avait été déplacé. La victime avait également de la peau sous les ongles.

Trois questions étaient alors posées :

- Qui est le coupable ?
- Où la victime a-t-elle été tuée ?
- Quel objet est à l'origine de la plaie à la tête ?

Les lycéens devaient tout d'abord analyser l'indice représentant la meilleure opportunité d'identifier le coupable : l'échantillon de peau sous les ongles de la victime. Sur cet indice, ils devaient réaliser une PCR sur l'ADN qui en était extrait, et comparer le profil génétique généré par rapport au profil génétique de deux suspects du laboratoire.

Afin de localiser la vraie scène de crime, les lycéens devaient effectuer, par observation à la loupe binoculaire, une comparaison morphologique entre les espèces de larves de poissons issues des poumons de la victime et des 3 lacs à proximité du lieu de la retraite.

Les berges du lac dans lequel la victime a été assassinée étaient ensuite fouillées par des enquêteurs, ce qui permettait d'identifier deux objets contondants pouvant être à l'origine de la plaie à la tête. Les lycéens réalisaient alors une analyse au Luminol afin de détecter la présence de sang sur ces deux objets.

L'analyse des résultats de la PCR mettait en évidence une correspondance entre l'ADN de la peau retrouvée sous les ongles de la victime et l'ADN d'un des deux suspects.
Les lycéens nous quittaient donc après avoir identifié la scène de crime, une arme potentielle et principal suspect ; nous laissant le soin d'analyser cette arme en quête d'indices supplémentaires…

Le programme VMVDC 2019-2020 a été financé par la Ville de Paris, la Région Île-de-France, les académies de Paris, Créteil et Versailles, et l'Institut de Biologie Paris-Seine.

Ma Thèse en 180 secondes (MT180s) :

Fermez les yeux, voyagez en votre fort intérieur, sentez votre cœur battre, le sang affluer... Tiens, vous la sentez ? Cette petite plaque dans vos artères qui pourrait bientôt vous tuer ?
Chaque année en France, environ 150 000 personne meurent de maladies cardiovasculaires, soit une toutes les 3 minutes 30.
Donc oui, vers la fin de ma présentation, quelqu'un en France perdra sans doute la vie suite à un infarctus du myocarde ou un Accident Vasculaire Cérébral... Car ces événements tragiques, auquel nous pourrions tous confrontés un jour, surviennent de manière brutale, après des décennies de mise en place silencieuse, asymptomatique, insidieuse…
Maintenant que j'ai toute votre attention, je vais vous raconter une petite histoire : un peu notre histoire à tous...

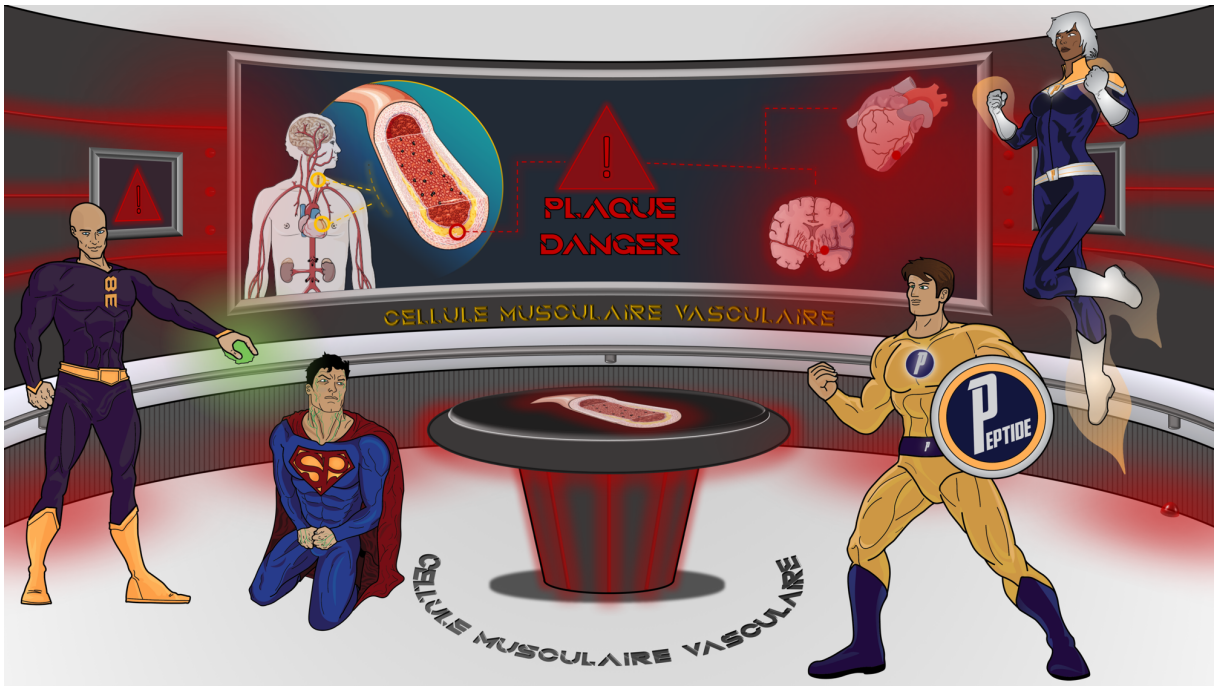
L'intrigue se déroule dans les cellules musculaires de nos artères. Normalement, ces petites cellules sportives sont gentilles : grâce à leur capacité à se contracter, elles régulent notre pression artérielle.
Mais quand elles sont sous la contrainte : cholestérol en excès, agents nocifs qu'on trouve dans la cigarette, par exemple, elles passent en mode DARK.
Elles arrêtent le sport, s'engraissent, et participent activement à la formation des plaques qui bouchent nos artères.
Non contentes de ça, elles participent également aux complications post-opératoires observées chez les patients victimes d'un accident cardiovasculaire qui sont traités par chirurgie.

"Mais comment c'est possible, et comment y remédier ?!". C'est là que ma thèse prend une tournure de film d'action.
Oui, pendant ma première année de thèse, j'ai montré dans ces cellules passées en mode DARK, des protéines garantes de notre protection cardiovasculaire, appelons les SUPERPROT, ont été capturées et sont retenues en otage. Elles ne peuvent donc plus protéger nos artères. Il est essentiel de les libérer…

Rassurez-vous, nous avons identifié l'assaillant. Il a pour nom de code : AC8E.
Mon rôle, c'est de créer une nouvelle équipe de super-héros chargés de libérer SUPERPROT : les PEPTIDES.
J'ai donc commencé par en apprendre plus sur l'assaillant, et comment il opère. En terme biologique, je cherche d'abord à identifier les séquences d'interaction entre les protéines otage et assaillant.
Autrement dit : je veux savoir comment sont positionnés otage et assaillant l'un par rapport à l'autre.
Ces informations sont essentielles, car je veux envoyer un agent, ou une petite escouade de PEPTIDES, capables de cibler spécifiquement AC8E, sans prendre de risques pour SUPERPROT.

Pour faire ça, j'ai créé un camp d'entrainement sur-mesure pour sélectionner et entrainer les PEPTIDES. Ce sont des cellules qui expriment les principaux acteurs de notre histoire : AC8E et SUPERPROT. J'y évalue la capacité de chaque PEPTIDE à résoudre cette situation périlleuse.
Ils sont évalués sur 2 paramètres : leur capacité à libérer SUPERPROT de l'emprise d'AC8E, mais j'évalue également l'activité de SUPERPROT. En effet, je veux qu'il se remettre au travail dès sa libération.
Une fois ces PEPTIDES opérationnels, peut-être pourrons-nous déjà endiguer ces malencontreuses complications post-opératoires.

Et si le caractère anxiogène de mon introduction a touché au moral de certains, déjà, mangeons bien, bougeons-nous… Mais dites-vous aussi que l'avantage d'avoir un film de super-héros dans nos artères, c'est qu'en général, à la fin, tout le monde est sauf, donc nous aussi. Enfin, je l'espère…



Pour accéder à la vidéo :

https://youtu.be/PRWrbxvo_gc

Flash Poster NSFA 2020 :

Écrit mais jamais présenté, ce poème à destination d'un public de biologistes image mon projet doctoral. Passionné par ce type d'exercices de communication, je souhaitais être sélectionné pour un Flash Poster au congrès de la NSFA 2020, afin d'avoir l'opportunité de le présenter.

Au confins de nous-mêmes, dans sa cage osselée,
Cœur bat à bon rythme, et nous fait exister.
Irrigué de toutes parts par nos précieuses artères,
Mais quand le flux s'arrête, Cœur est six pieds sous terre.

Nichée sur son perchoir, reine des songes et des doutes,
Quelque partie du corps, elle les gouverne toutes.
Sympathique ou non, autonome, volontaire,
Tête ne se doute pas, comme elle pourrait se perdre…

Actrices de ce désastre, où tout a dérapé,
Cellules musculaires lisses, c'est elles qui ont switché.
Dans la paroi des artères, patiemment elles attendent,
Le signal destructeur, qui les rend alarmantes.

Plongeons-nous un peu plus, dans ce bel engrenage.
Il est temps d'introduire Adenylyl cyclases.
A la frontière des mondes, elles transmettent les signes,
Cellules environnantes, intérieur infini...

Travailleuses volontaires, à la membrane plasmique,
Elles allaient y produire de l'AMP cyclique.
Travailleuses pleines d'amour, elles donnaient de leur corps,
En se dimérisant, produisant plus encore.

Ô AMPc, par ses effets il brille :
Déjà quand il relaxe cellules musculaires lisses,
Ou protège nos artères, et nous garde bien en vie.
Depuis tout a changé, les cyclases roupillent

La cause de ce désastre, on l'a identifiée,
Oui l'IL-1β, c'est lui qui a frappé…
Et pendant cette attaque, beaucoup ont débarqué,
Vous connaissez l'effet de NFκB…

Parmi tous les intrus, j'en traque un bien dangereux.
Un nom sur cette cible : celui d'AC8E.
Plutôt originale, cette zone transmembranaire...
AC8E, rebelle, ne pouvait faire que plaire.

Cyclases endogènes tombèrent sous son charme,
Ici tirons nous donc, un dur signal d'alarme…
Car elles ne résistèrent à leurs désirs ardents,
Laissant seules, amoindries, leurs compagnes d'antan.

Elles se jouèrent de l'amour, au détriment des leurs,
Adenylyl cyclases, sentirent vive douleur,
Nostalgiques des temps anciens, où elles étaient comblées.
Dans le réticulum, elles restent confinées…

La conséquence de ça, plus tôt je l'ai citée.
Et voilà que le glas, se prépare à sonner…
Mais ce n'est pas la fin, enfin espérons-le,
Alors revenons-en à notre AC8E.

J'essaye de la comprendre, de la faire parler,
De trouver son point faible : la tâche qu'on m'a confiée.
Et chaque jour depuis, j'apprécie le voyage,
Et de cette expérience, je vous porte ce message :

Coupez-lui le bras, elle tire sa révérence.
C'est d'son domaine N-ter, qu'elle tire sa toute puissance.
Sa complémentarité, je l'ai enfin comprise.
Mes manches relevées, pour qu'elle lâche son emprise.

Cette thèse quasi achevée, une quête perpétuelle,
Parfois clair et obscur, une charge émotionnelle...
Sur cette dernière note, je sens mon cœur cogner,
Et j'espère humblement, vous avoir étonnés...

Fête De la Science (FDS) 2020 @ Sorbonne Université :

Réalisation d'une vidéo de vulgarisation scientifique et participation l'émission en direct Les Couloirs du Temps

Synopsis :

L'alimentation a un impact majeur sur notre espérance de vie en bonne santé. Elle peut participer à la mise en place de maladies chroniques comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires, ou, au contraire, nous en préserver. Pourtant, en France, comme dans de nombreux pays, les données montrent que les comportements alimentaires adoptés par la population présentent un risque pour la santé.

De notre cerveau aux livres d'histoire, en passant par les laboratoires de recherche : revenons ensemble sur les fondements scientifiques et la démarche expérimentale qui se cachent derrière les slogans autour de notre assiette.

Vidéo de vulgarisation

Alimentation et Santé :
La Science Derrière Les Slogans

Pour accéder à la vidéo :
https://youtu.be/WQwkzRmdfC8

Vidéo de vulgarisation scientifique réalisée, tournée et montée par mes soins, écrite avec l'aide précieuse de Martine Glorian (MCU @ Sorbonne Université) et de Khadija El Hadri-Zegouagh (Professeur @ Sorbonne Université).

Émission en direct

Science en Vue :
Les Couloirs Du Temps

Pour accéder à la vidéo :
https://youtu.be/GRbmrhidL-8?t=6571

Émission animée par Bertrand Augustin, animateur de la chaine YouTube *J'm'énerve pas, j't'explique*, présentée en direct sur la chaine YouTube de Sorbonne Université le lundi 5 octobre 2020.

x

RESUME

La trans-différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), d'un phénotype quiescent et contractile, vers un phénotype migratoire, prolifératif, inflammatoire et spumeux joue un rôle clé dans l'initiation et la progression des lésions athéromateuses, et dans le phénomène de re-sténose post-angioplastie. L'identification des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la transition phénotypique des CMLV représente donc un enjeu majeur de la recherche cardiovasculaire.

Les travaux de notre équipe démontraient que l'expression *de novo* de l'Adenylyl Cyclase (AC) 8 participe à la trans-différenciation des CMLV vers un phénotype migratoire et inflammatoire, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Chez la souris KO ApoE$^{-/-}$, l'extinction de l'AC8 limite l'inflammation de l'aorte abdominale et l'étendue des lésions athéromateuses. Chez l'Homme, l'AC8, absente de la paroi artérielle saine, est détectée dans l'intima de lésions athéromateuses coronaires et carotidiennes. Cependant, l'expression *de novo* de cette AC dans les CMLV trans-différenciées était contre-intuitive ; en effet, de nombreux travaux mettent en évidence le rôle vasculoprotecteur de la voie de signalisation AMPc du fait de son effet inhibiteur sur les capacités migratoires, prolifératives et inflammatoires des CMLV, tant *in vitro* qu'*in vivo*, chez le rongeur et chez l'Homme.

L'analyse des dynamiques de production d'AMPc, effectuée par imagerie de biosenseur optique, révèle que l'expression de l'AC8 se traduit en fait par une inhibition de l'élévation de la concentration cytosolique en AMPc dans les CMLV de rat trans-différenciées à l'aide de l'IL-1β. L'AC8 des CMLV de rat trans-différenciées se décline en 4 nouveaux variants issus d'épissages alternatifs : les AC8E-H. Ces variants présentent tous une délétion commune des 5 premiers domaines transmembranaires de l'enzyme et les boucles intra- et extracellulaires associées.

L'objectif de ma thèse a été d'effectuer la caractérisation fonctionnelle et biochimique des AC8E-H. Nos résultats indiquent que l'expression de ces variants dans les CMLV trans-différenciées participerait à l'émergence et au maintien du phénotype synthétique, suggérant qu'ils s'opposent aux effets vasculoprotecteurs de l'AMPc. En effet, l'analyse par imagerie de biosenseur des dynamiques de production d'AMPc en système d'expression hétérologue, et celle des dosages d'accumulation d'AMPc, démontrent que ces formes tronquées de l'AC8 exercent un effet inhibiteur sur toutes les AC fonctionnelles testées, notamment sur les AC3 et -6 bien exprimées dans les CMLV. Cet effet dominant-négatif résulte d'une part de l'interaction physique entre les AC8E-H et les AC fonctionnelles qui empêche l'adressage des AC fonctionelles à la membrane plasmique et, d'autre part, du domaine N-terminal qui exerce une inhibition directe de l'activité catalytique de l'AC fonctionnelle du complexe. On notera que l'hétérodimérisation et la rétention intracellulaire des AC fonctionnelles est suffisante pour que les AC8E-H exercent leur effet dominant-négatif sur la production globale d'AMPc.

Après avoir criblé les séquences peptidiques des cassettes transmembranaires des AC8E, AC3 et AC6 par une approche de PEPscan, nous avons identifié des motifs impliqués dans l'hétérodimérisation de l'AC8E avec ces AC partenaires. Ces résultats ont permis de concevoir 10 peptides candidats en vue d'inhiber l'hétérodimérisation de l'AC8E avec les AC3 et AC6.

Parallèlement, nous avons modélisé, pour la première fois, la structure tridimensionnelle intégrale des AC3 et AC8 sur la base de celle de l'AC9 récemment partiellement élucidé. Cette structure met en évidence un positionnement symétrique et opposé des domaines N-terminal et C1b autour de la région hélicoïdale des AC, suggérant qu'ils puissent réguler la conformation du site catalytique et donc son activité. Ces structures serviront à modéliser le complexe AC8E/AC3 afin d'évaluer le niveau d'interaction entre les peptides issus des expériences de PEPscan et leur cible pour déterminer les meilleurs candidats puis les optimiser.

ABRÉVIATIONS

A

AC : Adenylyl cyclase
AC2-HA : Adenylyl cyclase 2 étiquetée HA
AC3-HA : Adenylyl cyclase 3 étiquetée HA
AC6-HA : Adenylyl cyclase 6 étiquetée HA
AC8E-HA : Adenylyl cyclase 8E étiquetée HA
AC8E-VSV-G : Adenylyl cyclase 8E étiquetée VSV-G
AKAP : Protéine d'ancrage de la protéine kinase A
AMP : Adénosine 5'-Mriphosphate
AMPc : Adénosine 3',5'-Monophosphate Cyclique
ApoE : Apolipoprotéine E des LDL
ATP : Adénosine 5'-Triphosphate
AVC : Accident vasculaire cérébral

C

C1 et C2 : Domaines cytosoliques des adénylyl cyclases
Ca^{2+}/CaM : Complexe calcium-calmoduline
CaM : Calmoduline
CDS : Séquence codante
CFTR : *Cyctic fibrosis transmembrane conductane regulator*
CML : Cellule musculaire lisse
CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire
CNBD : *Cyclic nucleotide-binding domain*
CNG : *Cyclic nucleotid-gated channel*
Co-IP : Co-immunoprécipitation

D

DAG : Diacylglycérol
DMEM : *Dubelcco's modified Eagle medium*

E

EMA : *European Medicines Agency*
Epac : *Exchange protein directly activated by cAMP*
ERAD : *Endoplasmic reticulum associated degradation*
ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*

F

FDA : *Food and Drug Administration*
FRET : *Fluorescence resonance energy transfer*
Fsk : Forskoline

G

GAL3 : *Galectin 3*
GAP : *GTPase-activating proteins*
GC : Guanylyl cyclase
GDP : Guanosine 5'-Monophosphate
GLP-1 : *Glucagon-like peptide 1*
GMPc : Guanosine 3',5'-Monophosphate
GTP : Guanosine 5'-Triphosphate

H

HEK : *Human embryonic kidney cells*

I

IB : Immunoblot
IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine
ICAM-1 : *Intracellular adhesion molecule 1*
IFN-ɣ : interféron-ɣ
IL-1β : Interterleukine-1β
IP : Immunoprécipitation
IP_3 : Inositol 1,4,5-triphosphate

L

LAMP2 : *Lysosome-associated membrane glycoprotein 2*
LDL-R : Récepteur au LDL
LpPLA2 : *Lipoprotéine-associated phospholipase A2*

M

M-CSF : *Macrophage colony-stimulating factor*
M1 et M2 : Cassettes transmembranaires des adenylyl cyclases
MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1*
MHC : Chaine lourde de la myosine
MLC : Chaine légère de la myosine
MLC20 : Chaine légère phosphorylable de la myosine
MLCK : *Myosin light chain kinase*
MLCP : *Myosin light chain phosphatase*
MRP : *Multidrug resistance proteins*

N

NCX : Échangeur Na^+/Ca^{2+}
NM-MHC : *Non muscular-myosin heavy chain*
NO : Monoxyde d'azote / Oxyde nitrique

P

PCSK9 : *Proprotein convertase subtilisin/kexin de type 9*
PDE : Phosphodiesterase
PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PGI_2 : Prostaglandine I_2 ou prostacycline
PIP_2 : phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase B
PKG : Protéine kinase G
PLC : phospholipase C
PMCA : *Plasma membrane Ca^{2+}-ATPase*

R

RCPG : Récepteur couplé à une protéine G
REG : Réticulum endoplasmique granuleux
RGS : *Regulators of G protein signaling*

S

siRNA : ARN interférents
SM-MHC : *Smooth muscle-myosin heavy chain*
SVF : Sérum de veau fœtal

T

TGF-β : *Transforming growth factor* β
TH1 : *T helper 1 cell* – Lymphocyte T auxiliaire 1
TH2 : *T helper 2 cell* – Lymphocyte T auxiliaire 2
TM : Domaine transmembranaire des adenylyl cyclases
TNF-α : *Tumor necrosis factor*-α

V

VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....1

Partie 1 : La voie adénosine 3',5'-monophosphate cyclique.....3

I. La voie AMPc.....3

A. L'AMPc.....3

1. Découverte de l'AMPc.....3
2. Régulation des niveaux cytosoliques d'AMPc.....4
   a) Synthèse.....4
   b) Dégradation.....5
   c) Extrusion.....7
3. Méthodes de mesure de l'AMPc.....8
   a) Mesure de l'accumulation d'AMPc.....8
   b) Dosage de l'activité cyclase.....9
   c) Mesure dynamique de la production d'AMPc.....9

B. Effecteurs de l'AMPc.....13

1. La protéine kinase A.....13
2. Les canaux CNG.....14
3. Les facteurs d'échange Epac.....14

C. Compartimentalisation du signal.....16

II. Les Adenylyl Cyclases.....17

A. Généralités.....17

B. Structure des Adenylyl Cyclases membranaires.....17

1. Structure primaire des AC.....17
2. Structure tridimensionnelle des ACs.....20

C. Dimérisation des Adenylyl Cyclases.....23

D. Régulation et classification des adenylyl cyclase.....26

1. Régulation de l'activité cyclase.....26
   a) Régulation par les protéines G hétérotrimériques.....26
   b) Régulation par le calcium.....27
   c) Autres régulations.....29
2. Classification des Adenylyl Cyclases.....31

E. Distribution tissulaire et fonctions physiologiques des adenylyl cyclases.....33

1. Apport des études transcriptomiques et des modèles murins.....33
2. Implication des AC dans de multiples pathologies humaines.....35

Partie 2 : Artères et remodelages vasculaires pathologiques……37

I. La paroi artérielle saine ……37

A. Le système vasculaire …… 37

1. Généralités ……37
2. Classification des vaisseaux sanguins……38
   a) Le système artériel ……38
      i) La structure des artères ……38
      ii) Les vaisseaux du système artériel……39
   b) Le système veineux……40
   c) Les capillaires ……40

B. Principaux types cellulaires de la paroi artérielle…… 42

1. Les cellules endothéliales ……42
2. Les cellules musculaires lisses vasculaires……44
   a) Généralités sur les cellules musculaires lisses vasculaires……44
   b) Marqueurs phénotypiques……44
   c) Mécanismes de la contraction et de la relaxation……45

II. De l'Athérosclérose à la re-sténose ……49

A. L'athérosclérose…… 49

1. Définition et généralités……49
   a) La première cause de mortalité à travers le monde……49
      i) Définition et généralités……49
      ii) Prévalence et manifestations cliniques des maladies cardiovasculaires……50
   b) Facteurs de risques……51
2. Histoire de l'athérosclérose……53
   a) Une maladie présente depuis des millénaires ……53
   b) Découverte de la maladie et premières descriptions ……54
3. Les principales étapes de l'athérogénèse……55
   a) Initiation de la lésion athéromateuse……55
   b) Progression du processus d'athérogénèse ……57
   c) Les CMLV dans l'athérogénèse : une implication sous-estimée……59
4. Classification des lésions athéromateuses ……61
   a) Lésions précoces……61
   b) Lésions avancées ……62
5. Localisation des lésions athéromateuses ……64

B. Prévention et traitements des maladies cardiovasculaires : apports et limites …… 65

1. Prévention primo-primaire et prévention primaire ……65
2. Prévention secondaire ……65
   a) Traitement médicamenteux……65
      i) Les hypolipidémiants ……66
      ii) Cibler plus que l'hypercholestérolémie……68
   b) Traitements chirurgicaux ……69
      i) Traitement du caillot……69
      ii) Traitement de la plaque d'athérosclérose……70

C. La re-sténose post-angioplastie …… 71

1. Causes de la re-sténose post-angioplastie ……71

2. Les stents actifs : apports et limites 72

D. Une approche thérapeutique de plus en plus répandue : les peptides interférents 74

1. Conception de peptides interférents correspondant aux motifs de l'interface protéine-protéine ... 75
   a) Conception rationnelle des peptides interférents 75
   b) Approches en l'absence de structure tridimensionnelle des protéines formant le complexe 76
2. Ciblage de l'interaction protéine-protéine intracellulaire : apport des séquences « cargo » 77
3. Les peptides : une position croissante sur le marché pharmaceutique 79

III. La signalisation AMPc dans les cellules musculaires lisses vasculaires 80

A. Isoformes d'adenylyl cyclase exprimées dans les cellules musculaires lisses vasculaires ... 80

B. Effets de la signalisation AMPc dans les cellules musculaires lisses 80

C. L'adenylyl cyclase 8 : une actrice inattendue des remodelages vasculaires pathologiques. 84

1. Généralités sur l'adenylyl cyclase 8 84
   a) Gène et homologie entre espèces 84
   b) Propriétés de régulation et partenaires d'interaction 84
   c) Variants d'épissage alternatif de l'adenylyl cyclase 8 86
   d) Distribution tissulaire et fonctions physiologiques 88
2. Adenylyl cyclase 8 et trans-différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires 89

Objectifs et approche générale 93

MATERIEL ET METHODES 95

I. Constructions plasmidiques 97

II. Purification de protéines pour le PEPscan 97

III. PEPscan 98

IV. Traitement des CMLV par les peptides candidats 98

V. Anticorps 99

VI. Modélisation in silico des adenylyl cyclases 99

RESULTATS 101

I. AC8E-H : une nouvelle sous-famille d'AC, issue de variants d'épissage de l'Adenylyl Cyclase 8 104

II. AC8E : rôle, sélectivité et régions clés 111

A. Sélectivité de l'AC8E vis à vis des AC fonctionnelles 112

B. Implication du domaine N-terminal de l'AC8E dans son effet dominant négatif 114

C. Identification des séquences impliquées dans l'interaction entre l'AC8E et l'AC3 ou l'AC6 122

1. Purification des AC 123
2. PEPscan 124

D. Analyse de peptides candidats..... 126

E. Modélisation..... 128

DISCUSSION.....141

I. Caractérisation d'une nouvelle famille de variants d'épissage alternatif de l'adenylyl cyclase 8.....144

A. Mise en évidence 144

B. Caractérisation biochimique et fonctionnelle 144

C. Le domaine N-terminal est nécessaire à l'effet dominant-négatif des AC8E-H 147

D. L'hétérodimérisation des ACE-H/AC, retenant les AC fonctionnelles dans le REG, est suffisante pour l'effet dominant-négatif 148

II. Identification des motifs peptidiques impliqués dans l'hétérodimérisation.....150

III. Modélisation de la structure tridimensionnelle des adenylyl cyclases 151

IV. Les variants d'épissage des AC exerçant un effet dominant-négatif : un nouveau mode de régulation de la voie de signalisation AMPc jusqu'alors inconnu ?.....152

REFERENCES.....155

ANNEXES.....181

ANNEXE 1 : L'AC8E interagit avec l'AC3 par sa cassette transmembranaire M2. 183

ANNEXE 2 : Les AC8E-H interagiraient préférentiellement avec l'AC6 dans les CMLV trans-différenciées à l'IL-1β. 184

ANNEXE 3 : Orientation des AC8A et AC8E-H dans la membrane plasmique. 186

ANNEXE 4 : Aucune des délétions effectuées dans le domaine N-terminal empêche l'effet dominant-négatif de l'AC8E 188

ANNEXE 5 : Identification des cassettes transmembranaires (M1 et/ou M2) des AC3 et AC6 impliquées dans l'hétérodimérisation avec l'AC8E. 190

ANNEXE 6 : Purification des AC étiquetées HA.....191

ANNEXE 7 : Caractérisation d'un variant d'épissage de l'AC6 cloné dans les CMLV de rat. 196

ANNEXE 8 : Modélisation des AC. 198

FIGURES, ILLUSTRATIONS, TABLEAUX

INTRODUCTION

Figures

Figure I.1 : synthèse d'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique à partir d'adénosine-5'-triphosphate. 4
Figure I.2 : Hydrolyse de l'adénosine-3',5'-monophosphate cyclique en adénosine-5'-monophosphate. 5
Figure I.3 : Quantification absolution de la synthèse d'AMPc. 9
Figure I.4 : Principe de fonctionnement du biosenseur YFP-Epac1-CFP 12
Figure I.5 : Structure générale des Adenylyl Cyclases transmembranaires. 18
Figure I.6 : Structure des domaines 5C1 et 2C2 et du site catalytique activé par Gαs. 21
Figure I.7 : Représentation 3D du domaine hélicoïdal formé par l'homodimérisation de l'AC Cya de *Mycobacterium intracellulare* 22
Figure I.8 : Structure publiée de l'AC9 23
Figure I.9 : La dimérisation intra- et intermoléculaire des AC. 23
Figure I.10 : Arbre phylogénétique des neuf isoformes d'adenylyl cyclases transmembranaires 31
Figure I.11 : Représentation schématique de la paroi artérielle. 39
Figure I.12 : Paroi vasculaire des artères et artérioles 40
Figure I.13 : Paroi vasculaire des veines et veinules. 40
Figure I.14 : Propriétés des différents types de capillaires. 41
Figure I.15 : Représentation schématique des mécanismes de la contraction et de la relaxation des CMLV. 48
Figure I.16 : Représentation schématique d'une artère athérosclérosée 49
Figure I.17 : Représentation schématique de la versatilité du phénotype des CMLV trans-différenciées dans la plaque d'athérosclérose. 57
Figure I.18 : Schéma de l'implication des CMLV dans l'athérogénèse 60
Figure I.19 : Lésion de type I. 61
Figure I.20 : Lésion de type IIa. 62
Figure I.21 : Lésion de type III. 62
Figure I.22 : Lésion de type IV. 63
Figure I.23 : Lésion de type V. 63
Figure I.24 : Lésion de type VI. 64
Figure I.25 : L'angioplastie percutanée 70
Figure I.26 : La re-sténose post-angioplastie. 71
Figure I.27 : Représentation schématique de l'effet d'un peptide interférent ciblant une interaction protéine-protéine 74
Figure I.28 : Les deux approches principales pour prédire le complexe protéine-protéine *in silico*. 76
Figure I.29 : Quantification de la pénétration cellulaire de protéines de fusion GFP-cargo. 79
Figure I.30 : Mécanisme d'activation de l'AC8 par le Ca^{2+}/CaM. 85
Figure I.31. Représentation schématique des ARNm et protéines des variants d'épissage alternatif de l'AC8. 87
Figure I.32 : Implication de l'AC8 dans le développement des lésions athéromateuses chez la souris KO $ApoE^{-/-}$. 90
Figure I.33 : Immunomarquages de PECAM-1, AC8, SM-MHC et Cycline D1 sur des coupes de carotides de rat après angioplastie au ballonnet. 91

Tableaux

Tableau I.1 : Propriétés, distribution tissulaire et impact de l'extinction des phosphodiesterases. 6
Tableau I.2 : Localisation et propriétés des canaux MRP.....7
Tableau I.3 : Taille et similarité des Adenylyl Cyclases humaines. 19
Tableau I.4 : Similarité des Adenylyl Cyclases entre plusieurs espèces. 20
Tableau I.5 : Régulations des Adenylyl Cyclases transmembranaires. 32
Tableau I.6 : Distribution tissulaire et fonctions physiologiques des AC mammifères. 34
Tableau I.7 : Intervention possibles en fonction du taux plasmatique de LDL-cholestérol et du score de risque cardiovasculaire. 66
Tableau I.8 : Profil d'expression des isoformes d'AC dans divers types de CML. 80

MATERIEL ET METHODES

Figures

Figure M.1 : Représentation schématique de l'approche PEPscan. 98

Tableaux

Tableau M.1 : Liste des anticorps et dilution pour chaque application. 99

RESULTATS

Figures

Figure R.1 : Représentation schématique et séquence peptidique des variants de l'AC8. 105
Figure R.2 : Les variants AC8E-H exercent un effet inhibiteur sur la dynamique de production d'AMPc. 106
Figure R.3 : L'AC8E exerce son effet dominant-négatif via une inhibition de l'activité des AC fonctionnelles. ..107
Figure R.4 : L'AC8E interagit physiquement avec l'AC3 et inhibe son activité catalytique. 108
Figure R.5 : L'AC8E interagit avec différentes isoformes d'AC.....112
Figure R.6 : L'AC8E inhibe l'activité des AC2, AC3 et AC6 induite par la forskoline. 113
Figure R.7 : La délétion du domaine N-terminal de l'AC8E restaure la réponse des cellules à la forskoline 115
Figure R.8 : Le domaine N-terminal de l'AC8E joue un rôle primordial dans son effet dominant négatif. 117
Figure R.9 : Le domaine N-terminal de l'AC8E joue un rôle primordial dans son effet dominant négatif. 118
Figure R.10 : L'AC8EΔNt s'hétérodimérise avec l'AC3.....119
Figure R.11 : L'AC8E et l'AC8EΔNt inhibent la réponse des cellules à l'isoprotérénol. 121
Figure R.12 : Identification des motifs d'acides aminés (en rouge) de l'AC8E impliqués dans l'hétérodimérisation avec l'AC3 et l'AC6.....124
Figure R.13 : Identification des motifs d'acides aminés (en rouge) des AC3 et AC6 impliqués dans l'hétérodimérisation avec l'AC8E. 125
Figure R.14 : Effet des peptides candidats sur la dynamique de production d'AMPc dans les CMLV. 127
Figure R.15 : Modélisation *in silico* de l'AC9 et localisation des domaines N-terminal et C1b.....129
Figure R.16 : Modélisation *in silico* des AC3, AC8 et AC8E. 131

Tableaux

Tableau R.1 : Peptides candidats générés sur la base des résultats de PEPscan.....126

Figures Publication

Figure P.1 : AC8E heterodimerizes with AC2, AC3 and AC6 and inhibits AC activity. 133
Figure P.2 : N-terminal removal from l'AC8E restores forskolin-induced cAMP production. 134
Figure P.3 : N-terminal is necessary to inhibit the activity of endogenous AC..... 135
Figure P.4 : N-terminal removal from AC8E suppress the inhibition on AC3 activity, but does not prevent heterodimerization. 136
Figure P.5 : Heterodimerization of AC8E and the non-inhibiting mutant AC8EΔNt is sufficient to exert dominant-negative effect. 137
Figure P.6 : Identification of the peptide motifs from AC8E (in red) involved in heterodimerization with AC3 and AC6. 138
Figure P.7 : Identification of the peptide motifs from AC3 and AC6 (in red) involved in heterodimerization 138
Figure P.8 : *In silico* modeling of AC9 structure and localization of N-terminal et C1b domains. 139
Figure P.9 : *In silico* modeling of AC3, AC8A and AC8E structures..... 140

ANNEXES

Figures

Figure A.1 : La délétion du fragment C1b-M2-C2 supprime la capacité de l'AC8E à s'hétérodimériser avec l'AC3. 183
Figure A.2 : L'expression de l'AC6 dans les CMLV traitées à l'IL1ß est dépendante de l'AC8. 184
Figure A.3 : L'orientation membranaire de l'AC8A respecte la loi de la balance des charges..... 186
Figure A.4 : Orientation membranaire de l'AC8E. 187
Figure A.5 : Mutants de l'AC8E présentant une délétion partielle du domaine N-terminal. 188
Figure A.6 : Les délétions de 45aa dans le domaine N-terminal de l'AC8E ne lèvent pas l'effet inhibiteur de l'AC8E. 189
Figure A.7 : Représentation schématique des constructions réalisées. 190
Figure A.8 : La cassette transmembranaire M2AC8 interagit préférentiellement avec la cassette M1 de l'AC6. 190
Figure A.9 : Purification des AC étiquetées HA par approche de transcription-traduction in vitro..... 191
Figure A.10 : Mise au point de la chromatographie d'affinité pour purifier les AC-HA. 192
Figure A.11 : Purification des HA-AC3, HA-AC6 et HA-AC8E. 194
Figure A.12 : Identification d'un variant d'épissage de l'AC6 présentant une délétion de 18aa dans le domaine C1. 196
Figure A.13 : La délétion des acides aminés 457 à 474 de l'AC6 induit un effet dominant-négatif. 197
Figure A.14 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC9 dans la séquence peptidique. 198
Figure A.15 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC3 dans la séquence peptidique. 199
Figure A.16 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC8A dans la séquence peptidique. 199
Figure A.17 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC8E dans la séquence peptidique..... 199
Figure A.18 : Modèle de la structure des régions N-terminale, C1b et C2b des AC9, AC3, AC8A et AC8E..... 200

INTRODUCTION

Partie 1 : La voie adénosine 3',5'-monophosphate cyclique.

I. La voie AMPc

A. L'AMPc

L'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) est un second messager universel présent dans l'ensemble du règne vivant. Il assure la transduction de signaux extracellulaires induits par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G. Chez l'Homme, l'AMPc joue le rôle d'intermédiaire dans l'action de nombreuses molécules signalétiques endogènes – *adrénaline, hormones thyroïdiennes, vasopressine, glucagon, etc…* – mais assure également l'intégration de stimuli exogènes, telles que les molécules odorantes.

1. Découverte de l'AMPc

L'AMPc est le premier second messager à avoir été identifié. Au cours des années 1950, Earl Wilbur Sutherland Jr. et ses collaborateurs effectuent des recherches sur le fonctionnement des hormones. Leur objectif était d'élucider le mécanisme par lequel l'adrénaline et le glucagon modulent l'activité de la glycogène phosphorylase, enzyme impliquée dans le processus de glycogénolyse dans le foie. A l'époque, les chercheurs prennent le parti d'effectuer leurs expériences sur des homogénats de tranches de foie, plutôt que sur des cellules intactes, et cassent le dogme alors en vigueur voulant que l'action des hormones ne puisse s'exercer que sur des cellules intactes. Par cette approche, ils mettent en évidence que l'activation de la glycogène phosphorylase ne peut être effectuée qu'en présence de la fraction particulaire des homogénats, dans lesquelles se trouvent les membranes cellulaires. Dans cette fraction des homogénats est produit un **facteur résistant à la chaleur** permettant l'activation de la glycogène phosphorylase dans la fraction surnageant sur laquelle les hormones n'ont aucun effet. La purification de ce facteur permit aux chercheurs d'en déterminer sa nature, c'est la découverte de l'AMPc (Rall, Sutherland and Wosilait, 1956 ; Sutherland and Wosilait, 1956 ; Wosilait and Sutherland, 1956 ; Berthet, Rall and Sutherland, 1957). Quelques années plus tard, Earl Wilbur Sutherland Jr. et ses collaborateurs décrivent pour la première fois l'enzyme responsable de la conversion de l'ATP en AMPc, et la nomment ***Adenylyl Cyclase***. Ils la mettent en évidence chez de multiples espèces : chien, bœuf, cochon, chat, lapin, rat, poulet, pigeon (Sutherland, Rall and Menon, 1962).

Earl Wilbur Sutherland Jr. Obtiendra le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1971 pour ses découvertes sur le mécanisme d'action des hormones.

Photo de Earl Wilbur Sutherland Jr.
Depuis Kresge, Simoni et Hill, *Journal of Biological Chemistery*, 2005.

2. *Régulation des niveaux cytosoliques d'AMPc*

a) ***Synthèse***

L'AMPc est synthétisée par les **adenylyl cyclases (AC)** à partir d'une molécule d'ATP en présence de cations divalents Mg^{2+}. La synthèse d'AMPc s'effectue par hydrolyse de la liaison phosphoanhydride entre les phosphates α et β de l'ATP, et par la formation d'une liaison ester entre le phosphate α et la fonction alcool du carbone 3' du ribose de l'ATP. Elle est accompagnée de la libération d'un ion pyrophosphate (**Figure I.1**). **Les AC feront l'objet du chapitre suivant (*II. Les Adenylyl Cyclases*).**

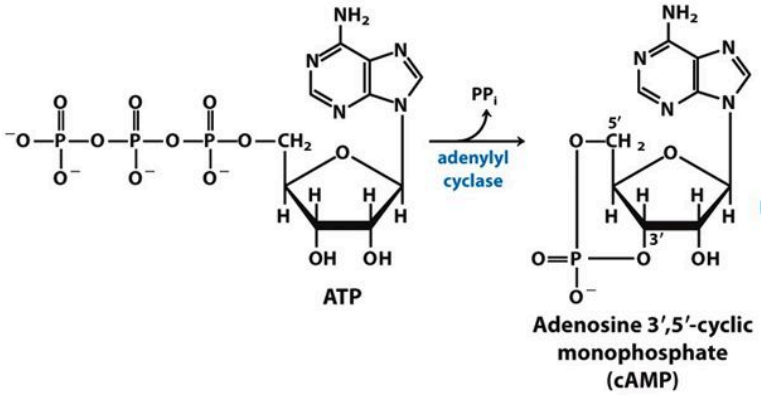


Figure I.1 : synthèse d'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique à partir d'adénosine-5'-triphosphate.

b) ***Dégradation***

Les phosphodiesterases (PDE) hydrolysent la liaison ester reliant le phosphate α et le carbone 3' du ribose de l'AMPc, générant une molécule d'adénosine-5'-monophosphate (AMP) (**Figure I.2**) et interrompent ainsi le signal AMPc.

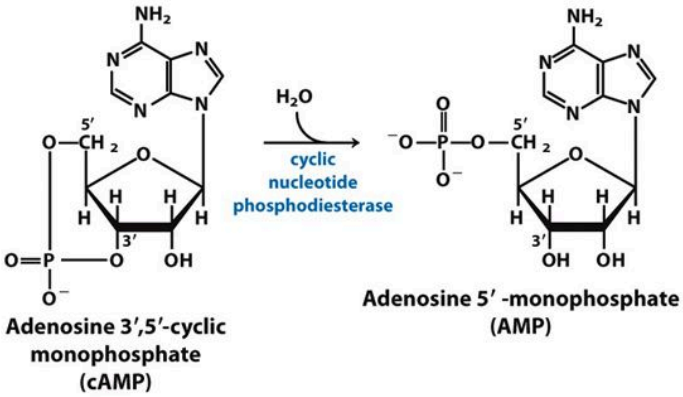


Figure I.2 : Hydrolyse de l'adénosine-3',5'-monophosphate cyclique en adénosine-5'-monophosphate.

La classe des PDE comprend **11 familles d'enzymes** ayant été caractérisées sur la base de leur séquence en acides aminés, leur spécificité par rapport au substrat, et leurs propriétés de régulations allostériques et pharmacologiques. **Ces 11 familles de PDE sont codées par 25 gènes, qui génèrent près de 100 enzymes distinctes du fait de promoteurs ou de sites d'épissage alternatifs**. Certaines familles de PDE présentent une spécificité de substrat, c'est notamment le cas des PDE4, -7 et -8 vis à vis de l'AMPc, des PDE5, -6 et -9, vis à vis du GMPc. Les PDE1, -2, -3, -10 et -11 sont capables d'hydrolyser les deux nucléotides cycliques (Francis, Blount and Corbin, 2011).

Les différentes familles de PDE présentent une organisation structurale commune, avec une région C-terminale conservée qui présente le site catalytique, et une région N-terminale, peu conservée, incluant les domaines impliqués dans la régulation et la localisation subcellulaire. Cette région N-terminale peut contenir des domaines régulant l'adressage des PDE à des compartiments cellulaires spécifiques ou impliqués dans l'interaction avec des protéines d'échafaudage spécifiques. Elle présente également souvent des motifs permettant des modifications post-traductionnelles des PDE : dimérisation, auto-inhibition, sites de liaison au ligand, phosphorylation, effecteurs allostériques, ou encore des sites d'interaction avec des partenaires régulant leur activité. Bien que les PDE montrent une large distribution tissulaire, certains types cellulaires présentent un enrichissement d'une famille de PDE (Maurice *et al.*, 2014). Le **Tableau I.1** présente les propriétés et la localisation tissulaire des PDE. Hautement étudiées pour leur implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, l'étude des PDE bénéficie d'un important répertoire de drogues permettant le ciblage spécifique d'isoformes précises. Quasiment toutes sont inhibées par le 3-isobutyl-1méthylxanthine (IBMX).

Famille	Gène	Nombre de variants	Spécificité de substrat	Propriété de régulation spécifique	Distribution tissulaire		Phénotype souris KO
PDE1	**A**	9		Activées par le Ca^{2+}/CaM	Étendue, significative dans les cellules musculaires vasculaires, les cardiomyocytes, les systèmes nerveux central et périphérique, les lymphocytes B et T, les cellules myéloïdes, les testicules et le sperme		PDE1A : *aucune donnée publiée*
	B	2					PDE1B : comportement exploratoire exacerbé, déficit d'apprentissage, hyperactivité
	C	5					PDE1C : régulation de l'olfaction
PDE2	**A**	4		Activée par le GMPc	Étendue, significative dans le cerveau, les cardiomyocytes, le foie, le cortex surrénalien, l'endothélium et les plaquettes		PDE2A : mort embryonnaire (E17)
PDE3	**A**	3		Inhibées par le GMPc	Étendue, significative dans les cellules musculaires vasculaires, les cardiomyocytes, le cerveau, le foie, le tissu adipeux, les cellules β-pancréatiques, l'endothélium, les ovocytes et les plaquettes		PDE3A : infertilité des femelles en raison d'un arrêt de la méiose ovocytaire, prolifération des cellules musculaires lisses
	B	1					PDE3B : le tissu adipeux blanc acquière les propriétés du tissu adipeux brun
PDE4	**A**	7	AMPc		Étendue, significatives dans les cellules des systèmes cardiovasculaires, neuronal, immunitaire et inflammatoire		PDE4A : aucun phénotype
	B	4					PDE4B : réduction de la réponse TNF induite par le lipopolysaccharide
	C	7					*PDE4C : aucune donnée publiée*
	D	9					PDE4D : retard de croissance, altération de l'ovulation, réduction de la viabilité post-natale, altération de la réponse muscarinique après stimulation cholinergique
PDE5	**A**	3	GMPc	Activée par le GMPc	Étendue, significative dans les cellules musculaires vasculaires, les cardiomyocytes en condition pathologique, les poumons, le cerveau, les plaquettes, les reins, les tissus gastro-intestinaux, le pénis		*Aucune donnée publiée*
PDE6	**A**	1	GMPc	Activées par le GMPc	Expression limitée aux photorécepteurs et à la glande pinéale		*Aucune donnée publiée*
	B	1					
	C	1					
PDE7	**A**	3	AMPc	Insensibles au Rolipram	Présente dans de nombreux tissus, incluant la rate, le cerveau, les poumons, les reins, les cellules myéloïdes et lymphoïdes		PDE7A : activation normale des cellules T mais réponse anticorps élevée suite à une stimulation antigénique cellule-T dépendante
	B	4					PDE7B : *aucune donnée publiée*
PDE8	**A**	5	AMPc	Insensibles au Rolipram et à l'IBMX	Étendue	PDE8A : Significative dans les testicules	PDE8A : augmentation de la libération de testostérone, sensibilité accrue à l'hormone lutéinisante, régulation du couplage excitation-contraction et de l'homéostasie calcique dans le cardiomyocyte
	B	6				PDE8B : Significative dans les cellules intestinales	PDE8B : mémorisation accrue et baisse de la performance motrice liée à l'âge
PDE9	**A**	20	GMPc	Insensible à l'IBMX	Étendue, significative dans la rate, le cerveau et les cellules intestinales		PDE9A : diminution de la résistance à l'insuline et de la prise de poids chez les souris en régime riche en graisse, augmentation de la concentration en GMPc dans le système nerveux central
PDE10	**A**	6		Inhibée par l'AMPc	Expression limitée au cerveau et aux testicules		PDE10A : Diminution du comportement exploratoire, hypoactivité, acquisition retardée du comportement d'évitement conditionné, diminution de la taille chez les femelles
PDE11	**A**	4		Activée par le GMPc	Expression limitée à la prostate, les testicules et les glandes salivaire et pituitaire		PDE11A : ventricules latéraux élargis

Tableau I.1 : Propriétés, distribution tissulaire et impact de l'extinction des phosphodiesterases.
Adapté depuis Maurice *et al.*, 2014.

c) ***Extrusion***

L'AMPc peut être extrudé par les **canaux « multidrug resistance proteins »** (MRP), protéines appartenant à la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*). Les formes courtes des canaux MRP – MRP4, -5 et -8 – sont impliquées dans l'extrusion de l'AMPc et du GMPc (Chen, Lee and Kruh, 2001 ; Guo *et al.*, 2003 ; Wielinga *et al.*, 2003 ; Sodani *et al.*, 2012). Les propriétés et la distribution tissulaire des canaux MRP sont présentées dans le **Tableau I.2**. Généralement, **les transporteurs MRP montrent une faible affinité pour les nucléotides cycliques** (Jedlitschky, Burchell and Keppler, 2000 ; Reid *et al.*, 2003), **aussi, il a été proposé que ces canaux extrudent l'AMPc et le GMPc quand ceux-ci sont produits en trop grande quantité. Ils assisteraient les PDE dans leur fonction à limiter les niveaux cytosoliques des nucléotides cycliques**. En outre, ces niveaux étant peu affectés par la surexpression des transporteurs MRP, il semblerait que la **régulation des niveaux de ces seconds messagers par les MRP s'effectue au niveau de microdomaines de signalisation, et non à l'échelle de la cellule entière** (Sodani *et al.*, 2012).

Isoforme	Spécificité de substrat	Distribution tissulaire	Références
MRP4		Tube proximal rénal, épithélium capillaires cérébrales, foie, poumons, muscle squelettique, pancréas, prostate, testicules, ovaires, vessie	Wielinga *et al.*, 2003 Li *et al.*, 2007
MRP5	GMPc AMPc	Ubiquitaire, significatif dans le cœur, le cerveau, les poumons, le muscle squelettique	Jedlitschky, Burchell and Keppler, 2000 Pratt *et al.*, 2005 Reid *et al.*, 2003
MRP8		Ubiquitaire, significatif dans le foie, le cerveau, le placenta, les testicules	Guo *et al.*, 2003

Tableau I.2 : Localisation et propriétés des canaux MRP.

3. *Méthodes de mesure de l'AMPc*

Pendant longtemps, l'étude fonctionnelle des AC fut réalisée au travers de mesures de l'AMPc. Celles-ci étaient principalement basées sur deux approches : la mesure de l'accumulation d'AMPc, et la mesure de l'activité des AC. Au début des années 2000, de nouveaux outils présentant une résolution spatio-temporelle ont été proposés et permettent de mesurer en temps réel, et sur cellules vivantes, les dynamiques de production d'AMPc.

a) ***Mesure de l'accumulation d'AMPc***

La mesure d'accumulation consiste à quantifier la quantité d'AMPc contenu dans des cellules ou dans un tissu dans lesquels l'activité des PDE, ainsi que celle des canaux MRP, est supprimée. Deux approches distinctes permettent de mesurer l'accumulation d'AMPc.

Quantification relative d'AMPc à partir d'adénine radiomarquée

L'échantillon biologique est incubé en présence d'adénine radiomarquée. Ce dernier est perméable à la membrane et peut s'introduire à l'intérieur de la cellule afin d'être incorporée dans l'ATP produit par la cellule, qui à son tour produit de l'AMPc marqué (AMPc*). L'ATP radiomarquée (ATP*) est séparée de l'AMPc* par chromatographie séquentielle sur colonnes de résine échangeuse de cations Dowex et d'oxyde d'aluminium (Alumine). L'accumulation d'AMPc, reflet de l'activité des AC, est exprimée en pourcentage de l'ATP radiomarquée converti en AMPc radiomarquée /unité de temps/quantité d'échantillon analysée (Salomon, Londos and Rodbell, 1974). Cette technique présente cependant plusieurs inconvénients : *i)* la quantité initiale d'ATP radiomarqué disponible pour la synthèse d'AMPc n'est pas connue de l'expérimentateur ; *ii)* la quantité d'AMPc synthétisée au cours de l'expérience est sous-estimée par la présence d'ATP non radiomarqué qui aura pu être utilisé comme substrat par les AC.

Quantification absolue de l'AMPc : ELISA par compétition

Cette approche est basée sur la compétition entre l'AMPc non marqué, synthétisé par les AC de l'échantillon biologique, et l'AMPc marqué introduit dans l'échantillon par l'expérimentateur, vis à vis de d'une protéine liant spécifiquement l'AMPc telle que la sous unité régulatrice de la PKA ou un anticorps anti-AMPc en quantité fixe et limitée (**Figure I.3A**) La quantité d'AMPc marqué lié est inversement proportionnelle à la quantité d'AMPc produit de façon endogène. L'établissement d'une courbe étalon permet de mesurer la concentration d'AMPc de l'échantillon. A l'origine, ce dosage était généralement effectué avec de l'AMPc radiomarqué à l'iode 125. Actuellement, cet ELISA par compétition utilise des anticorps anti-AMPc couplés à un fluorochrome donneur et de l'AMPc couplé à un fluorochrome accepteur. En absence d'AMPc endogène, l'anticorps se lie à l'AMPc couplé à au fluorochrome accepteur favorisant le transfert d'énergie entre les deux molécules fluorescentes (proximité spatiale). Suite à une stimulation, la production d'AMPc endogène par la cellule entraîne une diminution du transfert d'énergie par déplacement de l'AMPc-couplé au fluorochrome par l'AMPc endogène (compétition pour le paratope ; **Figure I.3B**).

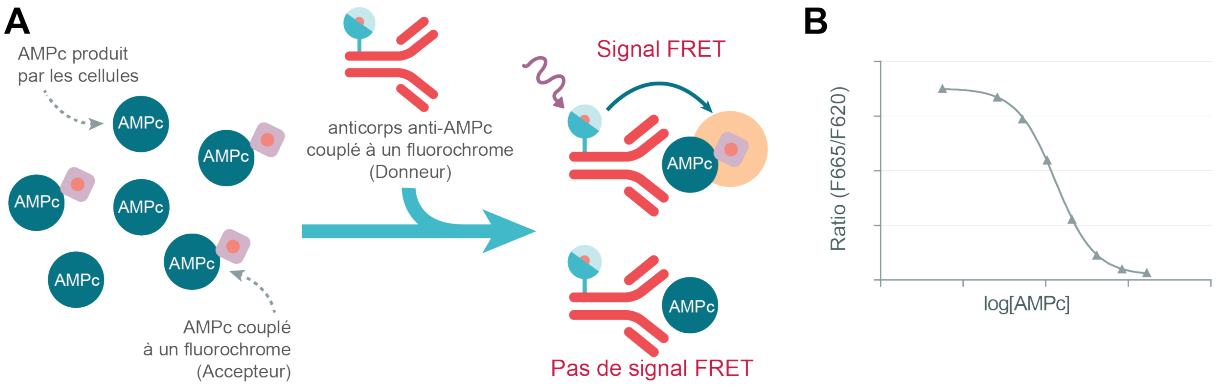


Figure I.3 : Quantification absolution de la synthèse d'AMPc.

A. Principe du dosage compétitif d'AMPc **B.** courbe d'étalonnage relatant l'évolution du ratio de fluorescence d'émission du fluorochrome accepteur sur le fluorochrome donneur en fonction de la concentration en AMPc.

La mesure d'accumulation d'AMPc par compétition permet de mesurer la concentration d'AMPc contenue dans des échantillons biologiques hautement concentrés, sans réelle limite supérieure de concentration en AMPc. Cependant, elle n'offre pas de résolution spatio-temporelle des dynamiques de production d'AMPc.

b) *Dosage de l'activité cyclase*

Le dosage de l'activité cyclase consiste à mesurer la quantité d'AMPc produit pour une **quantité fixe de membranes isolées**, à partir d'une quantité connue d'ATP, au cours d'un intervalle de temps défini par l'expérimentateur. Bien que permettant une mesure précise et de l'activité cyclase au travers d'une expérience aux conditions strictement contrôlées, cette approche supprime totalement l'impact exercé par l'environnement de l'AC sur son activité. L'AMPc produit par cette méthode est mesuré à partir de l'ATP substrat radiomarqué selon une méthodologie similaire dont le principe a été décrit dans le paragraphe ***quantification relative d'AMPc à partir d'adénine radiomarquée***.

c) *Mesure dynamique de la production d'AMPc*

L'étude de la dynamique de production et de dégradation de l'AMPc est effectuée à l'aide de biosenseurs utilisant la propriété physique du transfert d'énergie par résonance de Förster. Ce principe utilise soit un donneur bioluminescent (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer,* ***BRET***), soit donneur fluorescent (*Fluorescence Resonance Energy Transfer,* ***FRET***). Ces biosenseurs comportent un domaine senseur à l'AMPc, provenant d'une protéine cible de l'AMPc (sous-unité R de la PKA ou Epac ; **voir** ***Partie 1.I.B. Effecteurs de l'AMPc***). L'interaction de l'AMPc avec le domaine senseur induit un changement conformationnel modifiant la distance et/ou l'orientation relative entre le donneur et l'accepteur, modifiant l'efficacité du transfert d'énergie par résonance. L'efficacité du FRET ou du BRET est donc fonction de la concentration intracellulaire en AMPc.

Biosenseurs BRET

Les biosenseurs BRET ont été introduits par Prinz et ses collaborateurs. Ils étaient constitués des sous-unités R_I ou R_{II} de la PKA, fusionnées à la luciférase de *Renilla luciformis* (Rluc), et d'une protéine de fusion composée de la sous-unité C de la PKA fusionnée à la GFP. La co-transfection des protéines de fusion R-Rluc et C-GFP dans les cellules COS7 permettait de suivre en temps réel et sur cellules vivantes l'activation des PKA-I et PKA-II. La dissociation des sous-unités R et C de la PKA suite à son activation par l'AMPc résultait en une diminution du signal BRET observé. Ce biosenseur BRET permettrait de mettre en évidence les isoformes de PKA impliquées dans la réponse AMPc : suite à une stimulation à l'isoprotérénol[1], un agoniste des récepteurs β-adrénergique, seul le biosenseur R_{II}-Rluc montre une diminution du signal BRET (Prinz *et al.*, 2006).

Un biosenseur BRET constitué de la protéine Epac1 humaine a été également proposé par Jiang et ses collaborateurs. Celui-ci est une protéine de fusion YFP-Epac1-Rluc avec laquelle l'augmentation de la concentration cytosolique d'AMPc diminue le signal BRET observé (Jiang *et al.*, 2007).

Biosenseurs FRET

La première approche pour étudier les dynamiques de production d'AMPc en temps réel par mesure de FRET était basée sur la PKA. Au début des années 1990, Adams et ses collaborateurs proposent un biosenseur composé des sous-unités R et C de la PKA, chacune marquée chimiquement par un fluorochrome : fluorescéine comme donneur sur la sous-unité C, et rhodamine comme accepteur sur la sous-unité R. Ce biosenseur FlCRhR avait un niveau de FRET élevé lorsque les sous-unités R et C étaient en interaction, et le FRET était supprimé par la présence d'AMPc (Adams *et al.*, 1991). Ce biosenseur a ouvert la possibilité d'étudier les composantes spatiotemporelles des dynamiques de production d'AMPc sur des tissus intacts ; et a notamment été utilisé pour effectuer des expériences d'analyse de la dynamique de production AMPc dans des neurones géants intacts de la langouste (Hempel *et al.*, 1996). Cependant, l'introduction de la protéine modifiée dans des cellules vivantes a limité les applications de cette approche. Au début des années 2000, un biosenseur PKA encodé génétiquement a été créé, composé d'une BFP (*Blue Fluorescent Protein*) et d'une GFP fusionnées aux sous-unités R_{II} et C de la PKA, respectivement (Zaccolo *et al.*, 2000). Ce biosenseur fut ensuite amélioré en remplaçant la BFP et la GFP par un couple de fluorochrome plus adapté aux expériences de FRET : la CFP (*cyan fluorescent protein*) et la YFP (*yellow fluorescent protein*) (Zaccolo and Pozzan, 2002). Bien qu'ils aient permis pour la première fois d'étudier la signalisation AMPc avec une précision spatiotemporelle, ce biosenseur présente un inconvénient majeur : son fonctionnement repose sur la dimérisation des sous-unités R_{II} et C de la PKA-II exprimées en quantités exactement équivalentes. De plus, l'interaction de chaque sous-unité couplée à un fluorochrome avec sa sous-unité complémentaire endogène non fluorescente altère le signal

[1] Isoprotérénol : activateur sélectif des récepteurs β-adrénergiques.

FRET mesuré. Pour limiter cet inconvénient, il est nécessaire d'exprimer le biosenseur à une concentration supérieure à la PKA endogène, ce qui induit nécessairement des perturbations dans cette voie de signalisation. Par ailleurs, la liaison progressive par effet allostérique des 4 molécules d'AMPc nécessaires pour dissocier les sous-unités R et C de la PKA pourrait contribuer à la cinétique de réponse lente observée avec ce biosenseur AMPc.

Pour pallier à ces limitations, trois biosenseurs unimoléculaires construits avec la protéine Epac ont été développés en 2004. Ces biosenseurs utilisent l'intégralité, ou une partie, de la protéine Epac1 comme senseur à l'AMPc, et la paire CFP-YFP fusionnée de part et d'autre du domaine senseur (DiPilato, Cheng and Zhang, 2004 ; Nikolaev *et al.*, 2004 ; Ponsioen *et al.*, 2004). La liaison de l'AMPc sur la protéine Epac1 induit un changement conformationnel du biosenseur séparant les deux fluorochromes (**Figure I.4A**) qui induit une diminution du signal FRET observé : cet effet est mesurable par imagerie ratiométrique en temps réel dans des cellules vivantes (**Figure I.4B**). En raison de sa distribution uniforme dans le cytosol des cellules transfectées, le biosenseur Epac1 permet de détecter les signaux AMPc diffusant rapidement dans les neurones et macrophages suite à la stimulation des récepteurs β-adrénergiques par l'isoprotérénol (Nikolaev *et al.*, 2004). Les biosenseurs de ce type ont été par la suite améliorés avec des modifications de la portion de Epac1 utilisée comme domaine senseur, et le remplacement des fluorophores par des domaines fluorescents plus performants (DiPilato, Cheng and Zhang, 2004 ; Violin *et al.*, 2008). Ces biosenseurs ont permis d'analyser l'efficacité de ligand sur des récepteurs (Mathiesen, Vedel and Bräuner-Osborne, 2013), de mesurer la cinétique de réponses (Nikolaev *et al.*, 2004), de visualiser avec précision la compartimentalisation du signal AMPc (Surdo *et al.*, 2017), ou encore d'analyser l'implication des PDE dans la régulation des réponses AMPc (Betolngar *et al.*, 2019). Les biosenseurs de ce type peuvent indiquer une concentration en AMPc sur une large gamme – de ~100nM à ~100µM. En-dessous de cette gamme, le biosenseur ne détecte pas d'AMPc. Au-dessus de cette gamme, le biosenseur est saturé par l'AMP.

Pour ces biosenseurs AMPc (comme pour tout équilibre chimique)**, une limitation à prendre en compte est l'effet tampon du biosenseur sur la dynamique du ligand, et ses conséquences sur la visualisation de l'évolution de la concentration cytosolique d'AMPc**. Si le biosenseur est exprimé dans la cellule à des concentrations importantes, il en résulte un ralentissement du changement de ratio relatif à l'augmentation de la concentration cytosolique en AMPc. En effet, **une quantité d'AMPc plus importante est nécessaire pour arriver à saturer le biosenseur**. Dans toute analyse comparative, il est donc nécessaire de prendre en compte l'intensité de fluorescence mesurée, reflet de la quantité de biosenseur exprimé, tant celle-ci peut influer l'amplitude des changements de ratio mesurés.

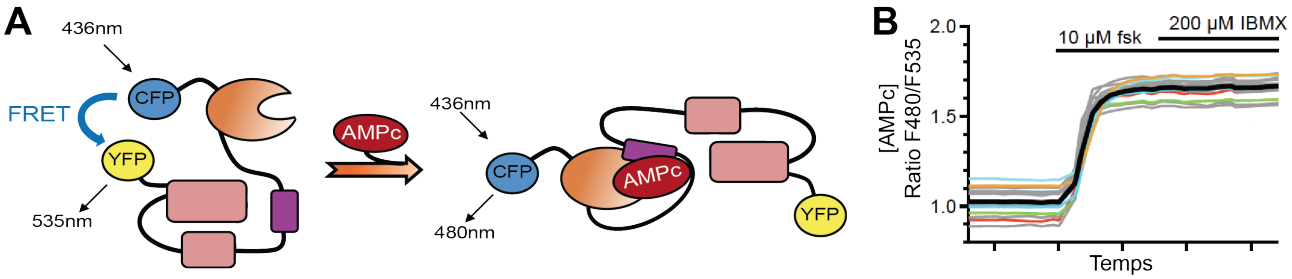


Figure I.4 : Principe de fonctionnement du biosenseur YFP-Epac1-CFP

A. Schéma du biosenseur YFP-Epac1-CFP et effet de la liaison de l'AMPc. **B.** Courbe du ratio F480/F535, reflet de la concentration cytosolique en AMPc, et effet de la stimulation des AC par la forskoline.

B. Effecteurs de l'AMPc

L'AMPc joue le rôle de messager secondaire en devenant à son tour un activateur allostérique de plusieurs effecteurs intracellulaires, dont le plus connu est la **PKA**. L'AMPc est capable de lier d'autres effecteurs tel que les facteurs d'échange **Epac** (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*) et les **canaux CNG** (*Cyclic Nucleotide Gated channel*). **Au travers de ces trois effecteurs, l'AMPc est capable d'induire une multitude de réponses cellulaires distinctes.**

1. La protéine kinase A

La PKA est le premier effecteur intracellulaire de l'AMPc à avoir été identifié. Elle a été clonée en 1968 depuis une banque d'ADNC de muscle squelettique de lapin (Walsh, Perkins and Krebs, 1968). C'est une **holoenzyme** – *enzyme nécessitant l'action d'un cofacteur pour être sous forme active* – **activée par l'AMPc, catalysant la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine sur ses protéines cibles** (Skalhegg and Tasken, 2000).

La PKA est un tétramère composé de deux sous-unités catalytiques (C), maintenues dans une conformation inactive par un dimère de sous-unités régulatrices (R). La liaison de deux molécules d'AMPc sur chaque sous-unité R induit un changement conformationnel résultant en une dissociation des sous-unités C monomériques. Celles-ci, désormais actives, vont phosphoryler leurs substrats dans le cytoplasme, à la membrane plasmique et/ou dans le noyau de la cellule.

Deux classes de PKA ont été identifiées, PKA de type I et PKA de type II, et diffèrent par leurs sous-unités R, appelées R-I et R-II, respectivement. Les PKA de types I et II diffèrent notamment par leur sensibilité à l'AMPc. Les sous-unités régulatrices de la PKA sont bien plus exprimées que les unités catalytiques. La sous-unité R-II est majoritaire par rapport à la sous-unité R-I, et ce dans l'intégralité des tissus testés (Walker-Gray, Stengel and Gold, 2017 ; Taskén and Aandahl, 2004). La PKA-I présente une affinité pour l'AMPc quatre fois supérieure à la PKA-II. Elle est également considérée comme soluble et cytosolique, tandis que la PKA-II est considérée comme cantonnée à des structures intracellulaires *via* son interaction physique avec les protéines d'ancrages de la protéine kinase A (AKAP). Cependant, des « Dual » (D)-AKAP ont été identifiées, et présentent la capacité d'interagir avec les PKA de types I et II ; et que certaines AKAP se lient sélectivement aux PKA-I (Skalhegg and Tasken, 2000 ; Taskén and Aandahl, 2004).

L'étude des réponses cellulaires spécifiques de la PKA peut notamment être facilitée par l'utilisation de 6-BNZ-cAMP, un analogue de l'AMPc et activateur spécifique de la PKA.

Pour revue : Torres-Quesada, Röck and Stefan, 2017 ; Baro Graf *et al.*, 2020.

2. *Les canaux CNG*

Les canaux CNG (*cyclic nucleotide-gated channels*) sont des canaux ioniques activés par la liaison des nucléotides cycliques AMPc et GMPc. Caractérisés à partir des années 1980, **ces canaux sont perméables aux cations monovalents Na^+ et K^+, et au cation divalent Ca^{2+}** (Kaupp and Seifert, 2002).

Le canal CNG est un tétramère, ses quatre sous-unités sont organisées autour du pore central assurant le transport ionique à travers la membrane plasmique. Les sous-unités composant les canaux CNG sont regroupées en deux catégories distinctes : CNGA et CNGB. Quatre membres composent la catégorie A et deux membres composent la catégorie B. **Ces sous-unités s'assemblent pour former des hétérotétramères fonctionnels. Les propriétés du canal CNG en termes de perméabilité et de régulation, et d'affinité aux nucléotides cycliques, sont fonction des sous-unités qui composent le tétramère** (Biel and Michalakis, 2009).

L'activation du canal CNG se produit en réponse à l'interaction du nucléotide cyclique au niveau du domaine CNBD de chaque sous-unité. **Les canaux CNG, à l'inverse des récepteurs canaux ouverts par la liaison d'un neurotransmetteur, ne se désensibilisent pas.** Leur activité est modulée par la concentration cytosolique en nucléotides cycliques et par le Ca^{2+}, qui inhibe le passage des cations monovalents (Kaupp and Seifert, 2002 ; Biel and Michalakis, 2009).

Pour revue : Podda and Grassi, 2014 ; Biel and Michalakis, 2009.

3. *Les facteurs d'échange Epac*

Les facteurs d'échange Epac (*exchange factor directly activated by cAMP*) ont été décrits pour la première fois dans deux études indépendantes publiées en décembre 1998 (de Rooij *et al.*, 1998 ; Kawasaki *et al.*, 1998). **Les Epac exercent leur rôle dans la transduction du signal AMPc *via* leur capacité à activer les petites protéines G de la famille Ras : Rap1 et -2. Il existe 2 isoformes : Epac1 et Epac2**. D'un point de vue structural, les facteurs d'échange Epac sont composés d'une région régulatrice localisée en position N-terminale de la protéine, et d'une région catalytique localisée en position C-terminale de la protéine. La liaison de l'AMPc à la sous-unité régulatrice induit un changement conformationnel démasquant le site catalytique. L'interaction du facteur Epac lié à l'AMPc aux protéines Ras favorisent l'échange GDP-GTP. **Les petites protéines G liées au GTP vont alors interagir avec leurs effecteurs intracellulaires et les activer. La région catalytique, isolée des Epac, est constitutivement active ce qui met en évidence le rôle auto-inhibiteur de la région régulatrice.** Cette auto-inhibition est assurée par le **repli conformationnel de la protéine, empêchant l'accès des petites protéines G au site catalytique** (Bos, 2006).

Epac et PKA agissent indépendamment, mais sont souvent associées dans des processus biologiques communs, dans lesquelles elles peuvent exercer des rôles synergiques ou opposés. Leur régulation spatiale et temporelle, notamment assurée par leur liaison à différentes protéines d'échafaudage, est un élément clé de la spécificité des signaux AMPc

transmis (Breckler *et al.*, 2011). **L'étude des réponses cellulaires spécifiques de Epac peut notamment être facilitée par l'utilisation de 8-pCOT-2'-O-Me-cAMP, un analogue de l'AMPc et activateur spécifique de la Epac.**

Pour revue : Wehbe *et al.*, 2020 ; Bouvet, Blondeau and Lezoualc'h, 2019 ; Sugawara *et al.*, 2016 ; Banerjee and Cheng, 2015.

C. Compartimentalisation du signal

A la fin des années 1970 est décrite, dans le cœur de rat perfusé, **une activation hormone-spécifique de la glycogène phosphorylase en réponse à l'adrénaline ou l'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs β-adrénergique. En effet, la Prostaglandine E1, qui augmentait la concentration d'AMPc cytosolique de façon similaire à l'adrénaline, s'est révélée être incapable d'activer la glycogène phosphorylase**. Les auteurs concluaient que l'élévation de la concentration cytosolique en AMPc était nécessaire mais pas suffisante pour activer la glycogène phosphorylase, et ont émis l'hypothèse d'une **signalisation compartimentée** (Keely, 1977 ; Hayes *et al.*, 1979 ; Brunton, Hayes and Mayer, 1979).

Le contrôle spatiotemporel de la signalisation AMPc est assuré par l'existence de complexes multiprotéiques assurant la co-localisation de la source du signal et de la cible de l'AMPc. Il s'agit de microdomaines de signalisation, ou signalosomes dans lesquels l'élévation de la concentration cytosolique en AMPc est localisée (Scott, Dessauer and Taskén, 2013). La composition propre de chaque signalosome, incluant un récepteur couplé aux protéines G, une ou plusieurs isoformes d'AC et de PDE, éventuellement des transporteurs MRP, et un ou plusieurs effecteurs, conditionne l'amplitude, la cinétique et la réponse cellulaire du signal AMPc généré.

Initialement décrites comme ciblant la PKA, les AKAP (*A kinase anchoring protein*) présentent la capacité d'interagir avec de multiples acteurs de la voie de signalisation AMPc et ont été identifiées dans de nombreux compartiments subcellulaires.

La première protéine d'échafaudage à avoir été identifiée est la MAP2 (*microtubule associated protein 2*). Celle-ci assure l'ancrage de la PKA-II aux microtubules *via* la sous-unité RII de la PKA (Theurkauf and Vallee, 1982 ; Lohmann *et al.*, 1984). Depuis cette découverte, **plus de 50 AKAP ont été identifiées**. Bien qu'elles présentent chacune des propriétés d'interaction et d'adressage qui leur sont propres, elles présentent également des propriétés communes : *i)* toutes possèdent un domaine d'ancrage à la sous-unité R de la PKA ; *ii)* la compartimentalisation de chaque couple PKA-AKAP opère au travers d'un adressage subcellulaire dépendant du domaine d'adressage présent sur chaque AKAP ; *iii)* elles ont la capacité de se complexer avec plusieurs partenaires de signalisation (RCPG, protéines kinases, phosphatases, phosphodiesterases, AC, canaux ioniques). Par ailleurs, en plus de leur rôle dans la compartimentalisation du signal AMPc, ces protéines d'échafaudage pourrait également contrôler l'activité des effecteurs avec lesquelles elles interagissent (Scott, Dessauer and Taskén, 2013 ; Hoshi *et al.*, 2010).

De par leur capacité à mettre en lien, localiser et moduler l'activité des acteurs de la voie AMPc au sein d'un même microdomaine de signalisation, les protéines d'échafaudage sont la pierre angulaire de ces complexes macromoléculaires, et représentent la stratégie indispensable mise en place par le vivant pour générer une multitude de réponses cellulaires distinctes à partir d'un même messager secondaire.

II. Les Adenylyl Cyclases

A. Généralités

Les AC sont une famille d'enzymes comprenant 10 membres. La première AC a été clonée en 1989 par Krupinski et ses collaborateurs à partir d'une banque d'ADNc de cerveaux bovins. **Huit autres isoformes d'AC transmembranaires ont été identifiées et clonées** dans les six années qui suivirent (Feinstein *et al.*, 1991 ; Bakalyar and Reed, 1990 ; Gao and Gilman, 1991 ; Ishikawa *et al.*, 1992 ; Yoshimura and Cooper, 1992 ; Watson *et al.*, 1994 ; Cali *et al.*, 1994 ; Premont *et al.*, 1996). L'AC10, appelée également AC soluble (sAC), est localisée dans le cytosol et a été clonée plus récemment. Contrairement aux AC membranaires, elle est insensible aux protéines G hétérotrimériques et à la forskoline[2] (Buck *et al.*, 1999).

B. Structure des Adenylyl Cyclases membranaires

1. Structure primaire des AC

Les AC 1 à 9 diffèrent entre elles pour leur séquence primaire et leur taille : entre 1080 et 1353 acides aminés (**Tableau I.3**). Elles sont des chaînes peptidiques uniques constituées d'un domaine N-terminal cytosolique de longueur variable, de deux cassettes transmembranaires (M1, M2) chacun comprenant six hélices α et de deux domaines cytosoliques C1 et C2 subdivisés en un domaine catalytique (les sous-domaines C1a et C2a) et un domaine régulateur (les sous-domaines C1b et C2b) (**Tableau I.3**, **Figure I.5**). Toutes les AC membranaires sont activées par Gαs ; les AC 1 à 8 sont également activées par la forskoline (**Tableau I.5**). A l'interface des domaines C1a et C2a, on trouve le site de liaison à l'ATP et celui à la forskoline. **Les sous domaines C1a et C2a**, d'environ 190 acides aminés chacun, **sont structurellement homologues d'une AC transmembranaire à l'autre et avec ceux du domaine catalytique de l'AC10 soluble** (sAC), **sAC-C1 et sAC-C2**, **et de la guanylyl cyclase soluble** (sGC)**, sGCacat et sGCβcat** (Cooper, 2003 ; Gueguen *et al.*, 2016 ; Dessauer *et al.*, 2017). **Les domaines N-terminal, C1b et C2b, en revanche, présentent une faible homologie de séquence et déterminent les propriétés de régulations uniques de chaque AC** (**Tableau I.5**). Au sein d'une même espèce, les AC présentent une homologie globale d'environ 70% (**Tableau I.3**). D'une espèce à l'autre, les AC ont une homologie globale de plus de 96% (**Tableau I.4**).

[2] La forskoline est un activateur non spécifique des adenylyl cyclases transmembranaires. Elle est le principe actif extrait de la plante *Coleus forskohlii*.

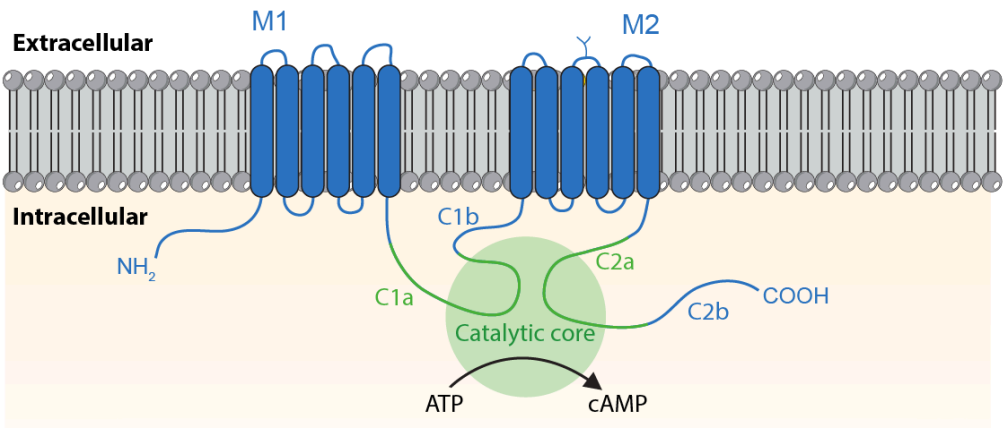


Figure I.5 : Structure générale des Adenylyl Cyclases transmembranaires.

Isoforme	Longueur totale (aa)	Longueur des domaines (aa)					Similarité (%)								
		N-ter	M1	C1	M2	C2	AC1	AC2	AC3	AC4	AC5	AC6	AC7	AC8	AC9
AC1	1119	63	171	376	184	325		72,39	70,65	71,44	76,49	73,89	72,22	72,38	78,26
AC2	1091	45	162	394	220	270			73,45	81,26	73,33	75,65	73,65	73,22	73,84
AC3	1144	79	233	231	221	291				73,92	71,75	72,01	72,38	70,89	70,12
AC4	1077	28	162	395	222	270					75,10	74,16	80,06	71,68	71,33
AC5	1261	195	199	375	235	257						82,93	72,97	75,24	70,29
AC6	1168	151	155	368	240	255							74,62	74,45	68,31
AC7	1080	33	163	398	220	266								73,04	70,21
AC8	1251	182	159	374	199	337									71,02
AC9	1353	117	184	485	210	357									
TOUTES	1171						73,57								

Tableau I.3 : Taille et similarité des Adenylyl Cyclases humaines.
Source des séquences : Uniprot ; Alignements effectués sur *Serial Cloner*.

Isoforme	Similarité (%)		
	Homme *vs* Souris	Homme *vs* Rat	Souris *vs* Rat
AC1	96,96	96,68	99,07
AC2	97,42	97,42 %	99,27
AC3	96,76	96,76	99,39
AC4	97,29	96,80	98,59
AC5	96,03	97,85	99,05
AC6	95,97	95,45	98,54
AC7	89,88	93,14	97,09
AC8	98,64	98,64	99,36
AC9	96,23	95,86	98,45
TOUTES	96,13	96,51	98,45

Tableau I.4 : Similarité des Adenylyl Cyclases entre plusieurs espèces.
Source des séquences : Uniprot ; Alignements effectués sur *Serial Cloner*.

2. Structure tridimensionnelle des ACs

Actuellement, il n'existe aucune structure tridimensionnelle complète d'AC. Cependant, la structure 3D du site catalytique des AC a été résolue, à la fin des années 1990, par cristallographie aux *rayons X* d'une protéine recombinante constituée du domaine C1a de l'AC5 de chien et C2a de l'AC2 de rat (Zhang *et al.*, 1997 ; Tesmer *et al.*, 1997). A ce jour, 17 structures cristal du site catalytique des AC ont été proposées. Toutes ont été réalisées avec les domaines 5C1 (chien) et 2C2 (rat), co-cristallisés avec différents ligands : forskoline, Gαs, ATP, inhibiteurs de purine, et de multiples cations métalliques. La structure de 5C1 et 2C2, montrée en **Figure I.6A**, révèle une architecture similaire composée de 5 hélices α entourant un cœur de 8 feuillets β. **Le site catalytique des AC est constitué par la dimérisation, en tête bèche, des fragments C1a et C2a de l'enzyme**. L'interface du dimère C1a-C2a contient une cavité spacieuse présentant deux sites de liaison pseudo-symétriques pour la forskoline et l'ATP+2Mg^{2+} (**Figure I.6B**). La face visualisée en **Figure I.6B** est la face ventrale de l'enzyme, par laquelle se fait probablement l'approche des ligands et substrats en raison de contacts importants entre C1 et C2 au niveau de la face dorsale. L'interaction Gαs s'effectue exclusivement avec le domaine C2 au niveau de sa boucle α1'-α2', des domaines α2' et α3' et de la boucle α3'-β4' et projette au-delà de la face ventrale (**Figure I.6B**) (Dessauer *et al.*, 2017).

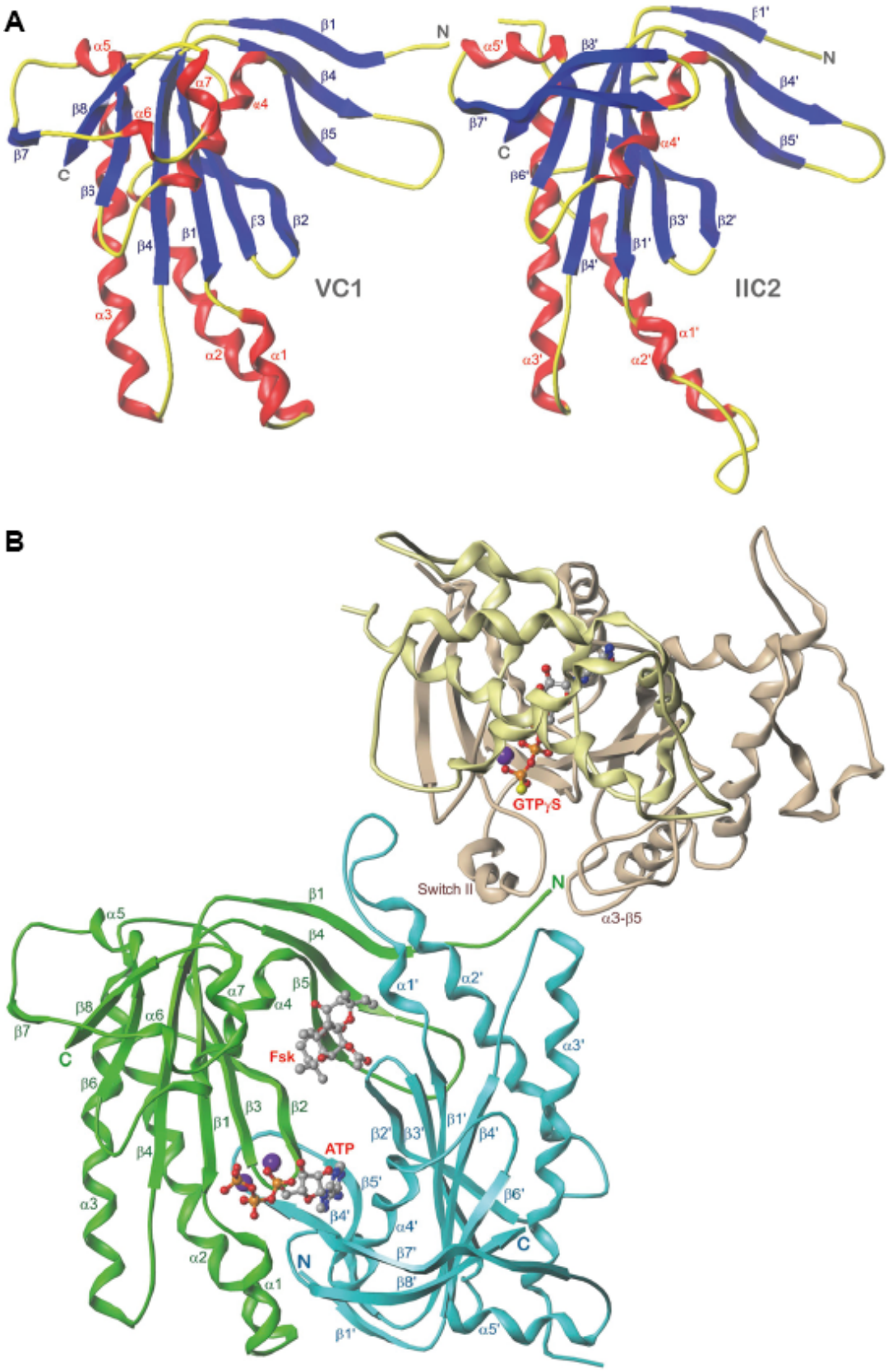


Figure I.6 : Structure des domaines 5C1 et 2C2 et du site catalytique activé par Gαs.

A. 5C1 et 5C2 en comparaison côte à côte. Rouge : hélices-α ; bleu : feuillets β ; jaunes : boucles et segments. Les extrémités N- et C-terminal sont indiquées pour chaque domaine. **B.** le dimère 5C1-5C2 est complexé avec la forskoline, l'ATP et Gαs complexé avec du GTP. Vert : 5C1 ; bleu : 2C2 ; Jaune/brun : Gαs. Couleur des atomes - gris : C ; bleu : N ; rouge : O ; violet : Mg^{2+}.

Depuis Dessauer *et al.*, 2017.

En 2018, Vercellino et ses collaborateurs décrivent, par cristallographie aux rayons X, **l'existence d'un domaine hélicoïdal (DH), localisé dans les régions C1a et C2a, hautement conservées entre les différentes isoformes d'AC. Ils** montrent **également** le rôle fonctionnel de ce DH par mutagénèse dirigée. Ils avancent que ce domaine, **à la frontière entre les régions transmembranaire et catalytique, jouerait un rôle fondamental dans la dimérisation des sous domaines C1a et C2a, et donc dans la conformation et l'activité du site catalytique des AC** (Vercellino *et al.*, 2017). En effet, neuf des vingt-trois résidus impliqués dans le processus catalytique des AC sont localisés à l'interface avec le DH (**Figure I.7**).

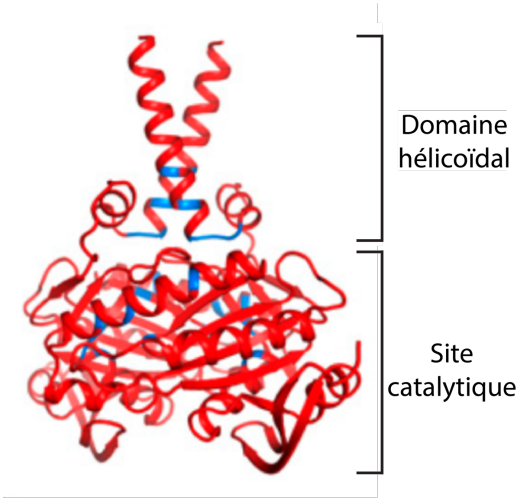


Figure I.7 : Représentation 3D du domaine hélicoïdal formé par l'homodimérisation de l'AC Cya de *Mycobacterium intracellulare*.
Les segments en bleu représentent les résidus directement impliqués dans le processus catalytique de l'AC. Modifié depuis Vercellino *et al.*, 2017.

En 2019, une version quasiment complète de la structure 3D d'une AC couplée à Gαs, l'AC9, est élucidée par une approche de cryo-microscopie électronique (Qi *et al.*, 2019). **La structure 3D de l'AC9 comprend** les douze domaines transmembranaires, le DH qui connecte les domaines transmembranaires au domaine catalytique, et le site catalytique couplé à la sous-unité Gαs des protéines GS hétérotrimériques (**Figure I.8B**). **Ces résultats mettent en évidence que les domaines transmembranaires d'une même cassette sont regroupés et que les deux cassettes sont accolées l'une à l'autre et positionnées en symétrie centrale ;** en d'autres termes, les TM1 à TM6 de la cassette M1, et les TM7 à TM12 de la cassette M2 peuvent être superposés après rotation à 180° de l'une des deux cassettes transmembranaires (**Figure I.8A**). **Ce modèle confirme l'existence d'un domaine hélicoïdal DH composé de deux fragments, de 40 acides aminés de long, qui connectent le sixième et le douzième domaine transmembranaire aux parties N-terminales des régions C1a et C2a, respectivement** (**Figure I.8B**). Au regard de cette structure tridimensionnelle, les auteurs suggèrent que le DH joue un rôle régulateur de la conformation du site catalytique, et par conséquent de l'activité cyclase. On notera que la structure du site catalytique identifiée par Qi et ses collaborateurs est similaire à celle obtenue par cristallographie aux rayons X à la fin des années 1990 (Qi *et al.*, 2019), ce qui conforte les résultats obtenus par cette technique.

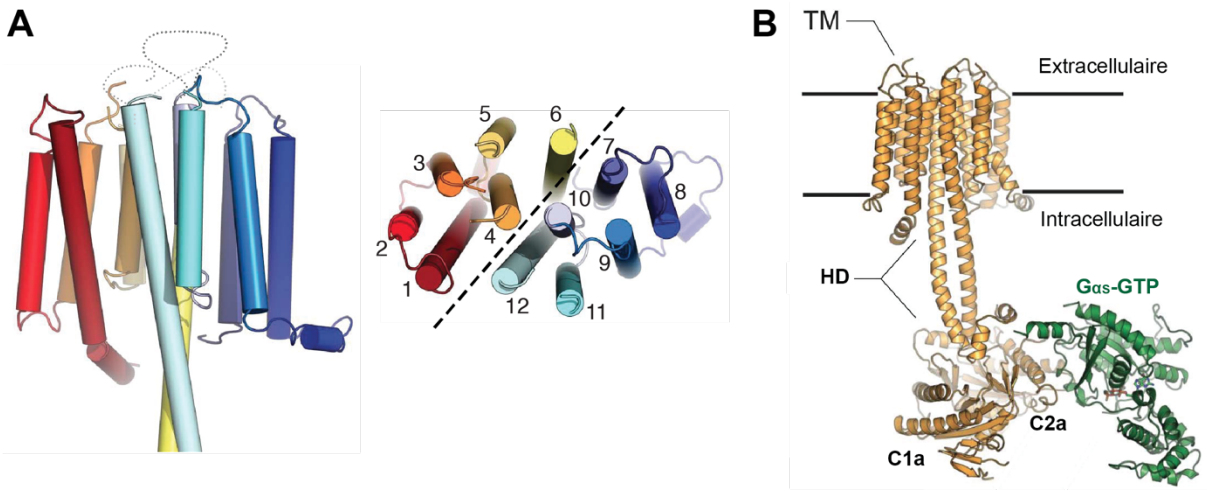


Figure I.8 : Structure publiée de l'AC9

A. Structure de la région transmembranaire de l'AC9 en vue transversale (gauche) ou du dessus (droite).
B. Structure générale de l'AC9. Modifié depuis Qi *et al.*, 2019.

Pour autant, les résultats de Qi et ses collaborateurs ne permettent pas encore de positionner les domaines N-terminal et C1b de l'enzyme.

C. Dimérisation des Adenylyl Cyclases

Au début des années 2000, plusieurs études menées en système d'expression hétérologue mettent en évidence l'existence de deux types de dimérisation des AC : *i)* la dimérisation intramoléculaire, -entre les deux cassettes transmembranaires d'une même AC- et *ii)* la dimérisation intermoléculaire, se produisant entre deux AC distinctes (**Figure I.9**). **Ces deux types de dimérisation prennent place au niveau des cassettes transmembranaires des AC**. Les motifs impliqués dans l'interaction intra- et inter-moléculaire restent encore à déterminer (Cooper and Crossthwaite, 2006).

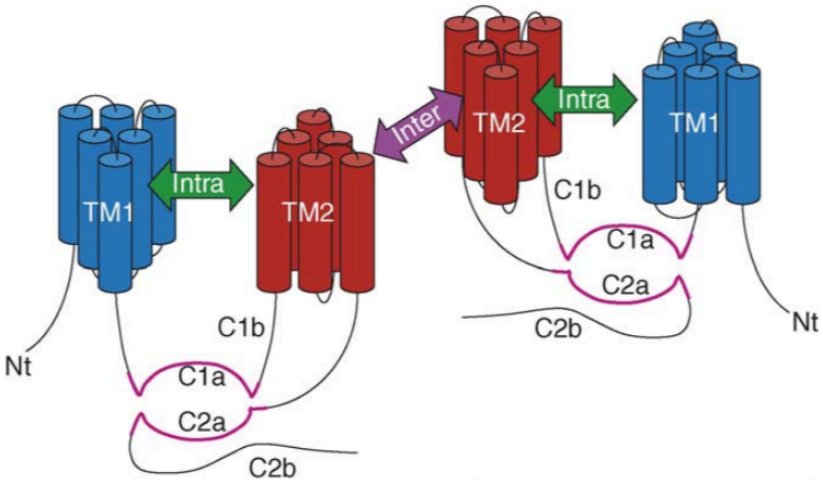


Figure I.9 : La dimérisation intra- et intermoléculaire des AC.
D'après Cooper and Crossthwaite, 2006.

Les dimérisations intramoléculaires

L'existence d'une interaction physique directe entre les deux cassettes transmembranaires des AC a été mise en évidence par Gu et ses collaborateurs. Dans leurs travaux, les auteurs montrent l'interaction physique entre les deux domaines transmembranaires de l'AC8 par une approche de FRET, et démontrent que cette interaction est nécessaire à l'export des AC vers la membrane plasmique. En effet, exprimées seules ($AC8_{M1}$ ou $AC8_{M2}$), ou avec les fragments C1 et C2 de l'AC8 ($AC8_{M1\text{-}C1}$ et $AC8_{M2\text{-}C2}$) les cassettes transmembranaires sont indétectables à la membrane plasmique, et présentent un signal intracellulaire. La co-expression des deux cassettes transmembranaires M1 et M2 de l'AC8 conditionne leur détection à la membrane plasmique. En outre, la délétion d'un ou plusieurs domaines transmembranaires d'une cassette empêche l'adressage des deux cassettes transmembranaires à la membrane plasmique (Gu, Sorkin and Cooper, 2001). **Ces résultats démontrent donc l'existence d'une dimérisation intramoléculaire des AC et son rôle dans leur export vers la membrane plasmique**.

La première étude suggérant la nécessité d'une dimérisation intramoléculaire des régions transmembranaires **dans la formation d'un site catalytique opérationnel** est celle de publiée par Seebacher et ses collaborateurs. En effet, ils démontrent, en construisant des AC chimères composées des domaines N-terminal, C1 et C2 de l'AC5, et des domaines transmembranaires de l'AC5 (5M1 et 5M2) ou de l'AC7 (7M1 et 7M2), que l'AC chimérique ne montre une activité catalytique que si les deux cassettes qui la composent provienne de la même AC : $AC_{5M1\text{-}5M2}$ ou $AC_{7M1\text{-}7M2}$. Si les cassettes qui composent cette AC chimérique proviennent de deux AC différentes, $AC_{5M1\text{-}7M2}$ ou $AC_{7M1\text{-}5M2}$, aucune activité catalytique n'est observée (Seebacher, Linder and Schultz, 2001). En accord avec ceci, il a été montré que la co-expression des deux moitiés de l'AC8 ($AC8_{Nt\text{-}M1\text{-}C1}$ + $AC8_{M2\text{-}C2}$) et de l'AC5 ($AC5_{Nt\text{-}M1\text{-}C1}$ + $AC5_{M2\text{-}C2}$) génère une activité cyclase similaire à celle observée avec l'expression de l'AC pleine taille correspondante, alors qu'aucune activité cyclase n'est observée lorsque l'une des deux cassettes transmembranaires est manquante (Gu, Sorkin and Cooper, 2001 ; Hu *et al.*, 2002).

Une autre dimérisation intramoléculaire essentielle dans l'activité enzymatique des AC est la dimérisation des sous-domaines C1a et C2a, qui s'assemblent pour former le domaine hélicoïdal et le site catalytique des AC, comme précédemment mentionné.

Les dimérisations intermoléculaires

La dimérisation intermoléculaire des AC a été suggérée, avant même leur clonage, au début des années 1980 dans plusieurs études indépendantes publiées par Rodbell et par Neer et ses collaborateurs. Ces auteurs ont même avancé que les dimères d'AC constituaient certainement la forme active de l'enzyme et les monomères, la forme inactive (Rodbell, 1980 ; Neer, Echeverria and Knox, 1980). Depuis, **plusieurs études, réalisées avec différentes approches, ont mis en évidence, une dimérisation intermoléculaire des AC *via* leurs cassettes transmembranaires** (Cooper and Crossthwaite, 2006).

Cette dimérisation intermoléculaire aurait un rôle régulateur de l'activité catalytique de l'enzyme. En accord avec ceci, on peut citer les études publiées par *i)* Gu et ses collaborateurs, qui démontre que **la co-expression d'une AC8 catalytiquement inactive –** *en raison d'une délétion dans le domaine C1a* **– diminue l'activité catalytique de l'AC8 pleine taille avec qui laquelle elle est co-exprimée** (Gu, Cali and Cooper, 2002) ; *ii)* Bargali et ses collaborateurs, qui mettent en évidence, que **l'hétérodimérisation des AC2 et AC5 potentialise la production d'AMPc induite par Gαs, comparé à celle de l'AC2 ou l'AC5 exprimée seule** (Baragli *et al.*, 2008). Les résultats de Gu et ses collaborateurs démontrent également l'interaction physique entre l'AC6 et l'AC8 en système d'expression hérérologue (Gu, Cali and Cooper, 2002). En outre, la dimérisation de l'AC6 pleine-taille avec des formes tronquées de l'AC6, où la cassette transmembranaire M2 est manquante, se traduit par une inhibition de l'activité catalytique de l'AC6 pleine taille et altère son adressage à la membrane plasmique, suggérant que **les AC sont exportées vers la membrane plasmique sous forme de dimères**. La dimérisation intermoléculaire des AC pourrait cependant être sélective : l'activité enzymatique des AC1 et -2 n'est pas inhibée par la co-expression avec ces formes tronquées de l'AC6 (Ding, Gros and Feldman, 2005). **Par ailleurs, l'hétérodimérisation des AC, principalement mise en évidence en système d'expression hétérologue, est bien une réalité physiologique puisque démontrée dans le cœur de souris entre l'AC2 et l'AC5** (Baragli *et al.*, 2008).

La dimérisation et l'oligomérisation des AC joue un rôle dans leur capacité à produire de l'AMPc, en inhibant ou potentialisant leur activité, et pourrait donc constituer un aspect essentiel de leur régulation.

D. Régulation et classification des adenylyl cyclase

1. *Régulation de l'activité cyclase*

L'activité des AC est régulée par de multiples acteurs. Les propriétés de régulation de chaque AC sont regroupées dans le **Tableau I.5**.

a) *Régulation par les protéines G hétérotrimériques*

Les sous-unités Gα-GTP et GβɣX sont capables de moduler l'activité des AC.

Chez l'homme, il existe 16 sous-unités Gα (Wootten *et al.*, 2018). **Les sous-unités α appartenant à la sous-famille Gs et G_{Olf} induisent une stimulation de l'activité de toutes les AC transmembranaires. Au contraire, les sous-unités α de la sous-famille $G_{i/o}$ exercent un effet inhibiteur uniquement sur les AC1, AC5, AC6 et AC9** (Taussig, Iñiguez-Lluhi and Gilman, 1993 ; Taussig *et al.*, 1994 ; Cooper, 2003 ; Cumbay and Watts, 2004). L'AC8 ne ferait pas partie de cette liste : en effet, les effets inhibiteurs attribués à $G\alpha_{i/o}$, observés en réponse à l'activation de récepteurs couplés $G_{i/o}$ – tels que les récepteurs dopaminergiques D2 et muscariniques M4 (Nevo *et al.*, 1998), ou encore les récepteurs canabinoïdes CB1 et CB2 (Rhee *et al.*, 1998) – sont en fait attribuables à l'action des dimères GβɣX des protéines G hétérotrimériques (Gilbert *et al.*, 2005). **L'effet exercé par les protéines Gα, qu'il soit activateur ou inhibiteur, ne requiert que les domaines C1 et C2 de l'AC**, comme le suggèrent les résultats présentés par Scholich et ses collaborateurs, obtenus avec une AC5 soluble correspondant seulement aux domaines C1 et C2. Ces résultats mettent également en évidence que le domaine C1b de l'AC n'a aucun effet dans la médiation des effets Gα, car le mutant C1a-C2 montre des réponses identiques à Gαs et $G\alpha_{i/o}$ par rapport au mutant C1-C2 (Scholich *et al.*, 1997).

Les sous-unités GβɣX modulent l'activité de certaines AC et exercent un effet stimulateur ou inhibiteur en fonction de l'isoforme d'AC et des sous-unités Gβ et Gɣ composant le dimère (Khan *et al.*, 2013). Chez l'Homme, il existe 5 sous-unités Gβ et 13 sous-unités Gɣ (Wootten *et al.*, 2018), ce qui permet plus de 65 dimères GβɣX possibles.

L'effet stimulateur de dimères GβɣX libéré des protéines G a tout d'abord été mis en évidence sur l'AC2 (Tang and Gilman, 1991 ; Taussig, Quarmby and Gilman, 1993), puis étendu aux AC4 et AC7. Les AC2, 4 et 7 sont toutes porteuses d'un motif commun de 17 aminés, nommé PFAHL, au regard des derniers acides aminés qui le composent, nécessaires à cet effet. Ce motif est localisé dans le domaine C1 ; il est absent des autres ACs non stimulées par GβɣX (Gao and Gilman, 1991 ; Diel *et al.*, 2006 ; Khan *et al.*, 2013 ; Yoshimura, Ikeda and Tabakoff, 1996).

L'AC1 est la première isoforme d'AC pour laquelle l'effet inhibiteur de dimères GβɣX ait été montré (Tang and Gilman, 1991 ; Taussig, Quarmby and Gilman, 1993). Ils inhibent également l'AC3 (Diel *et al.*, 2006), les AC5 et -6 (Bayewitch *et al.*, 1998 ; Yoshimura, Ikeda and Tabakoff, 1996) et l'AC8 (Steiner *et al.*, 2006). L'effet exercé par la sous-unité GβɣX pourrait être dépendant de sa composition comme le suggère les résultats obtenus par Bayewitch et ses collaborateurs. En effet, ils démontrent que $G\beta_1\gamma_2$ exerce une inhibition

importante sur les AC5 et -6, tandis que $G\beta_5\gamma_2$ exerce une inhibition bien plus modérée sur l'AC5 ; quant à l'AC2, elle s'est révélée activée par des dimères $G\beta\gamma$ composés de $G\beta_1$ et inhibée par ceux incluant $G\beta_5$ (Bayewitch *et al.*, 1998a, 1998b).

La régulation des AC par les dimères $G\beta\gamma$ s'observe également *ex vivo* et traduise une réalité physiologique. On citera les travaux réalisés sur des tranches de cerveau de rat stimulées par des catécholamines (Iversen, 1977) ou dans le bulbe olfactif de rat, où la stimulation des récepteurs muscariniques induit une augmentation $G\beta\gamma$-dépendante de l'accumulation d'AMPc induite par la stimulation des AC2 et AC4 (Olianas, Ingianni and Onali, 1998).

b) Régulation par le calcium

Le calcium, tout comme l'AMPc, sont capables d'exercer une régulation croisée de leurs niveaux cytosoliques. Concernant l'AMPc, ceci est la conséquence du fait que certaines AC interagissent avec le calcium cytosolique libre ou lié à la calmoduline (CaM) et d'autres sont phosphorylées ou déphosphorylées par des kinases (CaMK, PKC) ou phosphatases régulées par le calcium (la calcineurine, CaN). Le calcium et l'AMPc – *dont les connexions furent mises en évidence au cours des années 1970, bien qu'ils ne pouvaient alors pas apprécier les mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénomènes observés* –sont décrits comme des messagers « synarchiques » en raison de leur systèmes rarement indépendants, généralement antagonistes, parfois synergiques ou redondants (Halls and Cooper, 2011). **Les AC sensibles au calcium sont exprimées dans les radeaux lipides de la membrane plasmique, des régions membranaires riches en cholestérol et sphingolipides dans lesquelles sont présents une quantité importante de protéines de signalisation et d'effecteurs** (Ostrom *et al.*, 2002 ; Crossthwaite *et al.*, 2005).

Régulation par le Calcium libre

Bien que toutes les AC soient inhibées par des concentrations cytosoliques très élevées en Ca^{2+}(>100µM) (Willoughby and Cooper, 2007), **des concentrations sub-micromolaires de Ca^{2+} libre régulent négativement l'activité des AC5 et AC6**. En effet, Guillou et ses collaborateurs ont mis en évidence une inhibition dose-dépendante de l'AC6 dans des cellules Sf9 pour des concentrations en calcium libre comprises entre 10^{-7} et 10^{-6} M (Guillou, Nakata and Cooper, 1999). L'inhibition des AC5 et AC6 par le calcium est biphasique avec une inhibition de « *haute* affinité » dès $[Ca^{2+}]i$ = ~0,4µM, et une inhibition de « *faible affinité* » dès $[Ca^{2+}]i$ = ~100µM (Mou *et al.*, 2009). Des expériences effectuées sur des protéines chimériques composées de fragments issus de l'AC5 ou de l'AC2, insensible au Ca^{2+}, révèlent qu'une protéine chimérique n'est inhibée par le calcium que si son site catalytique est constitué du domaine C1a de l'AC5, le domaine analogue de l'AC2 supprimant cette propriété (Hu *et al.*, 2002). **Cette inhibition des AC5/6 par le Ca^{2+} s'effectue au niveau du site catalytique des AC en raison d'une compétition avec le Mg^{2+} nécessaire à l'activité catalytique** (Guillou, Nakata and Cooper, 1999 ; Hu *et al.*, 2002). L'inhibition de ces AC par le Ca^{2+} a également été mise en évidence dans des systèmes endogènes (Garritsen *et al.*, 1992 ;

Yu, Ma and Green, 1993 ; Grünberger *et al.*, 2006). L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique inhibant les AC5 et -6 résulterait préférentiellement d'une entrée capacitative de calcium à la membrane plasmique, l'augmentation globale de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} ayant un effet inhibiteur bien moins marqué (Nakahashi *et al.*, 1997). Cette régulation Ca^{2+}/AMPc pourrait être à double-sens. En effet, l'AC6 jouerait un rôle dans la gestion du calcium et de ses fonctions dans le cardiomyocyte (Tang *et al.*, 2008).

Régulation par le Ca^{2+}/CaM

Les AC1, AC3 et AC8 sont les isoformes d'AC régulées par le complexe Ca^{2+}/CaM, en système d'expression hétérologue (Tang, Krupinski and Gilman, 1991 ; Choi, Xia and Storm, 1992 ; Cali *et al.*, 1994). Cependant, la sensibilité de l'AC3 au calcium est bien plus faible que celle des deux autres AC. En effet, alors que l'activité des AC1 et AC8 augmente fortement à des concentrations cytosoliques en calcium inférieures à 1µM, l'activité de l'AC3 ne montre qu'une faible augmentation à partir de 10µM de Ca^{2+} et n'est observable que sur membranes isolées. Au vu des concentrations « supra-normales » en Ca^{2+} nécessaires pour obtenir une réponse « à peine perceptible » de l'AC3, Fagan et ses collaborateurs qualifient cette AC comme insensible à l'élévation de la concentration cytosolique en Ca^{2+}. Celle-ci diffère donc des autres AC par le fait qu'elle **ne soit pas inhibée** par des concentrations cytosoliques très élevées en Ca^{2+} (>100µM). Les AC1 et AC8 sont activées *via* la CaM par le calcium capacitatif. En revanche, seule l'AC8 est également activée par le calcium libéré des stocks intracellulaires. L'AC1 se révèle être plus sensible au calcium que ne l'est l'AC8, avec des K_D de l'ordre de ~0,1µM et ~0,5µM, respectivement (Fagan, Mahey and Cooper, 1996). La régulation des AC par le Ca^{2+}/CaM résulte d'une interaction directe entre l'AC et la CaM, (Vorherr *et al.*, 1993 ; Gu and Cooper, 1999 ; Simpson, Ciruela and Cooper, 2006). Il existe également des preuves de la réalité physiologique de cette régulation par le Ca^{2+}/CaM pour ces trois AC, comme en témoignent les résultats obtenus dans différents tissus/cellules (Villacres *et al.*, 1998 ; Mamluk *et al.*, 1999 ; Hoffert *et al.*, 2005 ; Watson *et al.*, 2000 ; Trubey *et al.*, 2006).

Régulation par les CaM kinases

Les CaM kinases (CaMK), activées par la calmoduline en réponse à l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium, peuvent réguler l'activité des AC. L'inhibition de l'AC3 par la CaMKII a été rapportée en systèmes d'expression hétérologues (Wayman, Impey and Storm, 1995 ; Wei, Wayman and Storm, 1996) et dans des neurones olfactifs de souris (Wei *et al.*, 1998). Elle résulte d'une phosphorylation de l'AC3 au niveau de sa sérine-1076 par la CaMKII. Dans les neurones olfactifs de souris, l'inhibition de l'AC3 par la CaMKII induite par une stimulation olfactive jouerait un rôle dans la transmission des signaux olfactifs. L'activité de l'AC1 est uniquement inhibée par la CaMKIV, en système d'expression hétérologue. Dans ces conditions, la CaMKIV phosphoryle les sérines 545 et 552 (Wayman *et al.*, 1996).

Régulation par la calcineurine

L'augmentation de la concentration cytosolique en calcium, *via* l'activation de la calcineurine, phosphatase activée par le Ca^{2+}/CaM, régulerait de manière isoforme-spécifique l'activité de l'AC9. Les résultats de quatre études, menées dans des cellules exprimant naturellement l'AC9 (Antoni *et al.*, 1995 ; Paterson *et al.*, 1995) ou en système d'expression hétérologues (Antoni *et al.*, 1998 ; Paterson *et al.*, 2000) montrent que *i)* la production d'AMPc dans les cellules murine At T20, où l'AC9 est l'isoforme d'AC prédominante, est inhibée par l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium ; *ii)* les bloquants de la calcineurine y augmentent la production d'AMPc ; *iii)* dans les cellules n'exprimant pas l'AC9, l'inhibition de la calcineurine n'a aucun effet sur la production d'AMPc ; *iv)* l'inhibition de l'AC9 par la calcineurine opère à des concentrations cytosoliques en calcium de l'ordre de celles régulant l'activité de l'AC1 (Antoni *et al.*, 1998). L'AC9 étant fortement exprimée dans le cerveau, à l'instar de l'AC1 et de l'AC8, la régulation antagoniste du calcium sur l'activité de ces AC pourrait jouer un rôle essentiel dans la spécificité des signaux AMPc qui y prennent place. On notera cependant que dans une étude publiée par Premont et ses collaborateurs, l'AC9 clonée dans des banques d'ADNc de cerveaux de souris s'avère être insensible à 1µM de calcium (Premont *et al.*, 1996), ce qui contredit les résultats précédemment cités

c) *Autres régulations*

La protéine kinase A

La protéine kinase A (PKA), activée par l'AMPc, exerce une régulation négative sur l'activité des AC5 et AC6 induite par Gαs. Elle exerce donc une rétroaction négative et participe à l'interruption du signal. En effet, Iwami et ses collaborateurs ont mis en évidence que la phosphorylation de l'AC5, effectuée par la PKA, diminue significativement la production d'AMPc. Cette inhibition est bloquée en présence d'inhibiteur de la PKA (PKI), et par la surexpression d'une sous-unité régulatrice de la PKA (Iwami, Kawabe, *et al.*, 1995). Des résultats similaires ont été obtenus pour l'AC6. La mutation de la sérine 674 prévient l'inhibition dépendante de PKA de l'AC6 (Chen *et al.*, 1997). La phosphorylation de l'AC5 pourrait s'effectuer sur des sérines inclues dans 14 séquences consensus de phosphorylation par la PKA et notamment la sérine-788, correspondant à la sérine-674 de l'AC6. **La régulation des AC5 et AC6 par la PKA s'effectue donc au niveau de leur région C1b** (Beazely and Watts, 2006). **La PKA, les AC5 et les AC6 sont co-localisées au sein de complexes macromoléculaires de signalisation organisés par les protéines d'échafaudage AKAP79/150** (Bauman *et al.*, 2006).

L'AC8 est régulée par un mécanisme similaire. En effet, Willoughby et ses collaborateurs **démontrent que l'activité de l'AC8 est inhibée par la PKA**, *via* la phosphorylation de la sérine-112 du domaine N-terminal qui se situe à proximité du site de liaison à l'AKAP79. L'utilisation d'un mutant non-phosphorylable de l'AC8, ou d'un inhibiteur de la PKA, lève cette inhibition de l'activité de l'AC8 (Nasu *et al.*, 2015).

La protéine kinase C

Six des neuf isoformes d'AC transmembranaires sont régulées par la PKC.

La protéine kinase C (PKC) exerce une régulation positive sur l'activité des AC2, AC4 et AC7, sur la base de expériences effectuées en systèmes d'expression hétérologues (Levin and Reed, 1995 ; Tabakoff *et al.*, 2001 ; Schallmach, Steiner and Vogel, 2006). La phosphorylation des différentes AC par la PKC pourrait être spécifique de certaines isoformes de PKC[3]. En effet, Nelson et ses collaborateurs démontrent que la régulation de l'AC7 est attribuable à la PKCδ (Nelson *et al.*, 2003). Les **PKCα et -ζ phosphorylent et stimulent l'activité de l'AC5** en système d'expression hétérologue alors que La PKCα est peu efficace (Kawabe *et al.*, 1994). La régulation de la production d'AMPc dépendantes d'une isoformes de PKC participe à la spécificité des signaux AMPc. En accord avec cette hypothèse, En effet l'expression de PKCζ, mais pas celle de la PKCα, augmente la production d'AMPc induite par l'insuline dans des cellules HEK exprimant stablement l'AC5 (Kawabe *et al.*, 1996). **On notera que l'activité de l'AC6 est inhibée par les isoformes -β, -δ et -ζ de la PKC** (Lai *et al.*, 1997 ; Cheung, Erclik and Mitchell, 2005).

Concernant l'AC2 et l'AC7, les motifs impliqués seraient localisés dans le domaine C2 et à proximité de leur extrémité C-terminale respectivement (Levin and Reed, 1995) ; ils sont constitués de 4 acides aminés, QSLG pour l'AC2 et QGLG pour l'AC7 suggérant que la séquence conservée QXLG joue un rôle essentiel dans la régulation des AC2, AC4 et AC7 par la PKC.

Les sérines phosphorylées par la PKC de l'AC6 sont localisées dans les domaines N-terminal, C1 et C2, Pour autant, seule la sérine-10 de l'AC6 a été montrée comme impliquée dans son inhibition par la PKC (Lai *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 2002).

L'AC9 serait également inhibée par la PKC. En effet Cambay et Watts, montrent, en système d'expression hétérologue, que l'activité de l'AC9 induite par l'isoprotérénol diminue significativement en réponse à l'activation de la PKC. L'inhibition de la PKC restaure la production d'AMPc (Cumbay and Watts, 2004).

RGS

Les protéines RGS (*regulators of G protein signaling*) sont des protéines GAP (*GTPase-activating proteins*) régulant l'activité des sous-unités Gα des protéines G hétérotrimériques en potentialisant l'hydrolyse du GTP lié en GDP, inactivant par conséquent la sous-unité Gα régulée. **Par leur effet sur ces sous-unités Gα, les protéines RGS régulent indirectement l'activité des AC. Cependant, plusieurs études démontrent que les protéines RGS exercent une régulation directe sur l'activité de certaines AC**. Ainsi, dans l'épithélium olfactif, **les protéines RGS1, 2 et 3 inhibent la production d'AMPc** induite par $G\alpha_{olf}$ ***via*** **une inhibition**

[3] Les PKC sont un groupe d'enzymes sérines-thréonine kinase impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires et voies de signalisations. Il existe de nombreuses isoformes de la PKC. Les PKC conventionnelles, -α, -β1, -β2 et -Ɣ, sont activées par le Ca^{2+}, le diacylglycérol (DAG) et un phospholipide (tel que la phosphatidylsérine). Les nouvelles PKC, - δ, -ε, -η, et –θ, nécessitent du DAG pour leur activation, mais n'ont pas besoin de Ca^{2+}. Enfin, il existe des formes atypiques de PKC, -ζ et -ι, ne nécessitant ni Ca^{2+}, ni DAG pour leur activation, uniquement la phosphatidylsérine.

directe de l'AC3. En système d'expression hétérologue, **la protéine RGS2 inhibe directement les AC5 et AC6** (Sinnarajah *et al.*, 2001 ; Salim *et al.*, 2003 ; Roy, Lemberg and Chidiac, 2003). Ce mode de régulation ne met pas en jeu l'activité GTPase de RGS2, mais une interaction physique directe entre le domaine N-terminal de RGS2 et le domaine C1 des AC5 et AC6 (Salim *et al.*, 2003 ; Roy *et al.*, 2006).

2. *Classification des Adenylyl Cyclases*

L'analyse de leur séquence a permis leur classification phylogénétique **(Figure I.10**). L'ensemble des études biochimiques et pharmacologiques menées en système d'expression hétérologues et sur cellules exprimant naturellement les AC ont mis en évidence des convergences et divergences de propriétés de régulation de l'activité cyclase, et se révélèrent être en accord avec la classification phylogénétique établie (Cooper, 2003 ; Halls and Cooper, 2011). **C'est ainsi, sur la base de leur homologie de séquence et de leurs propriétés de régulations communes, que les AC transmembranaires ont été classées en 4 groupes distincts**. Un cinquième groupe est réservé à l'AC solubles, qui diffère notamment des AC transmembranaire par le fait de ne pas être activée par la sous-unité Gαs des protéines G hétérotrimériques, propriété partagée par toutes les AC transmembranaires. Les propriétés de régulation de chaque AC sont regroupées dans le **Tableau I.5**.

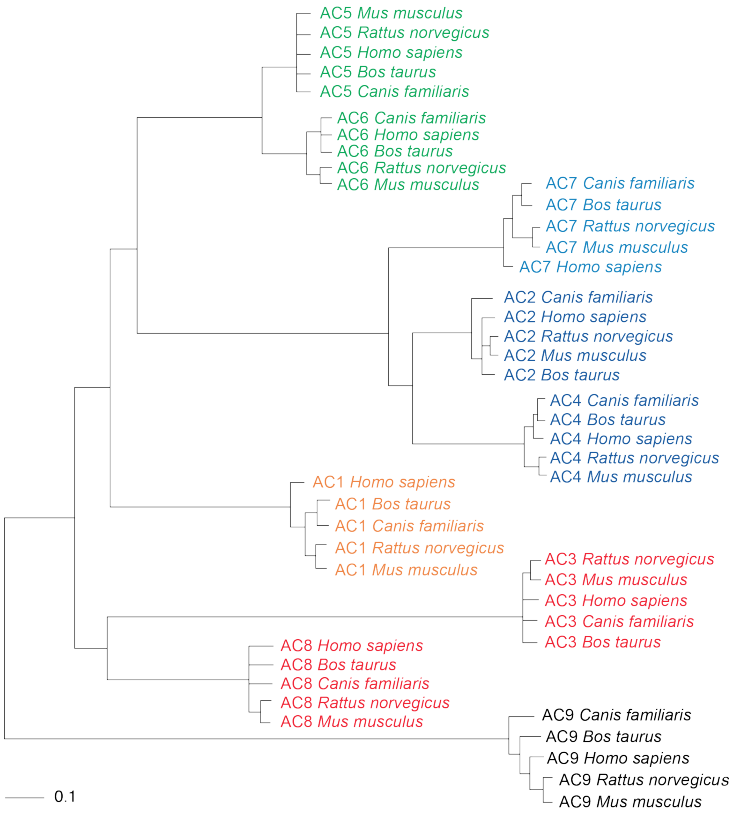


Figure I.10 : Arbre phylogénétique des neuf isoformes d'adenylyl cyclases transmembranaires.
Depuis Halls and Cooper, 2011.

Groupe	Isoforme	Régulation par les protéines G hétérotrimériques			Régulation par le calcium		Régulation par les protéines kinases		Autres régulations	
		Gαs	$G\alpha_{i/o}$	Gβɣ	Stimulation	Inhibition	Stimulation	Inhibition		
1	AC1	Stimulées	Inhibée	Inhibées	Ca^{2+}/CaM	CaMKIV				
	AC3					CaMKII		PKA	Inhibée par RGS1, 2 et 3	
	AC8									
2	AC2	Stimulées		Stimulées			PKC			
	AC4									
	AC7									
3	AC5	Stimulées	Inhibées		Augmentation de $[Ca^{2+}]_i$		PKCα et -ζ	PKA	Inhibées par RGS2	
	AC6							PKCβ, -δ et -ζ et PKA		Stimulée par Raf1
4	AC9	Stimulée			Calcineurine			PKC		
5	AC soluble								Stimulée par le bicarbonate	

Tableau I.5 : Régulations des Adenylyl Cyclases transmembranaires.

E. Distribution tissulaire et fonctions physiologiques des adenylyl cyclases

1. Apport des études transcriptomiques et des modèles murins

La distribution tissulaire des AC a été établie sur la base de résultats de PCR, de northern blots et d'hybridations *in situ* en raison de leur faible abondance (Alousi *et al.*, 1991) et du manque d'anticorps fiables. La présence des AC identifiée par ces approches transcriptomiques a été **confirmée dans la plupart des cas par des analyses fonctionnelles *in situ* en se servant des propriétés qui les distinguent**. **Il apparaît qu'aucune AC n'est tissu-spécifique et que plusieurs isoformes d'AC sont systématiquement co-exprimées dans les toutes les cellules**. **Le rôle fonctionnel de chaque AC a été plus précisément décrit par l'utilisation de modèles murins** (Dessauer *et al.*, 2017).

La distribution tissulaire et les fonctions physiologiques identifiées pour chaque AC sont présentées dans le **Tableau I.6**. Il est cependant important de noter que la distribution tissulaire décrite des AC repose sur la détection de transcrits par PCR, northern blot et hybridations *in situ*, et ne reflètent donc pas le niveau d'expression protéique des différentes isoformes d'AC dans chaque tissu. **Par ailleurs, les fonctions physiologiques des AC sont probablement plus étendues que celles identifiées à l'aide des modèles murins**. En effet, les résultats obtenus témoignent de la nécessité, et non de l'implication, des différentes isoformes d'AC dans certains processus physiologiques. La redondance fonctionnelle de certaines AC et leurs propriétés de régulation communes pourraient exercer une compensation à la perte d'une isoforme d'AC. Un bon exemple de cet argument réside dans le fait que certaines fonctions exercées par les AC1 et AC8 ne peuvent être évaluées que par la délétion conjointe de ces deux isoformes aux propriétés de régulation similaires.

Isoforme	Sites d'expression	Disponibilité de modèles murins		Fonctions physiologiques
		Invalidation	Surexpression	
AC1	Cerveau, médullo-surrénale	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Développement cérébral, apprentissage, mémoire, plasticité synaptique, réponse et dépendance aux opiacés, sensibilité à l'alcool, réponse à la douleur
AC3	Épithélium olfactif, pancréas, cerveau, cœur, poumons, testicules, tissu adipeux brun	Oui	Non	Olfaction, fonction spermatique, mémoire contextuelle, réponse à la peur, comportement maternel, obésité induite par un régime riche en lipides
AC8	Cerveau, poumon, pancréas, surrénales	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Apprentissage, mémoire, plasticité synaptique, réponse et dépendance aux opiacés, dépendance à l'alcool, réponse au stress, homéostasie du glucose et adaptation à un régime riche en lipides
AC2	Cerveau, poumon, muscle squelettique, cœur	Non	Non	Aucune donnée
AC4	Ubiquitaire	Oui *Tube collecteur rénal*	Non	Aucun phénotype
AC7	Ubiquitaire	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Réponse aux opiacée et à l'alcool, dépression, réponse immunitaire
AC5	Cœur, striatum, rein, foie, poumon, testicules, surrénales, tissus adipeux brun	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Régulation de la contraction cardiaque, coordination moteur, dyskinésie, réponse et dépendance aux opiacés, sensibilité à et protection contre la dépendance à l'alcool, réponse à la douleur et au stress, obésité induite par un régime riche en lipides
AC6	Cœur, rein, foie, poumon, cerveau, testicules, muscle squelettique, surrénales, tissus adipeux brun	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Régulation de la contraction cardiaque *via* régulation de l'homéostasie calcique, fonction rénale et sécrétion de rénine, pathologie rénale (polykystose), tonus du système nerveux sympatique
AC9	Ubiquitaire	Oui *mortalité élevée, peu de données*		Fonction cardiaque, bronchoconstriction, fonction des cellules Treg, réponse immunitaire dans les monocytes : différenciation en macrophages M2

Tableau I.6 : Distribution tissulaire et fonctions physiologiques des AC mammifères.
Modifié depuis Dessauer *et al.*, 2017.

2. Implication des AC dans de multiples pathologies humaines

Chez l'Homme, à l'exception de l'AC4, des mutations et/ou polymorphismes dans les gènes codant toutes les AC ont été associés à de nombreuses pathologies ou syndromes.

Bien qu'aucune pathologie ne soit associée à des polymorphismes dans le gène *ADCY1*, codant l'**AC1**, deux études montrent, au niveau protéique, une diminution de l'expression de l'AC1 chez des patients alcooliques ou atteints de la maladie d'Alzheimer (Sohma *et al.*, 1999 ; Yamamoto *et al.*, 2000).

Des polymorphismes dans le gène *ADCY8* codant l'AC8 ont été associés à des pathologies neuropsychiatriques telles que la bipolarité (de Mooij-van Malsen *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2010), la dépression et l'alcoolisme (Procopio *et al.*, 2013), et à des cas de trouble dissociatifs associés au stress post-traumatique (Wolf *et al.*, 2014). L'AC8 est également exprimée dans les cellules musculaires lisses vasculaires trans-différenciées, où elle participe aux remodelages vasculaires pathologiques (Clément *et al.*, 2006 ; Gueguen *et al.*, 2010 ; Keuylian *et al.*, 2012 ; Gueguen *et al.*, 2016). Le rôle de l'AC8 dans les remodelages vasculaires pathologiques sera développé dans la ***Partie 2 : artères et remodelages vasculaires pathologiques***.

Des polymorphismes dans le gène *ADCY3*, codant l'**AC3**, ont été associés au diabète et à l'obésité (Nordman *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010 ; Stergiakouli *et al.*, 2014 ; Warrington *et al.*, 2015), la dépression (Wray *et al.*, 2012), mais également dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Hulur *et al.*, 2015).

Bien qu'aucune donnée n'ait été obtenue de modèles murins concernant le rôle physiologique de l'**AC2**, des polymorphismes dans le gène codant cette AC, *ADCY2*, ont été identifiés chez des patients souffrant de bipolarité (Mühleisen *et al.*, 2014), et de pathologies pulmonaires telles que la BPCO (Hardin *et al.*, 2012) ; deux polymorphismes de *ADCY2* ont été identifiés comme ayant un effet positif sur la fonction pulmonaire chez des enfants exposés à la cigarette (Panasevich *et al.*, 2013).

En concordance totale avec les phénotypes murins, des polymorphismes dans le gène *ADCY7*, codant l'**AC7**, ont été associés à l'alcoolisme (Hellevuo *et al.*, 1997), la dépression (Joeyen-Waldorf *et al.*, 2012), mais également à des maladies auto-immunes pédiatriques (Li *et al.*, 2015).

Des polymorphismes dans le gène *ADCY5*, codant l'**AC5**, ont été associés à nombre de pathologies : métaboliques, chez des patients diabétiques, tout particulièrement des enfants, présentant une altération du métabolisme du glucose (Barker *et al.*, 2011 ; Rees *et al.*, 2011 ; Windholz *et al.*, 2011 ; Holstein *et al.*, 2013), ces patients montrant notamment un problème de conversion de la proinsuline en insuline (Wagner *et al.*, 2011) et chez des patients obèses (Knigge *et al.*, 2015); neuropsychiatriques, chez des patients souffrant d'alcoolisme (Procopio *et al.*, 2013) et de pathologies associées au rôle moteur de l'AC5, chez des patients souffrant de dyskinésies de myokymie faciale, chez qui des mutations gain de fonction, localisées dans le domaine hélicoïdal de l'AC5, ont été identifiées (Chen *et al.*, 2012, 2014).

Un variant hyperfonctionnel de l'**AC6**, *ADCY6* S674, a été identifié chez l'Homme (Gros *et al.*, 2007), et des polymorphismes du gène ont été identifiés chez des patients atteints de drépanocytose (Eyler *et al.*, 2008 ; Cita *et al.*, 2016).

Concernant l'**AC9**, des polymorphismes dans le gène codant cette isoforme d'AC, *ADCY9*, ont été identifiés chez des patients souffrant de cancer du pancréas (Lee and Gyu Song, 2015), de bipolarité (Toyota *et al.*, 2002). Des polymorphismes du gène *ADCY9* ont également montré comme ayant un effet protecteur contre la malaria chez des population maliennes et tanzaniennes (Manjurano *et al.*, 2012 ; Maiga *et al.*, 2013), et comme modulant la réponse aux bronchodilatateurs chez les patients asthmatiques (Small *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2011). De manière intrigante, des polymorphismes du gène *ADCY9* conditionnent la réponse des patients atteints d'athérosclérose au dalcetrapib, un médicament augmentant le taux de HDL cholestérol plasmatique (**voir *Partie 2 : Artères et remodelages vasculaires pathologiques***). En effet, seuls les patients présentant un certain polymorphisme de ce gène montrent une diminution des accidents cardiovasculaires en réponse à la molécule (Tardif *et al.*, 2015).

Partie 2 : Artères et remodelages vasculaires pathologiques

I. La paroi artérielle saine

A. Le système vasculaire

1. Généralités

Le système cardio-vasculaire, ou système circulatoire, est constitué d'un ensemble de vaisseaux qui assurent l'acheminement du sang dans l'ensemble de l'organisme. Au travers d'un vaste réseau d'artères, de capillaires et de veines, le système circulatoire permet le maintien de l'homéostasie, l'acheminement de dioxygène, de nutriments et d'hormones à l'ensemble des cellules de l'organisme. Il permet également la clairance du dioxyde de carbone et des déchets du métabolisme. Le sang est mis en mouvement au sein du système circulatoire par le cœur qui exerce une action de pompage. Deux circuits sanguins distincts assurent les rôles du système vasculaire.

- **La circulation pulmonaire**, appelée également *petite circulation*, a pour rôle principal de ré-oxygéner le sang en provenance des tissus, tout en éliminant le dioxyde de carbone qu'il contient. Initiée dans le ventricule droit, elle consiste à transporter, *via* l'artère pulmonaire, l'intégralité du sang pompé par ce ventricule cardiaque vers les poumons, où sont réalisés les échanges gazeux alvéolo-capillaires. Le sang, alors chargé en dioxygène, retourne vers l'oreillette gauche du cœur par les veines pulmonaires.

- **La circulation systémique** est initiée au niveau du ventricule gauche du cœur et consiste à faire circuler le sang à travers un grand nombre de circuits vasculaires parallèles. Elle a pour rôle d'irriguer l'ensemble de l'organisme avec du sang riche en dioxygène, circulant par le système artériel, et de rapatrier le sang quittant les tissus, appauvri en dioxygène et chargé en dioxyde de carbone, vers l'oreillette droite du cœur par le système veineux. La circulation systémique s'adapte aux besoins de l'organisme en augmentant le flux sanguin vers les tissus actifs. Lors d'un exercice physique, l'irrigation vasculaire de certains tissus est significativement modifiée, en particulier le muscle squelettique, dont l'irrigation sanguine est 25 fois supérieure à celle au repos.

L'anatomie du cœur est façonnée par sa fonction centrale de pompage dans ces deux circulations : le cœur droit, devant uniquement vasculariser les poumons, est moins épais que le ventricule gauche qui exerce un effort plus important en vascularisant l'ensemble de l'organisme.

2. *Classification des vaisseaux sanguins*

Le système circulatoire comprend cinq classes de vaisseaux sanguins : les artères et artérioles, appartenant au système artériel ; les veines et veinules, appartenant au système veineux ; et les capillaires, qui connectent artérioles et veinules au sein des organes et tissus. Le système artériel transporte le sang du cœur vers les tissus, et le système veineux retourne le sang des tissus vers le cœur.

a) ***Le système artériel***

i) La structure des artères

La paroi artérielle est organisée en trois tuniques concentriques appelées, de la lumière vers la périphérie ***intima***, ***media*** et ***adventice***, chacune composée de types cellulaires distincts et ayant une fonction propre dans la régulation des phénomènes hémodynamiques (**Figure I.11**).

L'intima est la couche la plus interne de la paroi vasculaire. Elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales jouant un rôle majeur dans l'intégrité artères de gros calibre et dans de nombreuses fonctions garantes de l'homéostasie vasculaire (**voir *Partie 2.I.C.1. Les cellules endothéliales***). Elle repose sur un **tissu conjonctif sous-endothélial**. Les artères de gros et moyen calibre sont également constituées d'une **lame élastique interne** conférant maintien et élasticité à l'artère. Le tissu conjonctif et la lame élastique interne sont perméables, permettant ainsi l'échange de matériaux entre les différentes couches de la paroi vasculaire. Cette perméabilité est essentielle pour les échanges paracrines entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de la media, notamment. En conditions physiologiques, l'intima est la couche la plus fine de la paroi artérielle.

La media est la couche intermédiaire de la paroi artérielle. Elle est principalement composée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) organisées en couches concentriques. Les CMLV baignent dans une matrice extracellulaire principalement composée d'élastine agencée en feuillets concentriques, de collagène et de protéoglycanes--. La media est séparée de la couche plus externe de la paroi artérielle, l'adventice, par une lame élastique externe. Elle correspond généralement à la couche la plus épaisse de la paroi artérielle. Les CMLV qui composent la media des artères exercent un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle et du débit sanguin, sous le contrôle du système nerveux autonome (**voir *Partie 2.I.C.2. Les cellules musculaires lisses vasculaires***).

L'adventice est la couche la plus externe de la paroi artérielle et est composée d'un tissu conjonctif lâche incluant principalement des fibres de collagène. Elle permet notamment l'ancrage du vaisseau sanguin aux tissus environnants. L'adventice est parcourue par un réseau de nerfs, les *nervi vasorum*, régulant les phénomènes hémodynamiques de l'artère, et de vaisseaux nourriciers, les *vasa vasorum*, assurant l'acheminement de dioxygène et de nutriments aux couches les plus externes de la paroi artérielle.

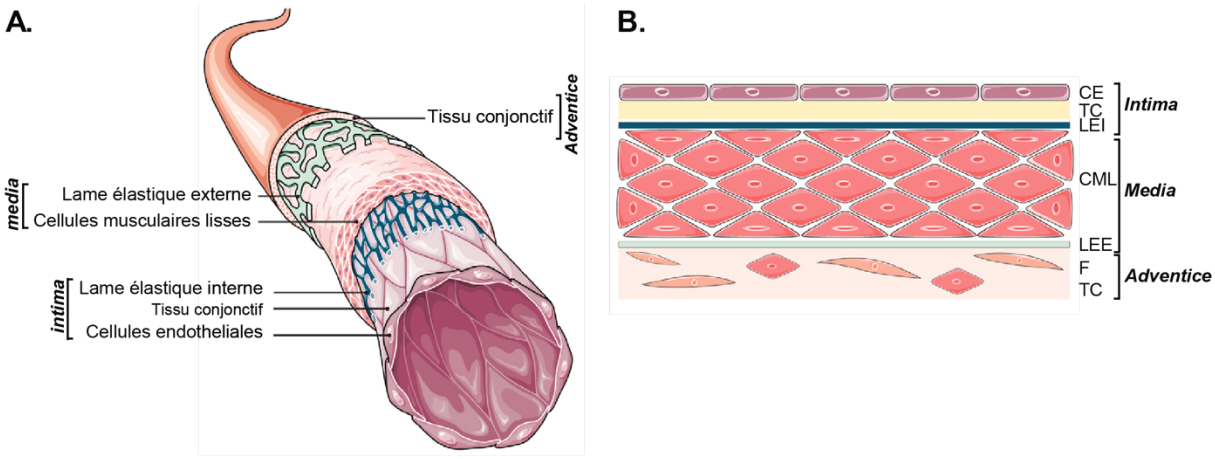


Figure I.11 : Représentation schématique de la paroi artérielle.
A. schéma de l'artère et des types cellulaires qui la composent. **B.** schéma de la paroi artérielle. CE : cellules endothéliales ; TC : tissu conjonctif ; LEI : lame élastique interne ; CML : cellules musculaires lisses ; LEE : lame élastique externe ; F : fibroblastes. Depuis Gueguen *et al.*, 2016.

ii) Les vaisseaux du système artériel

Les artères

Les artères ont une paroi plus épaisse que les veines, ce qui leur permet de résister à la pression élevée du sang éjecté du cœur. Les artères proches du cœur ont cependant des parois plus épaisses contenant une quantité élevée de fibres élastiques. Ce type d'artère, dont le diamètre est supérieur à 10mm, est appelé **artère élastique** (**Figure I.12**). L'élasticité de leur paroi absorbe l'onde cardiaque et limite ainsi l'élévation de la pression artérielle, et transforme le débit pulsatif en un débit continu. Les **artères musculaires** sont caractérisées par une paroi riche en CMLV, dans laquelle la quantité de fibres élastiques diminue par rapport aux artères élastiques (**Figure I.12**). Ces artères ont un diamètre compris entre 0,1 et 10mm. La transition des artères élastiques, proches du cœur, aux artères musculaires, qui en sont plus éloignées, se fait graduellement lorsque l'arbre vasculaire se ramifie. À leur tour, les artères musculaires se ramifient pour distribuer le sang au vaste réseau d'artérioles.

Les artérioles

Les artérioles sont de très petites artères (diamètre moyen de 30µm) qui mènent à un capillaire. La paroi des artérioles présente la même structure que les plus gros vaisseaux, mais l'épaisseur de chaque tunique est grandement diminuée. Aussi, la media des artérioles est limitée à une ou deux couches de CMLV. L'adventice des artérioles est très fine (**Figure I.12**). Les artérioles sont essentielles pour la diminution du flux sanguin au niveau des capillaires.

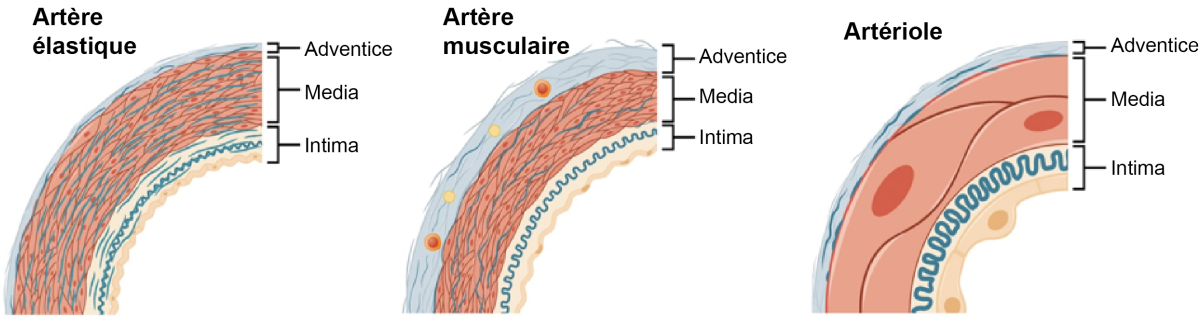


Figure I.12 : Paroi vasculaire des artères et artérioles.

b) *Le système veineux*

Les veinules

Les veinules post-capillaires ont un faible diamètre (8 à 100µm) et rejoignent plusieurs capillaires sortant d'un lit capillaire. La paroi des veinules est constituée d'un endothélium, d'une fine couche mediane avec quelques cellules musculaires lisses, ainsi que d'une adventice très fine (**Figure I.13**). Plusieurs veinules se rejoignent pour former une veine.

Les veines

Celles-ci conduisent le sang des veinules jusqu'au cœur droit. La pression sanguine qui s'y exerce est plus faible que dans le système artériel. La paroi vasculaire des veines est donc plus fine que celle des artères, et la lumière y est large et irrégulière. Les veines sont également équipées d'un système anti-reflux constitué de valves formées par des replis de l'intima. Ce système assure l'écoulement unidirectionnel du sang vers le cœur et empêche le reflux vers les capillaires résultant notamment de la pesanteur (**Figure I.13**).

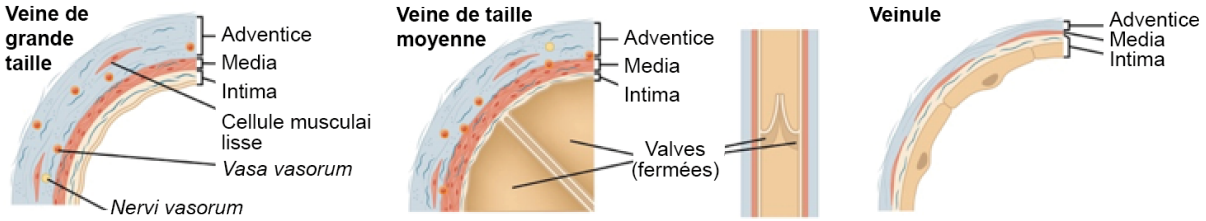


Figure I.13 : Paroi vasculaire des veines et veinules.

c) *Les capillaires*

Les échanges de gaz et d'autres substances entre le sang et les tissus se produisent dans les capillaires, où s'effectue la microcirculation entre les artérioles et les veinules. Le diamètre de la lumière d'un capillaire varie de 5 à 10 micromètres. La paroi d'un capillaire est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales entourée d'une lame basale. Il existe différents types de capillaires – *les capillaires continus, fenêtrés et sinusoïdes* – aux perméabilités distinctes. Bien que les capillaires continus soient les plus répandus, les deux autres types sont exprimés dans des organes spécifiques, où ils sont essentiels à l'échanges

de plus grosses molécules, tels que dans les reins, l'intestin, le foie, la rate, la moelle osseuse. Une représentation schématique des différents types de capillaires est donnée en **Figure I.14**.

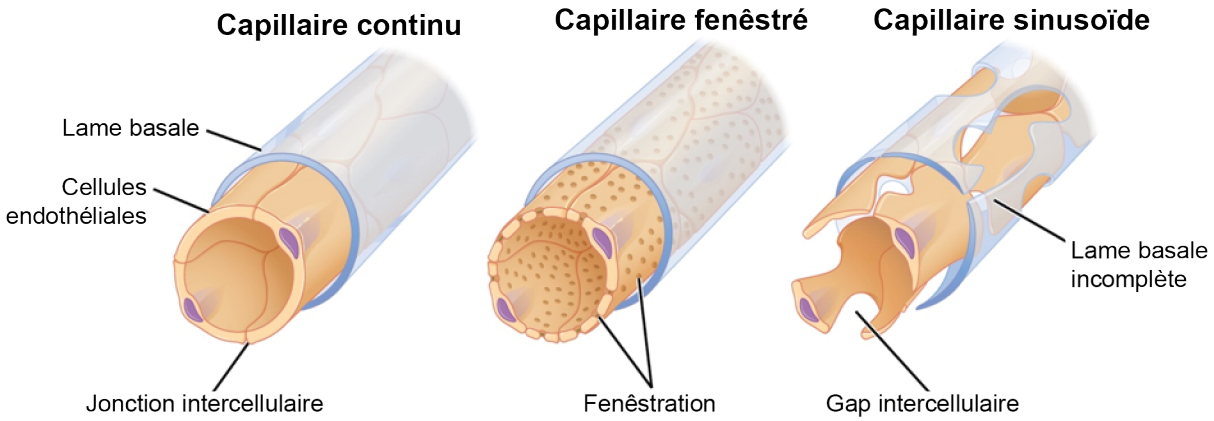


Figure I.14 : Propriétés des différents types de capillaires.

B. Principaux types cellulaires de la paroi artérielle

1. Les cellules endothéliales

L'endothélium, premier tissu en contact du sang circulant, n'a pas qu'un rôle de barrière entre le sang et les tissus, mais est un tissu complexe modulant de nombreux aspects de l'homéostasie vasculaire, *via* son rôle dans les échanges avec les tissus, dans la régulation du tonus vasculaire, dans le processus de coagulation et de réponse inflammatoire (Michiels, 2003).

La barrière endothéliale

La paroi vasculaire constitue une barrière sélective pour le transport de molécules entre le sang et les tissus. La zone de contact intercellulaire endothéliale contient plusieurs protéines transmembranaires à activité adhésive qui sont soit inclues dans des structures jonctionnelles spécifiques, soit localisées le long de la zone de contact. Ces protéines sont essentielles à l'adhérence intercellulaire et au contrôle de la perméabilité vasculaire aux fluides, aux molécules et à la transmigration de plusieurs types de globules blancs. Récemment, il a été montré que des constituants des jonctions pouvaient également être impliqués dans l'activité protrusive des cellules permettant l'invasion cellulaire. L'inflammation aiguë ou chronique induit une augmentation de la perméabilité vasculaire pouvant être brève ou soutenue en fonction des stimuli impliqués (Pries, Secomb and Gaehtgens, 2000).

Régulation de la coagulation

L'endothélium secrète de nombreuses molécules régulant la coagulation et la fonction plaquettaire. En conditions physiologiques, les cellules endothéliales sont anticoagulantes et anti-thrombotiques. En effet, elles sécrétent des agents antiplaquettaires tels que l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline, mais également l'inhibiteur du facteur tissulaire ou la thrombomoduline, qui tous deux inhibent l'effet de facteurs pro-coagulants et pro-thrombotiques. L'activation de l'endothélium par des facteurs pro-inflammatoires, ou une lésion vasculaire vont augmenter l'activation plaquettaire et l'adhésion plaquettaire à la matrice extracellulaire, *via* la sécrétion ou l'activation de facteurs pro-coagulants et pro-thrombotiques tels que le facteur de von Willebrand, la thrombine, le facteur tissulaire, ou encore le facteur d'activation plaquettaire. Bien que ces facteurs pro-coagulants soient essentiels à la cicatrisation vasculaire et limitent le risque hémorragique, leur dérégulation en conditions pathologiques, notamment en raison d'une exposition prolongée à des cytokines pro-inflammatoires, fait transiter le phénotype des cellules endothéliales vers un phénotype pro-thrombotique (Pearson, 1999).

Cellules endothéliales et immunité

L'expression de molécules d'adhérence à la membrane des cellules endothéliales en réponse à des stimuli pro-inflammatoires telles que le TNFα ou l'IL-1β (Bussolino *et al.*, 1990), favorise le recrutement, le roulement et l'internalisation de leucocytes au sein de la paroi artérielle. Au travers de cette expression des molécules d'adhérence, les cellules endothéliales sont impliquées dans le processus d'immunité innée.

Contrôle de la contractilité des CMLV

Les stimuli intégrés par les cellules endothéliales et les forces de cisaillement exercées sur l'endothélium modulent la libération des facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Ces facteurs paracrines régulent le tonus vasculaire en modulant la contractilité des CMLV.

Au début des années 1980, Furchgott et Zawadzki ont mis en évidence que les cellules endothéliales sont indispensables à la relaxation des CMLV induite par l'acétylcholine. En effet, à l'aide de préparations d'aorte thoracique de lapin, les auteurs révèlent que seules les aortes présentant une intima intacte montrent une relaxation des CMLV mediales en réponse à l'acétylcholine (Furchgott and Zawadzki, 1980). Sept ans plus tard, Palmer et ses collaborateurs identifient l'oxyde nitrique (NO) comme étant le facteur relaxant délivré par l'endothélium en réponse à l'acétylcholine (Palmer, Ferrige and Moncada, 1987). Le NO diffuse vers les CMLV où il active la guanylyl cyclase soluble, l'augmentation résultante de GMPc se traduisant par une relaxation de la cellule. Le NO n'est pas le seul vasodilatateur délivré par l'endothélium : les cellules endothéliales sécrètent également de la prostacycline (PGI_2), qui stimule la production d'AMPc dans les CMLV et favorise leur relaxation (**voir *Partie 2.I.C.2.b Les cellules musculaires lisses vasculaires – mécanismes de la contraction et de la relaxation***). La production de NO est constitutive, mais peut être potentialisée par de nombreux composés tels que l'acétylcholine, l'angiotensine II, l'histamine ou encore l'adénine. Comme pour le NO, la sécrétion de PGI_2 est constitutive mais peut être induite par plusieurs stimuli tels que l'histamine, la sérotonine, ou la thrombine (Michiels, 2003).

A l'inverse, l'endothélium peut sécréter des substances capables d'induire la contraction des CMLV. L'endothéline – *produite par l'endothélium en réponse à l'hypoxie, l'augmentation des forces de cisaillement, ou diverses substances telles que la thrombine, l'angiotensine II ou des cytokines* – est le principal agent vasoconstricteur sécrété par les cellules endothéliales. Ses effets vasoconstricteurs apparaissent comme étant durables, et résultent de l'activation d'un récepteur couplé à une protéine hétérotrimérique de type Gq/11, responsable d'une augmentation persistante de la concentration intracellulaire en ions calcium (**voir *Partie 2.I.C.2.b Les cellules musculaires lisses vasculaires – mécanismes de la contraction et de la relaxation***) (Michiels, 2003).

2. *Les cellules musculaires lisses vasculaires*

a) ***Généralités sur les cellules musculaires lisses vasculaires***

Les CMLV sont des cellules fusiformes, quiescentes et contractiles localisées dans la couche mediane de la paroi artérielle, où elles sont organisées en couches concentriques. **Dans un état de différenciation avancée, ces cellules prolifèrent à un niveau très faible et expriment un répertoire unique de protéines contractiles, canaux ioniques et molécules de signalisation nécessaires à leur fonction contractile**. Les CMLV produisent l'élastine, le collagène et les molécules de protéoglycane qui composent la matrice extracellulaire de la media des artères, conférant aux artères leur élasticité. A la différence d'autres cellules contractiles – *cellules musculaires striées ou cardiomyocytes* – les CMLV peuvent changer de phénotype en réponse à des modifications de leur environnement (Owens, 1995). **De par leurs propriétés contractiles, dans des conditions physiologiques, les CMLV modulent la constriction vasculaire et jouent donc un rôle dans la régulation de la pression artérielle et du débit sanguin**.

b) ***Marqueurs phénotypiques***

L'identification de marqueurs spécifiques des CML s'est révélée être initialement difficile en raison de l'expression, au moins transitoire, d'un nombre important de leurs marqueurs dans d'autres types cellulaires au cours du développement, de la réparation tissulaire ou de conditions pathologiques (Owens, Kumar and Wamhoff, 2004). **Plusieurs gènes et protéines exprimés spécifiquement dans les CML sont désormais identifiés comme marqueurs de maturation et de différenciation des CML.**

L'actine

La première protéine contractile à avoir été identifiée dans les CMLV matures pleinement différenciées est l'**α-actine du muscle lisse**. Elle est l'isoforme d'actine la plus abondante dans les CMLV matures, qui expriment également la β-actine non musculaire, la ɣ-actine non musculaire et la ɣ-actine du muscle lisse. **L'expression de l'α-actine augmente au cours du développement pour faire de celle-ci la protéine la plus abondante de la CMLV différenciée, représentant plus de 40% du protéome et 70% de l'actine totale** (Owens and Thompson, 1986 ; Fatigati and Murphy, 1984 ; Owens, 1995). Longtemps considérée comme un marqueur spécifique des CMLV, il est désormais connu que l'α-actine du muscle lisse est exprimée transitoirement par de nombreuses cellules d'origine mésodermale durant le développement, la réparation tissulaire et la croissance néoplasique. Elle est notamment exprimée transitoirement durant la différenciation du muscle cardiaque et squelettique (Ruzicka and Schwartz, 1988 ; Woodcock-Mitchell *et al.*, 1988) ; dans les myofibroblastes durant la cicatrisation (Darby, Skalli and Gabbiani, 1990) ; ou encore au sein de tumeurs épithéliales (Cintorino *et al.*, 1991). La seule expression de l'α-actine du muscle lisse ne permet donc pas de confirmer avec certitude l'identité des CML.

La myosine

La **myosine** est un hexamère. Elle est constituée de deux chaines lourdes (*myosin heavy chains* – MHC), de deux chaines légères non phosphorylables de 17kDa (*myosin light chains* – MLC-1 et MLC-3), ainsi que deux chaines légères phosphorylables de 20 kDa (MLC20) impliquées dans la régulation de l'activité contractile des CML, et dans la motilité Ca^{2+}/CaM dépendante de cellules non-musculaires (Somlyo, 1993). De multiples isoformes de ces sous-unités de la myosine ont été identifiées. Celles-ci peuvent présenter une expression tissu-spécifique, également marquée par une sélectivité développementale. **Les CML matures expriment plusieurs isoformes des sous-unités de la myosine**. Certaines de ces isoformes sont non-musculaires : NM-MHC-A ou NM-MHC-B. **La myosine du muscle lisse, ou SM-MHC, codée par le gène MYH11 est l'isoforme spécifique des CML** (Miano *et al.*, 1994 ; Owens, 1995 ; England and Loughna, 2013).

Autres protéines contractiles

D'autres protéines contractiles ont été identifiées dans les CMLV. Il convient de citer la **calponine**, qui interagit avec l'actine-F (filament d'actine – polymère d'actine-G), et inhibe l'activité ATPase de la myosine *in vitro*. Sur la base de ses propriétés, il a été proposé que la calponine régule la contractilité des CML (Winder, Sutherland and Walsh, 1991). On peut également citer une protéine de 22 kDa exprimée dans les CML, la **SM-22α** (*smooth muscle 22α*).

Protéines non contractiles exprimées dans les CML

Les CML expriment également certains marqueurs non contractiles.

La caldesmone est une protéine capable de se lier à l'actine, d'inhiber l'activité ATPase de la myosine et donc de réguler l'activité contractile des CML. La caldesmone est indétectable dans le muscle cardiaque adulte et dans les cellules musculaires squelettiques (Ueki *et al.*, 1987). L'expression des différentes isoformes de caldesmone évolue au cours du développement et permet donc d'identifier le stade de différenciation des CMLV.

La vinculine, protéine du cytosquelette localisée au niveau des jonctions cellulaires, présente une isoforme, la Ɣ-vinculine, exprimée sélectivement dans le muscle cardiaque et le muscle lisse. Son expression augmente au cours du développement postnatal dans l'aorte humaine (Glukhova, Frid and Koteliansky, 1990).

c) *Mécanismes de la contraction et de la relaxation*

A l'inverse du muscle cardiaque et du muscle squelettique, les CML sont dépourvues de bandes striées. Le muscle lisse se contracte de façon tonique et phasique, tandis que les contractions du muscle cardiaque sont rapides et de courte durée. La contraction des CML est modulée par le système nerveux autonome, mais également par des stimulations hormonales, autocrines, paracrines, et par des agents chimiques locaux.

La machinerie contractile des CML est constituée de filaments d'actine et myosine. Le glissement relatif des deux types de filaments se traduit par un raccourcissement de la cellule à l'origine de la contraction musculaire. L'activité contractile des CMLV est régulée par l'état de phosphorylation de la chaine légère de 20 kDa de la myosine (MLC20), sous contrôle de deux enzymes aux effets opposés : la kinase de la chaine légère de la myosine (MLCK), qui phosphoryle la MLC20, et la phosphatase de la chaine légère de la myosine (MLCP), qui la déphosphoryle. En ce qui concerne les CMLV, la balance entre les stimuli contractiles et relaxants détermine le tonus vasculaire (Webb, 2003). Un schéma succin des mécanismes de la contraction et de la relaxation est présenté en **Figure I.15**.

Contraction

La contraction du muscle lisse résulte d'une augmentation de la concentration cytosolique en ions Ca^{2+} qui, *via* leur fixation à la calmoduline, activent la kinase de la chaine légère de la myosine. La phosphorylation de la MLC20 par la MLCK permet l'interaction de myosine avec l'actine. L'énergie libérée de l'ATP par l'activité ATPase de la myosine alimente le cycle des ponts d'union entre la myosine et l'actine, se traduisant par le glissement des myofilaments d'actine sur les myofilaments de myosine et la contraction de la CML. En conditions physiologiques, l'élévation de la concentration cytosolique en ions Ca^{2+} peut être initiée par deux mécanismes distincts agissant en synergie :

- **L'initiation électromécanique**, qui est la conséquence de la dépolarisation de la membrane plasmique des CML en réponse aux forces d'étirement exercées sur le muscle lisse. Cette dépolarisation s'effectue *via* l'ouverture des canaux calcique voltage-dépendants de type L, permettant un influx de calcium dans la cellule. Ces canaux calciques sont caractérisés par un seuil d'activation élevé (-30mV) et une cinétique d'inactivation lente (>500ms). Bien que les canaux calciques de type L impliqués dans l'influx de Ca^{2+} dans les CML soient majoritaires, ceux de type T ont également été caractérisés dans les CML et sont également impliqués dans l'influx calcique. Ils diffèrent des canaux calciques de type L par leur faible seuil d'activation (entre -75 et -60mV) et leur inactivation rapide (Ghosh *et al.*, 2017).
- **L'initiation pharmacomécanique**, qui résulte de l'activation de la cellule par des molécules messagères endogènes vasoconstrictrices, telles que l'adrénaline, l'angiotensine II, ou encore l'endothéline. Leurs récepteurs étant couplés à la protéine hétérotrimérique Gq/11, elles induisent, l'activation de la phospholipase C_β et l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (PIP_2) de la bicouche lipidique en inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L'IP_3 libéré interagit avec ses récepteurs-canaux à la membrane du réticulum sarcoplasmique, provoquant leur ouverture et la libération des stocks intracellulaires de Ca^{2+}. En parallèle, la PKC, activée par le DAG libéré par l'hydrolyse du PIP_2, phosphoryle les canaux calciques de type L, augmentant l'entrée de calcium dans la cellule, et la contraction du muscle lisse.

Relaxation

La relaxation des CML résulte de l'absence de stimulus contractile, ou de l'action directe de substances inhibant les mécanismes de la contraction. De façon opposée au mécanisme de contraction, une réduction de la concentration cytosolique en calcium libre se traduit par la relaxation des CML. La relaxation des CML est régulée positivement par l'activation de récepteurs couplés à la protéine Gαs, l'AMPc étant un facteur relaxant dans les CML. Le NO libéré par les cellules endothéliales induit l'autre facteur relaxant de la CML, le GMPc, *via* l'activation de la guanylyl cyclase. Au moins quatre mécanismes distincts sont impliqués dans l'effet relaxant des nucléotides cycliques AMPc et GMPc, *via* l'activation de leur protéine kinase respective, la PKA et la PKG (Morgado *et al.*, 2012) :

- **La diminution des niveaux cytosoliques de Ca^{2+}**. Celle-ci est réalisée par *i)* la séquestration du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique *via* l'activation des pompes SERCA[4] en réponse à leur phosphorylation par les PKA et PKG *ii)* l'inhibition de la libération de Ca^{2+} depuis le réticulum sarcoplasmique du fait de la phosphorylation par les PKA, -G et -C du récepteur-canal de l'IP_3 ; *iii)* l'augmentation de l'efflux du Ca^{2+} *via* la phosphorylation par les PKA et -G et -C de la pompe PMCA (*Plasma membrane Ca^{2+}-ATPase*), et *via* l'activation de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) par le GMPc ; *iv)* la diminution de l'influx de Ca^{2+} extracellulaire résultant de l'inhibition des canaux calciques de type L par l'AMPc et le GMPc.
- **L'hyperpolarisation de la membrane plasmique des CML**. Celle-ci résulte de *i)* l'activation de canaux potassiques et l'inactivation de canaux sodiques par l'AMPc et le GMPc et leur kinase respective, *ii)* l'inactivation des canaux calciques de type L voltage-dépendants, diminuant ainsi l'influx de Ca^{2+}.
- **La diminution de la phosphorylation de la MLC_{20}**. Elle est la conséquence de *i)* l'inhibition de la MLCK phosphorylée par la PKA, qui induit une diminution de l'affinité de la MLCK pour le complexe Ca^{2+}/CaM en charge de son activation ; *ii)* l'augmentation de l'activité de la MLCP phosphorylée par les PKA et -G. La diminution de la phosphorylation de MLC_{20} se traduit par la relaxation du muscle lisse.
- **La dissociation de l'appareil contractile**. Elle est rapportée par certaines études montrant que l'augmentation de la concentration intracellulaire en nucléotides cycliques se traduit par la relaxation du muscle lisse indépendamment de changements dans la concentration intracellulaire en calcium et dans le niveau de phosphorylation de la MLC_{20}. Le mécanisme proposé repose sur la phosphorylation activatrice de la « *heat choc protein 20* » (protéine de choc thermique *de 20 kDa*) qui interagirait avec l'actine-F, empêchant ainsi son interaction avec la myosine phosphorylée. Un autre mécanisme proposé repose sur la dissociation de l'appareil contractile avec les structures du cytosquelette. Ainsi, le mécanisme de contraction demeurerait intact, mais le glissement relatif des myofilaments ne pourrait pas se traduire par la contraction du muscle lisse.

[4] Pompe SERCA : Pompe Ca^{2+}/ATPase chargée du transport du Ca^{2+} à travers la bicouche lipidique.

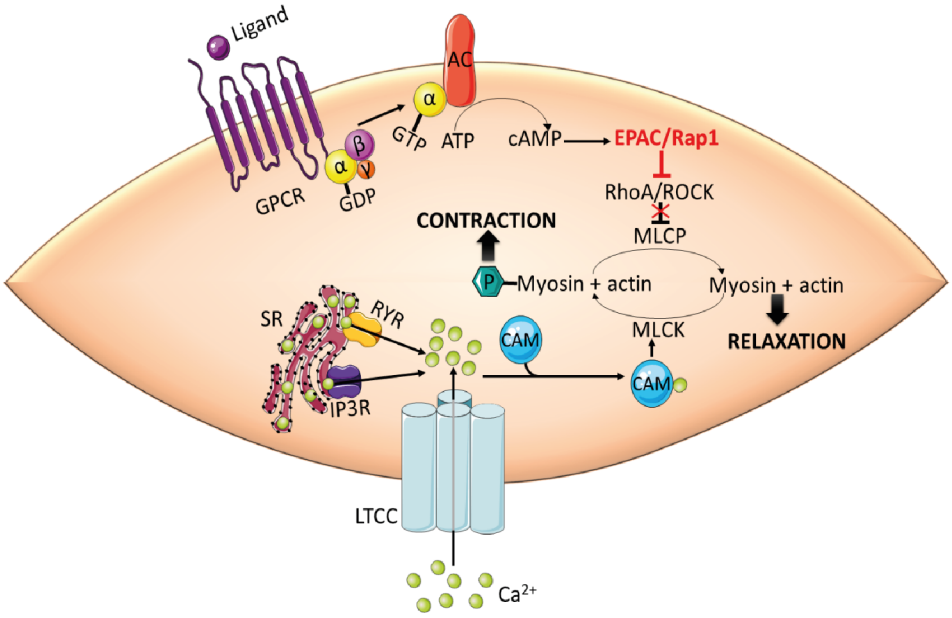


Figure I.15 : Représentation schématique des mécanismes de la contraction et de la relaxation des CMLV.
Depuis Wehbe *et al.*, 2020b.

II. De l'Athérosclérose à la re-sténose

A. L'athérosclérose

1. *Définition et généralités*

a) *La première cause de mortalité à travers le monde*

i) Définition et généralités

L'athérosclérose, par ses complications cardiaques et neurologiques, demeure la principale cause de mortalité dans le monde. Ces complications surviennent de manière imprévisible, lorsqu'une plaque d'athérosclérose jusqu'à présent « silencieuse », évolue brutalement vers l'occlusion aiguë, responsable des infarctus myocardiques ou cérébraux. Cette définition de l'athérosclérose, proposée par L. Feldman dans un article publié en 2005 dans le *Journal de Radiologie* (Feldman, 2005) illustre ce qu'est l'athérosclérose dans sa composante silencieuse et évolutive, mettant en avant les principales manifestations cliniques qui y sont associées et leurs conséquences.

L'athérosclérose est une maladie à composante inflammatoire, diffuse et évolutive, qui touche les artères de gros et moyen calibre. Elle est caractérisée, à des stades tardifs, par des épaississements localisés de la paroi artérielle appelés plaque d'athérosclérose. Ces plaques, composées d'un cœur lipidique entouré d'une chape fibreuse, se développent dans l'espace sous-endothélial de l'intima des artères (**Figure I.16**). **La sténose artérielle progressivement mise en place provoque l'hypoperfusion et l'ischémie des tissus situés en aval. Dans les cas les plus sévères, la rupture d'une plaque d'athérosclérose provoque une thrombose qui peut conduire à un infarctus myocardique ou cérébral** (Libby *et al.*, 2019).

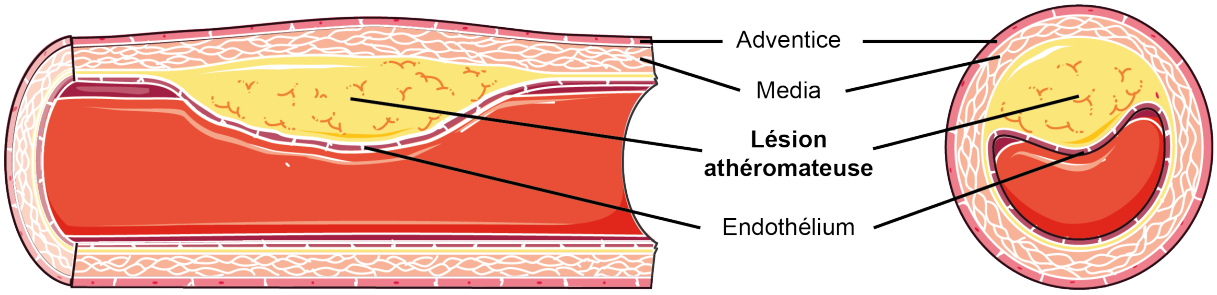


Figure I.16 : Représentation schématique d'une artère athérosclérosée.

ii) Prévalence et manifestations cliniques des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité à travers le monde. A l'origine d'environ 17,9 millions de décès en 2016, elles étaient responsables de près d'un tiers des décès à l'échelle mondiale ; 85% de ces décès étaient imputables à des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et infarctus myocardiques (World Health Organization – Cardiovascular diseases Fact Sheet 2017). En Europe, en 2015, avec 3,9 millions de décès qui leur étaient imputables, 45% des décès totaux étaient provoqués par des maladies cardiovasculaires (European cardiovascular disease statistics 2017). Les principales manifestations cliniques des maladies cardiovasculaires – *l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral* – sont les deux premières causes de mortalité en Europe. En France, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine d'environ 140 000 décès chaque année (European cardiovascular disease statistics 2017). **Les manifestations cliniques observées chez chaque patient dépendent de/des artère(s) touchée(s) par les remodelages vasculaires pathologiques**.

L'infarctus du myocarde

Si l'artère touchée est une des artères coronaires irriguant le cœur, son occlusion se manifeste par l'infarctus du myocarde. L'infarctus du myocarde est la première cause de mortalité aux États-Unis. Avec 805 000 cas d'infarctus myocardique chaque année (pour 328,2 millions d'habitants), c'est toutes les 40 secondes qu'un américain en est victime (Virani *et al.*, 2020). En France, on ne dénombre pas moins de 80 000 cas d'infarctus myocardique chaque année (pour 67 millions d'habitants), représentant ainsi 1 cas toutes les 7 minutes (Dossier d'information en santé Inserm, site internet de l'Inserm). Les femmes sont de plus en plus touchées par l'infarctus : leur taux d'hospitalisation pour un syndrome coronarien aigüe a bondi de 20% entre 2008 et 2014 (Gabet *et al.*, 2017).

L'infarctus peut se manifester une douleur aigüe et persistante dans la poitrine qui irradie le bras gauche, le dos et la mâchoire, parfois accompagnée d'un malaise, de nausées et de vertiges. Mais il peut également être silencieux : près d'un quart des infarctus du myocarde ne s'accompagnent pas des signes typiques, ils sont généralement dépistés *à posteriori* suite aux complications en résultant.

Les conséquences de l'infarctus dépendent de l'étendue de la zone asphyxiée et de la rapidité de reperfusion. Les principales conséquences sur le myocarde sont l'insuffisance et les troubles du rythme cardiaque.

L'accident vasculaire cérébral

Si l'artère touchée est une artère cérébrale irriguant une région du cerveau, son remodelage se caractérise par l'AVC ischémique, également appelé thrombose ou embolie cérébrale. L'AVC ischémique représente 80% des AVC. Il existe également des AVC hémorragiques, caractérisés par la rupture d'une artère cérébrale au niveau du cortex ou des méninges. Les AVC hémorragiques représentent 20% des AVC ; 15% sont des hémorragies cérébrales, 5% sont des hémorragies méningées. Cependant, ces proportions varient en

fonction des pays. Par exemple, une proportion plus importante d'AVC hémorragiques est observée dans les pays africains en voie de développement (Donkor, 2018). Aux États-Unis, 795 000 cas d'AVC sont recensés chaque année, soit quasiment autant que le nombre annuel d'infarctus du myocarde, mais les AVC y représentent 17% de la mortalité cardiovasculaire et s'y positionnent à la cinquième cause de mortalité. Chaque année en France, on dénombre 140 000 cas d'AVC, soit un cas toutes les 4 minutes (Dossier d'information en santé Inserm, site internet de l'Inserm).

Les symptômes de l'AVC sont très variés car ils dépendent de la zone du cerveau touchée. Certains symptômes sont cependant couramment observés chez les patients victimes d'un AVC : *i)* paralysie musculaire hémiplégique (d'un seul côté du corps) au niveau du visage et/ou d'un ou plusieurs membres ; *ii)* perte de sensibilité ou engourdissement d'un ou plusieurs membres et/ou du visage ; *iii)* troubles de la vue caractérisés par une perte de la vision d'un œil (cécité unilatérale), de la moitié du champ visuel pour chaque œil (hémianopsie), ou encore un doublement de la vision (diplopie) ; *iv)* des troubles du langage résultant de difficultés à articuler (dysarthrie) et/ou à trouver ses mots, ou bien de l'utilisation de mots inintelligibles, certains patients ont également une difficultés à comprendre ce qui leur est dit (aphasie) ; *v)* troubles de l'équilibre ou de la coordination des membres ; *vi)* troubles de la vigilance, somnolence, pouvant aller jusqu'au coma ; *vii)* mal de tête brutal, intense et inhabituel.

Les conséquences de l'AVC dépendent essentiellement du temps de prise en charge du patient. La sévérité constatée des AVC est donc variable, allant de l'accident ischémique transitoire, régressant en quelques minutes sans laisser de séquelles, à l'AVC très important qui emportera la vie du patient. En France, les estimations actuelles portent à 20% le nombre de patient décédant dans l'année qui suit l'AVC. Parmi les survivants, 60% récupèrent une indépendance fonctionnelle, tandis que 40% gardent des séquelles importantes. Les séquelles les plus fréquentes et invalidantes sont l'hémiplégie et l'aphasie. Bien que la plupart des patients récupèrent leur capacité à marcher, le contrôle moteur du bras et de la main reste souvent altéré. L'AVC est la première cause de handicap acquis à l'âge adulte et la deuxième cause de démence, derrière la maladie d'Alzheimer.

b) Facteurs de risques

Avec l'avènement des antibiotiques au début du XX^{ème} siècle, les maladies infectieuses, alors première cause de mortalité à travers le monde, ont cédé leur place aux maladies cardiovasculaires, occupant initialement le quatrième rang des causes de mortalité (Levy, 2012). En effet, avec une espérance de vie s'élevant à environ 42 ans dans les années 1900 dans les pays développés (Max Roser, Esteban Ortiz-Ospina and Hannah Ritchie – « Life Expectancy » OurWorldInData.org, 2019), les populations ne vivaient pas assez longtemps pour que les maladies cardiovasculaires réclament de nombreuses vies. Émergeant en conséquence d'une augmentation de l'espérance de vie des populations, celles-ci ont pris des proportions épidémiques dans les décennies qui ont suivi (Levy, 2012).

Initialement considérées comme une fatalité liée à l'âge, les maladies cardiovasculaires résultent de multiples facteurs de risque identifiés dès le milieu du siècle dernier dans de nombreuses études épidémiologiques. Ces études – incluant notamment **celle de Framingham**[5] **–** révèlent que **la survenue des maladies cardiovasculaires est conditionnée par des comportements majoritairement modifiables : l'hypercholestérolémie, le diabète, le surpoids, le vieillissement, le tabagisme, la sédentarité, et l'hypertension artérielle. Ils constituent aujourd'hui les facteurs de risque cardiovasculaires** (Mahmood *et al.*, 2014).

L'identification de ces facteurs de risque cardiovasculaire a permis la conception de *scores* permettant de renseigner le risque cardiovasculaire de chaque patient.

Le score PROCAM (*Prospective cardiovascular Münster study*), qui sert de base aux recommandations de l'*International Atherosclerosis Society*, calcule le risque de maladies coronariennes à 10 ans en prenant en compte l'âge, le sexe, le tabagisme, la pression artérielle, le taux de LDL-cholestérol, HDL-cholestérol, triglycéridémie, diabète et antécédents familiaux d'infarctus du myocarde. Un nombre de points est attribué, pour chaque risque cardiovasculaire, en fonction de la valeur correspondante aux données du patient. Le total des points donne un pourcentage de risque sur 10 ans, un risque faible correspond à un score <10%, un risque intermédiaire correspond à un score entre 10 et 20%, un risque élevé correspond à un score supérieur à 20%. La limitation principale du score PROCAM est que ce score a été établi sur la base de résultats obtenus uniquement chez une population masculine. Le score SCORE (Systematic coronary risk evaluation), qui est utilisé pour les recommandations de l'*European society of cardiology*, évalue le risque de maladie cardiovasculaire fatale sur 10 ans pour la population européenne.

Le score SCORE mesure le risque sur la base de facteurs identiques au score PROCAM, à la différence des mesures de cholestérolémie. En effet, le SCORE calcule le risque sur la base de la cholestérolémie totale, et non des paramètres individuels (LDL-cholestérol, HDL-cholestérol, tryclycéridémie), les antécédents familiaux ne sont également pas pris en compte. Les patients diabétiques sont considérés comme à haut risque et ne nécessitent pas de calcule du SCORE pour décider de la prise en charge. Il en va de même pour les patients présentant un niveau très élevé d'un des facteurs de risque mesuré : cholestérol supérieur à 8 mmol/l et pression artérielle supérieure à 180/110 mmHg (Rudaz, Rima and Humair, 2010).

Les facteurs de risque cardiovasculaire ne sont pas tous acquis : les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale présentent un taux plasmatique de LDL-cholestérol élevé dès leur plus jeune âge. En l'absence de traitements, les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale hétérozygote présentent un taux plasmatique de LDL-cholestérol entre 8 et 15 mmol/l, et développent une maladie coronarienne avant l'âge de 55 ans. Les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale homozygote non traités présentent un taux plasmatique de LDL-cholestérol entre 12 et 30 mmol/l et développent une maladie coronarienne très jeune, leur espérance de vie en l'absence de traitement est

[5] Étude de Framingham : étude épidémiologique visant à identifier les facteurs environnementaux conditionnant le développement des maladies cardiovasculaires. Initiée en 1948 avec 5209 habitants de la ville de Framingham, dans le Massachusetts, l'étude est toujours en cours sur la 3ème génération d'habitants (Splansky *et al.*, 2007).

inférieure à 20 ans. La *Société Européenne d'Athérosclérose* estime que l'hypercholestérolémie familiale serait sous-diagnostiquée en raison du nombre important de patient souffrant de maladies cardiovasculaires présentant un taux plasmatique de LDL-cholestérol élevé, limitant par conséquent le dépistage des formes génétiques d'hypercholestérolémie (Nordestgaard *et al.*, 2013).

L'espérance de vie étant en augmentation et les facteurs de risque étant persistants, les projections à l'horizon 2030 désignent toujours les maladies cardiovasculaires comme première cause de mortalité à travers le monde (World Health Organization – Cardiovascular diseases Fact Sheet 2017).

2. Histoire de l'athérosclérose

a) Une maladie présente depuis des millénaires

L'athérosclérose est souvent considérée comme une maladie des temps modernes, résultant d'un mode de vie sédentaire (**voir *Partie 2.II.A.1.b. Facteurs de risque***). **Cependant, une série d'études rapporte la présence de lésions athéromateuses chez des individus appartenant à des civilisations antérieures, mettant en évidence que l'Homme souffre de cette maladie depuis des millénaires**. C'est en 1852 qu'est premièrement mise en évidence la présence de larges plaques calcifiées dans l'aorte descendante d'une momie égyptienne de femme âgée (Czermack, 1852). Des observations similaires furent rapportées au cours du 20ème siècle, notamment par Marc Armand Ruffer, qui avançait en 1911 que « *les lésions athéromateuses étaient aussi fréquentes il y a 3000 ans qu'elles le sont maintenant* » (Ruffer, 1911). En 2003, Murphi et ses collaborateurs identifient des lésions athéromateuses calcifiées dans les artères coronaires, carotides et iliaques de *Ötzi*, la *momie des glaces*, qui était très certainement un chasseur-cueilleur ayant vécu vers 3500 avant l'ère commune (Murphy *et al.*, 2003). Récemment, les résultats de l'étude *Horus*, ayant pour objectif d'identifier la présence de lésions athéromateuses sur les momies de 4 civilisations anciennes – *l'ancienne Égypte*[6]*, l'ancien Pérou*[7]*, les Anasazi*[8]*, et les Aléoutes*[9] – entérine les constatations des études précédentes. L'étude a été effectuée par tomodensitométrie au rayons X, une technique consistant à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus. Par cette approche, les auteurs mettent en évidence la présence certaine ou probable de lésions athéromateuses chez 34% des 137 momies étudiées dans l'étude : *i)* 38% chez les anciens égyptiens ; *ii)* 25% chez les anciens péruviens ; *iii)* 40% chez les Anasazi ancestraux ; *iv)* 60% chez des chasseurs Aléoutes. Les auteurs montrent la présence des lésions dans les parois vasculaires dans lesquelles celles-ci se développent habituellement

[6] Ancienne Égypte : depuis l'ère prédynastique (3100 avant l'ère commune) jusqu'à la chute de l'ère romaine (364 de notre ère).
[7] Ancien Pérou : habitant de la région entre 200 et 1500 de notre ère.
[8] Anasazi : Amérindiens du sud-ouest de l'Amérique du nord ayant prospéré entre le 8ème et le 14ème siècle de notre ère. Momies datant de 1500 avant l'ère commune à 1500 de notre ère.
[9] Aléoutes : peuple rattaché à l'ensemble culturel inuit, autochtone des iles aléoutes dont la culture a prospéré à partir de 2000 ans avant l'ère commune. Momies datant de 1756 à 1930 de notre ère.

(**voir *Partie 2.II.A.5. Localisation des lésions athéromateuses***). Les auteurs appuient leurs résultats en montrant une corrélation positive entre l'âge du décès et la présence/sévérité des lésions athéromateuses chez les momies (Thompson *et al.*, 2013). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la présence de l'athérosclérose chez ces populations présentant peu des facteurs de risque cardiovasculaire : *i)* une inflammation chronique causée par les infections microbiennes et parasitaires inhérentes aux civilisations antérieures ; *ii)* l'inhalation des fumées des feux utilisés pour cuisiner, s'éclairer et se chauffer ; *iii)* la présence d'autres facteurs de risques non identifiés, qui ne pourraient avoir été identifiés que dans le sang ou dans des tissus conservés (Thomas *et al.*, 2014). **Ces études supposent donc que l'Homme présentent une susceptibilité à développer des maladies cardiovasculaires en fonction de facteurs génétiques associés à des facteurs environnementaux ; cela conditionnerait la vitesse et la sévérité du développement des lésions athéromateuses**.

b) Découverte de la maladie et premières descriptions

La première description anatomopathologique d'une lésion athéromateuse remonte aux travaux d'Antonio Scarpa (1752-1832) sur l'anévrisme artériel, publiés en 1804, qui proposait que l'anévrisme résulte « d'une dégénérescence de la couche interne de l'artère, lente, à l'ulcération pathologique stéatomateuse, fongueuse et squameuse ». La dénomination de la maladie n'a cessé d'évoluer au cours du 19ème siècle. Il faudra attendre 1904, un siècle après la description anatomopathologique de Scarpa, pour que le terme *athérosclérose* soit proposé par Félix Marchand. Ce terme, toujours employé à ce jour, reflète la dualité de la lésion athéromateuse :

- *athérome* : du grec « *athêra* », traduit par *bouillie*
- *sclérose* : qui met en avant le processus fibrosant de la lésion

3. *Les principales étapes de l'athérogénèse*

Une représentation schématique de l'athérogénèse est proposée en **Figure I.18**, celle-ci met en avant le rôle prépondérant des CMLV nouvellement admis.

a) *Initiation de la lésion athéromateuse*

D'une pathologie où l'hyperlipidémie tenait la place principale, l'athérosclérose est devenue, depuis la fin des années 1990, une pathologie inflammatoire associée à une dyslipidémie et à un dysfonctionnement endothélial.

Le taux plasmatique excessif de LDL-cholestérol représente un facteur déterminant pour l'initiation et la progression des lésions athéromateuses. Plusieurs modèles de souris transgéniques C57BL/6, ont d'ailleurs permis de mettre en évidence le rôle crucial du LDL-cholestérol dans l'initiation des lésions. En effet, l'invalidation des gènes codant l'apolipoprotéine E des LDL (ApoE), ou le récepteur au LDL (LDL-R), provoque le développement des lésions athéromateuses de manière spontanée ou consécutivement à un régime riche en lipides (Ishibashi *et al.*, 1994 ; Plump *et al.*, 1992 ; Nakashima *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1992). Chez les patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale, il existe un risque cardiovasculaire très élevé ; à l'inverse, un faible taux plasmatique de LDL-cholestérol corrélé à une réduction du risque cardiovasculaire est observée chez les patients présentant une mutation perte de fonction de la protéine PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin de type 9*) impliquée dans l'internalisation du LDL-R à la surface des hépatocytes (Nordestgaard *et al.*, 2013 ; Cohen *et al.*, 2006).

Le LDL-cholestérol s'infiltre dans l'intima, où il est retenu par l'interaction physique entre l'ApoB et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire de l'espace sous-endothélial (Fager *et al.*, 1995). **Le LDL-cholestérol est ensuite oxydé** sous l'action de différentes enzymes telles que la myéloperoxydase ou la 15-lipoxygénase (Navab *et al.*, 2004). L'oxydation du LDL-cholestérol est essentielle au recrutement des monocytes circulants. En effet, sur des artères de fœtus humains, l'accumulation et l'oxydation des LDL précèdent l'entrée des monocytes (Napoli *et al.*, 1997).

L'accumulation et l'oxydation du LDL-cholestérol activent les cellules endothéliales en induisant l'expression de molécules autorisant le recrutement de monocytes circulants et leur différenciation en macrophages dans l'intima. Ces molécules sont les facteurs chémo-attractants (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*, Cushing *et al.*, 1990 ; Gu *et al.*, 1998), des facteurs de croissance macrophagiques (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*, Rajavashisth *et al.*, 1990 ; Qiao *et al.*, 1997) et des molécules d'adhérence (P/E-sélectine, Vora *et al.*, 1997 ; Gebuhrer *et al.*, 1995 ; Dong *et al.*, 1998) ; ICAM-1, *intracellular adhesion molecule 1*, Collins *et al.*, 2000 ; VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*, Hanyu *et al.*, 2001). **Le recrutement des monocytes/macrophages est un élément déterminant de l'athérogénèse**. En effet, *i)* l'extinction du gène codant le M-CSF chez la souris KO ApoE$^{-/-}$ induit une résistance au développement de l'athérosclérose malgré un cholestérol

sanguin élevé (Qiao *et al.*, 1997) ; *ii)* l'inhibition de l'expression de VCAM-1 par l'usage de variants hypomorphiques chez des souris KO LDL-R réduit significativement la taille des lésions athéromateuses par rapport aux souris KO LDL-R / VCAM1$^{+/+}$ (Cybulsky *et al.*, 2001) ; *iii)* l'invalidation du gène codant la P-sélectine entraine une diminution de la taille des stries lipidiques et du recrutement monocytaire chez les souris KO LDL-R, bien qu'aucune différence sur la surface des lésions complexes ne soit observée après 37 semaine de régime riche en lipides (Johnson *et al.*, 1997) et la double délétion des P- et E- sélectines entraine une diminution de la taille des stries lipidiques, 5 fois plus faible que chez les souris LDL-R$^{-/-}$ P/E$^{+/+}$, avec des lésions 40% moins étendues après 37 semaines de régime riche en lipides (Dong *et al.*, 1998).

Sous l'influence du M-CSF, les macrophages expriment des récepteur « éboueurs » de haute capacité – *tels que CD36, SR-A1, SR-A2, SR-B1, MARCO, LOX-1, PSOX* (Plüddemann, Neyen and Gordon, 2007 ; Webb and Moore, 2007) – leur permettant d'internaliser spécifiquement les LDL-oxydés (Goldstein *et al.*, 1979), *via* leur capacité à lier des épitopes spécifiques d'oxydation (Miller *et al.*, 2011). Cependant, l'expression des récepteurs « éboueurs » ne diminue pas avec l'augmentation du contenu intracellulaire en cholestérol, comme le fait l'expression des récepteurs aux LDL de haute affinité. Il en résulte une surcharge des macrophages par des esters de cholestérol, les transformant ainsi en cellules spumeuses (Suzuki *et al.*, 1997). La génération de macrophages spumeux dans l'espace sous-endothélial de l'intima des artères permet la formation de stries lipidiques, caractéristiques de la lésion athéromateuse précoce. De récentes découvertes permettent de proposer une initiation CMLV-dépendante de la lésion athéromateuse. En effet, le recrutement des monocytes circulants résulterait de l'expression de chimiokines par les CMLV trans-différenciées de l'intima, qui contribueraient ainsi également à l'établissement des stries lipidiques (**Figure I.18** et Basatemur *et al.*, 2019).

Les stries lipidiques sont inoffensives et totalement réversibles en l'absence de stimuli ayant permis leur formation. Elles peuvent être présentes dans les 6 premiers mois de la vie, probablement en raison de facteurs de risques présents chez la mère de l'enfant ; leur nombre décline au cours des années suivantes (Napoli *et al.*, 1997). Les lésions précoces réapparaissent à l'adolescence, où 53% des 16-19 ans présentent des stries lipidiques, et 15% additionnels présentent des lésions pré-athéromateuses ou athéromateuses dans leurs artères coronaires (Stary, 2000). **La présence continue des facteurs impliqués dans le développement de la plaque, à savoir l'infiltration de LDL-cholestérol et la mise en place d'une inflammation chronique, permet l'évolution de la strie lipidique vers une lésion complexe.**

b) ***Progression du processus d'athérogénèse***

La sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages sous-endothéliaux et les cellules endothéliales activées – *tels que le PDGF-BB (platelet-derived growth factor), l'interterleukine-1β (IL-1β), le TNF-α (tumor necrosis factor-α), ou encore l'interféron-γ (IFN-γ)* – induit différents changements phénotypiques des CMLV qui permettent la progression du processus d'athérogénèse. En effet, d'un phénotype quiescent et contractile, elles deviennent *i)* migratoires pour transiter de la media vers l'intima ; *ii)* prolifératives ; *iii)* inflammatoires en sécrétant de cytokines pro-inflammatoires ; *iv)* spumeuses en se gorgeant d'esters de cholestérol, contribuant ainsi à la formation du cœur lipidique/nécrotique de la plaque d'athérosclérose ; *v)* matrigéniques, pour former la chape fibreuse qui enserre le cœur nécrotique et stabilise la plaque d'athérosclérose ; ou encore *vi)* ostéochondrogénique, induisant la minéralisation de la plaque (**Figure I.17**). Ces changements phénotypiques des CMLV qui constituent le processus de **trans-différenciation**, sont également associés à une diminution du niveau d'expression des protéines contractiles (Bennett, Sinha and Owens, 2016 ; Basatemur *et al.*, 2019).

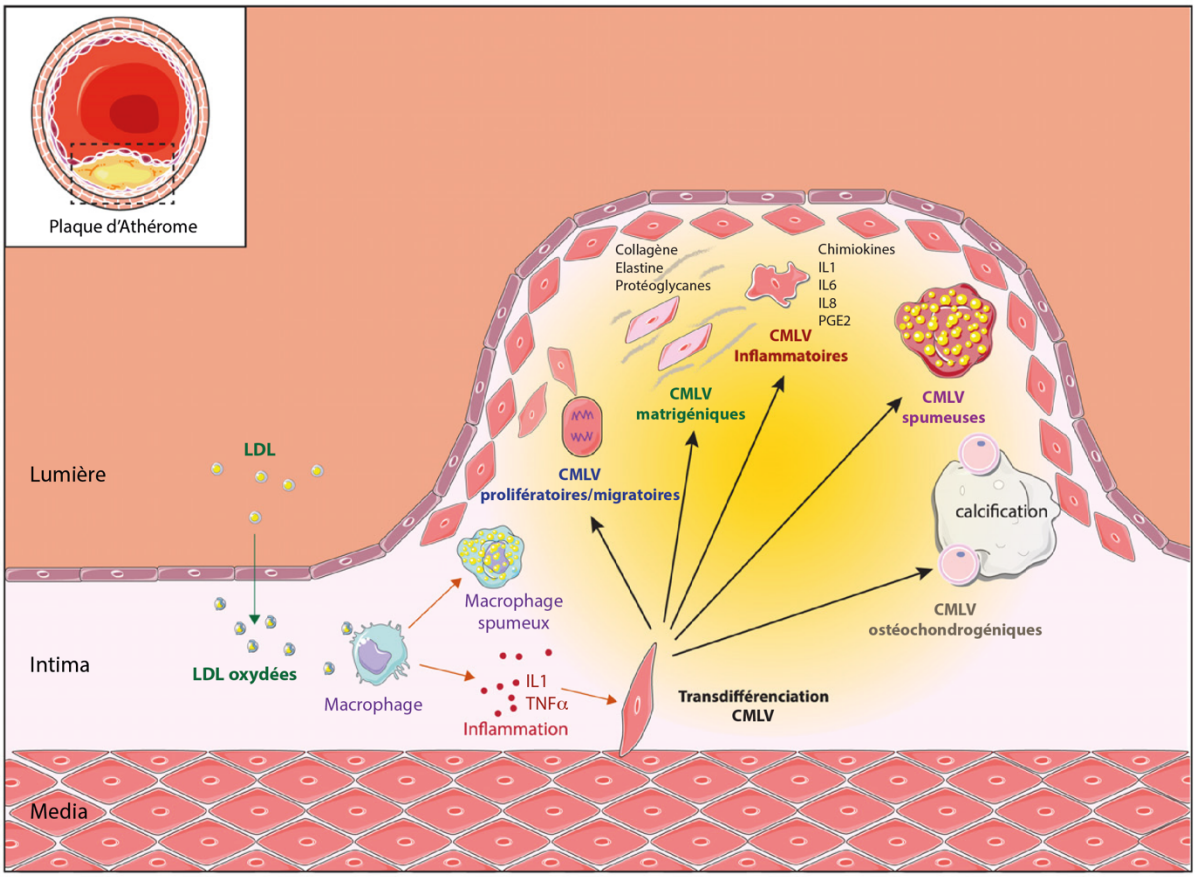


Figure I.17 : Représentation schématique de la versatilité du phénotype des CMLV trans-différenciées dans la plaque d'athérosclérose.

CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; IL1 : interleukine-1 ; IL6 : interleukine-6 ; IL8 : interleukine-8 ; PGE2 : prostaglandines de type E2 ; TNFα : facteur de nécrose tumorale α. Depuis Gueguen *et al.*, 2016.

L'évolution des lésions athéromateuses est caractérisée par la formation d'un cœur lipidique résultant de l'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima. Au sein de certaines lésions, les cellules spumeuses entrent en apoptose en raison d'un stress du réticulum résultant de la surcharge lipidique des cellules (Myoishi *et al.*, 2007 ; Seimon *et al.*, 2010). En l'absence de clairance des cellules en apoptose, celles-ci entrent en nécrose et forment le cœur nécrotique de la plaque. Il se compose, de lipides acellulaires, de débris cellulaires et de cellules en apoptoses. La présence de ce cœur nécrotique exacerbe l'inflammation au sein de la plaque et contribue à sa fragilisation (Clarke *et al.*, 2006 ; Gautier *et al.*, 2009).

L'immunité adaptative participe au développement des lésions. En effet, des lymphocytes T peuvent migrer vers les lésions où ils exercent des effets bénéfiques ou délétères sur l'évolution de la plaque d'athérosclérose en fonction du type de lymphocyte T recruté. Les lymphocytes T auxiliaires 1 (TH1 : *T helper 1 cells*), présents dans l'intima des artères athérosclérosées, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-ɣ et le TNF-α et sont donc considérés comme favorisant la progression de la plaque. A l'inverse, les lymphocytes TH2 et T-régulateurs sécrètent respectivement de l'IL-10, et du TGF-β, limitant l'inflammation et la prolifération des CMLV (Hansson and Jonasson, 2009 ; Nus and Mallat, 2016).

Les CMLV matrigéniques de la plaque, qui synthétisent une matrice extracellulaire essentiellement composée de collagène de type I, sont responsables de la production d'une chape fibreuse qui stabilise la plaque d'athérosclérose et la protège de la rupture (Basatemur *et al.*, 2019). Le développement d'une plaque stable peut se manifester cliniquement par l'angor stable, appelé également angine de poitrine, survenant lorsque l'apport oxygène au niveau du cœur est inférieur à ses besoins en raison de la sténose des artères coronaires.

Si la chape fibreuse se dégrade, la plaque se fragilise et, à terme, peut se rompre. Cela se produit du fait d'un environnement inflammatoire de la plaque constitué de métalloprotéases matricielles, de sulfatases et d'exoglycosydases secrétées par les macrophages et les CMLV trans-différenciées (Knox *et al.*, 1997 ; Newby, 2005 ; Sukhova *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2018).

Impliquée dans 60-70% des cas, la rupture de la plaque d'athérosclérose est la principale cause de l'infarctus du myocarde (Kolodgie *et al.*, 2001). Des observations microscopiques d'artères de patients décédés d'infarctus myocardique révèlent que l'épaisseur moyenne d'une chape fibreuse fracturée s'élève à 23µm, et que 95% des ruptures de plaques se produisent lorsque la chape fibreuse est inférieure à 65nm (Burke *et al.*, 1997 ; Kolodgie *et al.*, 2001). L'amincissement de la chape fibreuse pourrait résulter d'une perte progressive des CMLV matrigéniques : les chapes fracturées contiennent moins de collagène que les chapes intactes, et les CMLV sont généralement absente du site de rupture (Davies *et al.*, 1993 ; Kolodgie *et al.*, 2001). La rupture de la plaque peut aussi être provoquée par une érosion due aux contraintes hémodynamiques auxquelles est soumis l'endothélium.

L'érosion de la plaque, caractérisée par une desquamation locale de l'endothélium (Bentzon *et al.*, 2014), est à l'origine d'environ 25% des thrombus vasculaires.

Une fois la plaque rompue, l'exposition du cœur lipidique et nécrotique – *extrêmement thrombotique en raison de la très forte présence de facteur tissulaire* – au sang circulant déclenche une cascade de coagulation entrainant la formation d'un thrombus pouvant obstruer l'artère. Ce phénomène est à l'origine des manifestations cliniques brutales observées chez les patients.

c) *Les CMLV dans l'athérogénèse : une implication sous-estimée*

Dès 1967, Wissler proposait, sur la base d'études mettant en évidence la production de matrice extracellulaire et l'incorporation de lipides par les CMLV, **que les CMLV soient le principal type cellulaire impliqué dans le développement des lésions athéromateuses** (Wissler, 1967). Pourtant, ce n'est à partir de 2013, grâce à des études de lignage cellulaire, que l'importance des CMLV dans l'athérogénèse a été mise en lumière (Basatemur *et al.*, 2019). En effet, il apparaît que 30 à 70% des cellules exprimant des marqueurs macrophagiques – *LAMP2 (lysosome-associated membrane glycoprotein 2, également appelée CD107b et MAC3), GAL3 (galectin 3, également appelée MAC2), et CD68* – sont en fait des CMLV trans-différenciées ayant perdu tout marqueur permettant leur identification. Les CMLV représenteraient ainsi la majorité des cellules spumeuses au sein de la plaque. En outre, les méthodes « traditionnelles » de détection se révèlent être incapables de détecter plus de 80% des CMLV au sein des lésions athéromateuses avancées, raison pour laquelle leur implication a été sous-estimée jusqu'à la publication des études de lignage cellulaire (Shankman *et al.*, 2015 ; Chappell *et al.*, 2016 ; Feil *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2019 et **Figure I.18**).

Les modulations phénotypiques des CMLV ont donc une implication cruciale dans le développement des lésions athéromateuses. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette plasticité phénotypique représente donc un enjeu majeur de la recherche cardiovasculaire.

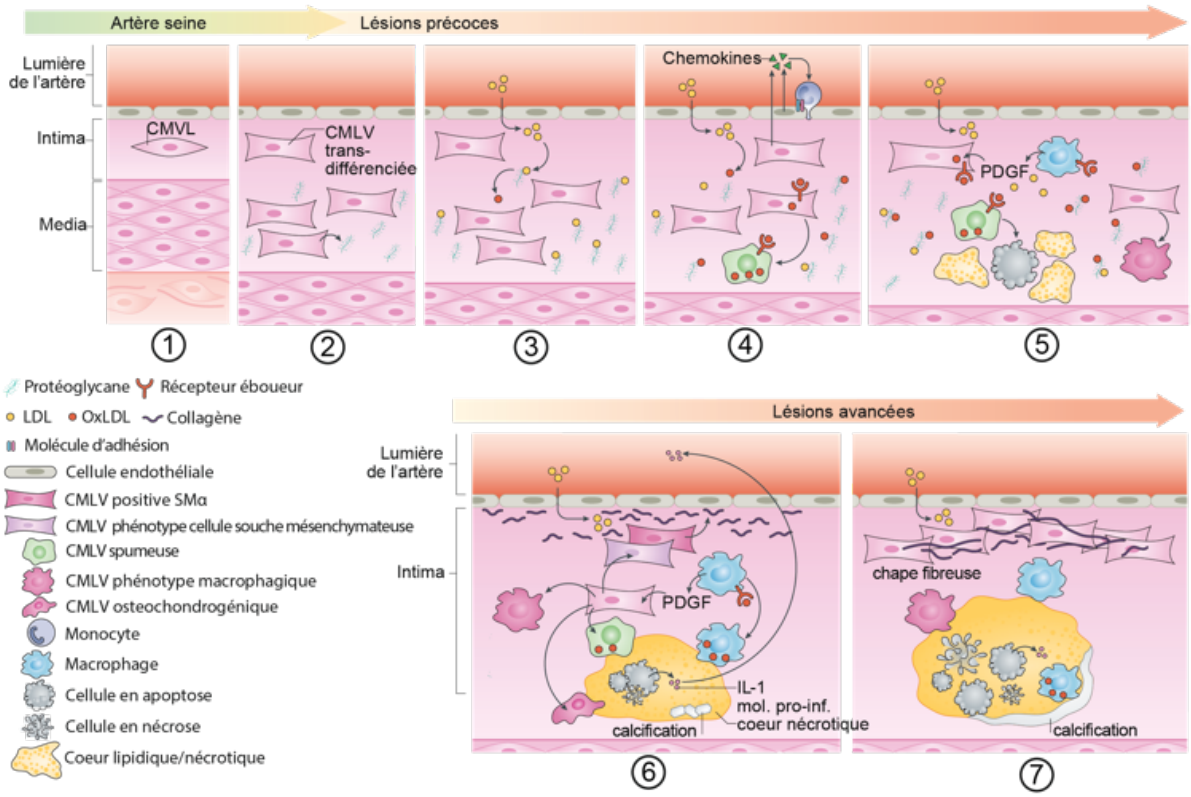


Figure I.18 : Schéma de l'implication des CMLV dans l'athérogénèse.
1. Structure de l'artère saine. **2.** Dès l'apparition de la lésion, les CMLV sont les principales cellules de la plaque et sont la source d'une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes. **3.** Les LDL de la circulation sont retenus dans l'intima par une interaction entre l'apolipoprotéine B et les protéoglycanes de la matrice. Les LDL retenus sont oxydés. **4.** Les LDL sont internalisés par les CMLV. Les CMLV trans-différenciées sécrètent des chimiokines responsables du recrutement des monocytes circulants qui se différencient en macrophages. **5.** Progression de la lésion athéromateuse par la formation de stries lipidiques. **6.** Génération d'une chape fibreuse par les CMLV matrigéniques, formation du cœur lipidique et nécrotique de la plaque par internalisation des LDL et apoptose/nécrose des cellules spumeuses, calcification de la plaque par les CMLV ostéochongrogéniques. **7.** La chape et le cœur nécrotique sont de taille importante, la calcification est plus marquée. Modifiée depuis Basatemur *et al.*, 2019.

4. *Classification des lésions athéromateuses*

La classification des lésions athéromateuses se base sur le caractère évolutif de l'athérosclérose. La classification la plus utilisée est celle fondée sur les travaux de Stary publiés en 1995 (Stary *et al.*, 1994, 1995).

a) *Lésions précoces*

Les lésions de type I :

Présentes majoritairement chez les nourrissons et pendant l'enfance, ces lésions sont caractérisées par de petits groupes de macrophages spumeux isolés associés à un épaississement local de la paroi, adaptatif et modéré de la paroi artérielle. Ces lésions n'engendrent aucun rétrécissement du diamètre de la lumière de l'artère (**Figure I.19**).

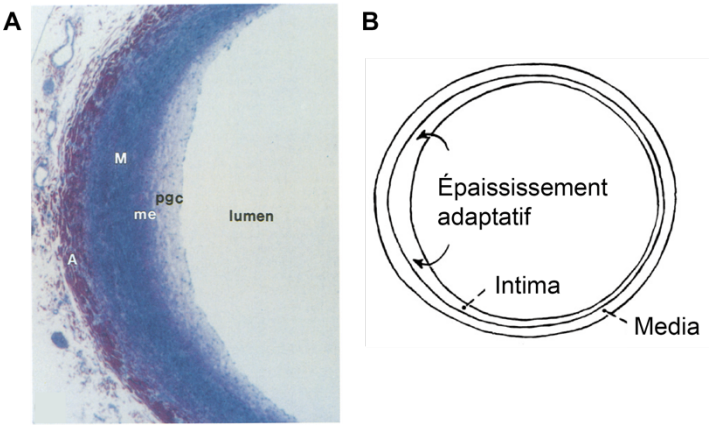


Figure I.19 : Lésion de type I.
A. Épaississement excentrique de la paroi d'une artère coronaire observé chez un enfant de 6 mois, marqué par la coloration de Lee et observé au microscope, grossissement x90. Pgc : protéoglycane, me : lame élastique (limitante élastique interne), M : media, A : adventice ; depuis Stary, 1992. **B.** Représentation schématique de la lésion de type I, depuis Stary *et al.*, 1995.

Les lésions de type II :

Présentes dans l'aorte de 99% des enfants âgés de 2 à 15 ans et s'étendent à partir la puberté, les lésions de type II correspondent au stade « stries lipidiques » de l'athérosclérose et sont caractérisées par une accumulation d'un nombre plus important de cellules spumeuses que dans les lésions de type I. Les cellules spumeuses s'y organisent en couches stratifiées dans l'intima. En outre, la lésion de type II est également caractérisée par la présence de macrophages dépourvus de gouttelettes lipidiques, de CMLV spumeuses, de lymphocytes T en quantité plus faible que les macrophages, et de mastocytes isolés. Les lésions de type II sont distinguées en deux types (**Figure I.20**).

- Les lésions de type IIa présentent un épaississement adaptatif de l'intima au niveau du site d'initiation de la lésion et sont susceptibles à la progression de la maladie. Celles-ci seraient issues des lésions de type I riches en cellules spumeuses. Elles diffèrent des lésions de type IIb par leur contenu plus important en lipoprotéines, macrophages, macrophages spumeux, débris cellulaires, CMLV et présentent une abondante matrice extracellulaire. Ces lésions présentent par ailleurs une distribution plus profonde des lipides et cellules spumeuses dans l'intima.
- Les lésions de type IIb sont les plus majoritaires des lésions de type II et sont considérées comme résistantes à la progression de la maladie.

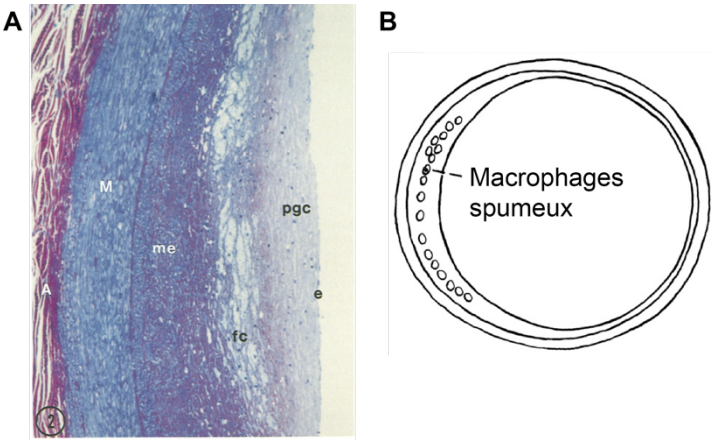


Figure I.20 : Lésion de type IIa.
A. Épaississement adaptatif de la paroi coronaire d'une femme de 25 ans, en réponse à l'accumulation de macrophages spumeux, marqué par la coloration de Lee et observé au microscope, grossissement x140. pgc : protéoglycane, me : lame élastique (limitante élastique interne), fc : macrophage foam cells, M : media, A : adventice ; depuis Stary, 1992. **B.** Représentation schématique de la lésion de type II, depuis Stary *et al.*, 1995.

Les lésions de type III :

Débutant généralement entre 10 et 20 ans, les lésions de type III sont appelées lésions « intermédiaires », « transitionnelles », ou encore « pré-athéromateuses ». Irréversibles, elles sont caractérisées par la présence de gouttelettes lipidiques extracellulaires dans la media (**Figure I.21**).

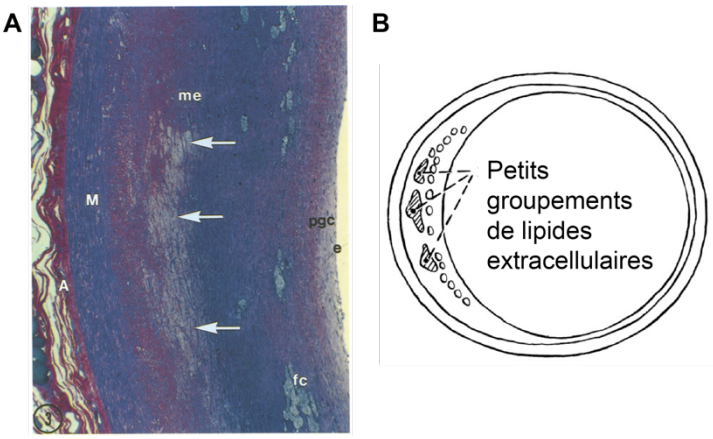


Figure I.21 : Lésion de type III.
A. Les lésions de type III présentent un épaississement adaptatif composé de lipides extracellulaire (flèches blanches. Les CML sont plus diffuses. Coupe d'artère coronaire d'un homme de 25 ans, marquée par la coloration de Lee et observé au microscope, grossissement x95. pgc : protéoglycane, me : lame élastique (limitante élastique interne), fc : macrophage foam cells, M : media, A : adventice ; depuis Stary, 1992. **B.** Représentation schématique de la lésion de type III, depuis Stary *et al.*, 1995.

b) Lésions avancées

Les lésions de type IV :

Apparaissant généralement après 30 ans et constituant le premier stade des lésions avancées, les lésions de type IV, également appelées « *atheroma* » sont caractérisées par la formation d'un cœur lipidique formé par l'agrégation, extensive mais bien définie, de dépôts lipidiques extracellulaires au niveau de l'épaississement intimal. Elles sont également constituées de macrophages et de CMLV spumeux ou non, de lymphocytes T, de mastocytes, mais également de protéoglycanes (**Figure I.22**). Associé à la formation du cœur lipidique, un processus de néo-angiogénèse est initié sous l'effet du facteur de croissance VEGF (*vascular endothelial growth factor*), libéré par les macrophages et les CMLV intimales, renforçant les risques de thrombose et d'hémorragie.

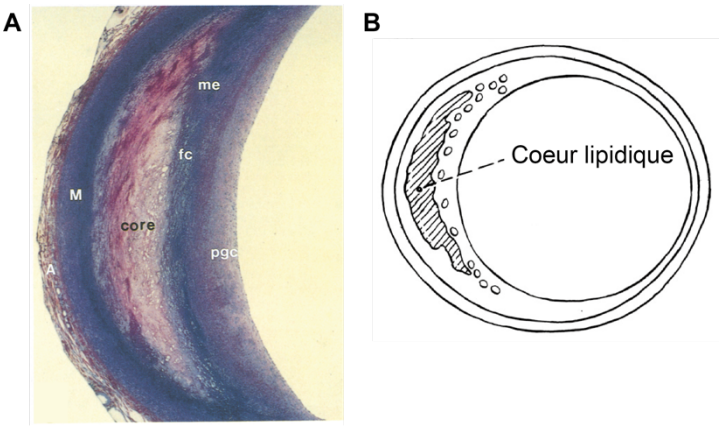


Figure I.22 : Lésion de type IV.
A. Les lésions de type IV présentent la formation d'un cœur lipidique au sein de la paroi, constitué par les macrophages spumeux. Coupe d'artère coronaire d'un homme de 23 ans, marquée par la coloration de Lee et observé au microscope, grossissement x40. pgc : proteoglycane, me : lame élastique (limitante élastique interne), fc : macrophage foam cells, M : media, A : adventice ; depuis Stary, 1992. **B.** Représentation schématique de la lésion de type IV, depuis Stary *et al.*, 1995.

Les lésions de type V :

Apparaissant généralement après 40 ans, les lésions de type V correspondent à la plaque fibrolipidique typique de l'athérosclérose décrite ci-dessus (**voir *Partie 2.II.A. L'Athérosclérose***). Elles se différencient des lésions de type IV par la présence d'une chape fibreuse constituée par la synthèse accrue de protéines matricielles par les CMLV. L'épaississement de la paroi vasculaire, pouvant également résulter d'une augmentation du volume du cœur lipidique et nécrotique de la plaque, conduit à une sténose de l'artère pouvant être plus ou moins importante (**Figure I.23**). Les propriétés des lésions de types V peuvent être multiples. Aussi, certaines lésions de type V peuvent être minéralisées, présentant une calcification importante, et sont dites de « type Vb », bien qu'elles puissent également être désignées comme lésions de « type VII ». Les lésions de type V principalement constituées de tissu fibreux sont dites de « type Vc », ou lésions de « type VIII ».

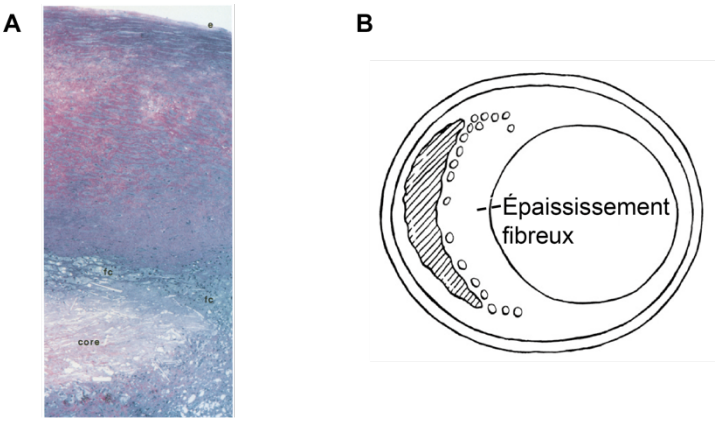


Figure I.23 : Lésion de type V.
A. Les lésions de type V présentent un épaississement fibreux au-dessus du cœur lipidique, constitué de CML et de collagène. Coupe d'aorte abdominale d'un homme de 40 ans, marquée par la coloration de Lee et observé au microscope, grossissement x140. core : cœur lipidique, fc : macrophage foam cells, M : media, e : endothelium ; depuis Stary, 1992. **B.** Représentation schématique de la lésion de type V, depuis Stary *et al.*, 1995.

Les lésions de type VI :

Elles représentent un stade associé à un risque élevé de complications cliniques en raison de l'instabilité de la plaque d'athérosclérose, résultant de la fragilisation de la chape fibreuse qui stabilise la plaque (**Figure I.24**). La plaque instable peut être sujette *i)* à l'érosion de l'endothélium, on parle de lésion « de type VIa » ; *ii)* à des hémorragies intra-plaques résultant de la rupture des néo-vaisseaux, on parle de lésion « de type VIb » ; ou *iii)* à sa rupture qui engendre la formation d'un thrombus résultant d'une cascade de coagulation déclenchée par la mise en contact des facteurs thrombotiques du sang circulant et des facteurs pro-thrombotiques contenus dans le cœur lipidique et nécrotique de la plaque responsable de l'obstruction de l'artère provoquant l'accident vasculaire ischémique ; on parle de lésion « de type VIc ».

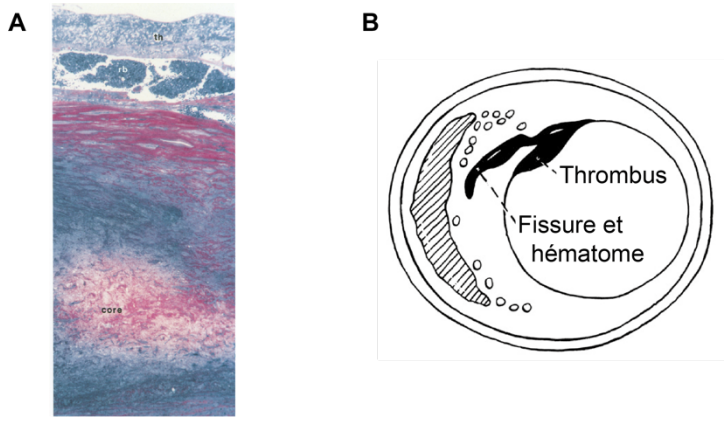


Figure I.24 : Lésion de type VI.
A. Photo d'une lésion de type VI au niveau de l'aorte abdominale, présentant un thrombus au niveau luminal. Coupe d'aorte abdominale d'une feme de 37 ans, marquée par la coloration de Lee et observé au microscope, grossissement x140. Th : thrombus, rb : globule rouge, core : cœur lipidique, M : media ; depuis Stary, 1992. **B.** Représentation schématique de la lésion de type VI, depuis Stary *et al.*, 1995.

5. Localisation des lésions athéromateuses

Les localisations vasculaires où se développent les lésions athéromateuses conditionnent les manifestations cliniques observées chez le patient. Aussi, ces lésions se développent préférentiellement sur la courbure intérieure des vaisseaux et au point de bifurcation artérielle. Les lésions athéromateuses se développent principalement dans les artères coronaires, cervicales et intracrâniennes, dans l'aorte abdominale et les artères des membres inférieurs.

B. Prévention et traitements des maladies cardiovasculaires : apports et limites

La prise en charge des patients peut être effectuée de manière préventive ou curative : on parle de prévention primaire ou secondaire, respectivement. La prévention primaire s'adresse principalement aux patients à haut risque cardiovasculaire, tel que les patients atteint d'hypercholestérolémie familiale. La prévention secondaire s'adresse aux patients victime d'un accident cardiovasculaire dans le but d'empêcher la récidive. Il est également possible d'agir directement sur les facteurs de risque cardiovasculaire par l'adoption d'un mode de vie « sain », on parle alors de prévention primo-primaire.

1. Prévention primo-primaire et prévention primaire

Au regard des facteurs de risque conditionnant l'apparition des maladies cardiovasculaires, il apparaît clair que l'adoption d'un style de vie « sain » par les populations peut constituer un rempart contre le développement des maladies cardiovasculaires. Bien que peu d'études se soient intéressées à l'impact du mode de vie sur la rémission de pathologies chroniques, de nombreuses études épidémiologiques mettent en évidence que limiter son exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire – l'arrêt de la consommation de tabac, le contrôle du poids, l'activité physique – confère de nombreux avantages sur le plan clinique et doit accompagner toute intervention pharmacologique en prévention primaire, mais également en prévention secondaire (Libby and Everett, 2019). Cependant, l'augmentation de l'incidence de l'obésité et du diabète de type 2 révèle que la prévention des maladies cardiovasculaires par l'intervention sur le mode de vie semble perdre du terrain plutôt que d'en gagner. Il est donc nécessaire d'accentuer la sensibilisation sur les causes des maladies cardiovasculaires, afin de protéger les populations de comportements délétères.

2. Prévention secondaire

a) Traitement médicamenteux

La prévention secondaire s'adresse aux patients ayant déjà présenté une complication cardiovasculaire, ou chez qui une lésion athéromateuse a été identifiée. Son but est de diminuer le risque de récidive de la maladie ou d'apparition d'une complication.

Un traitement médicamenteux est systématiquement préconisé en prévention secondaire après un premier événement cardiovasculaire. Les médicaments antiplaquettaires, tels que l'aspirine ou le clopidogrel, sont essentiels car la plupart des manifestations cliniques de l'athérosclérose résultent d'une fissure ou d'une rupture de la plaque, entrainant une activation plaquettaire et une thrombose. **En outre, le contrôle du niveau des LDL plasmatiques lipides est identifié comme un élément incontournable de la prévention secondaire**. Plus le patient est à risque, plus l'exigence sera grande pour la concentration plasmatique de LDL à ne pas dépasser. Les patients en prévention secondaire étant considérés à très haut risque cardiovasculaire, les dernières recommandations

européennes ont fixé cette concentration maximale à 1,8 mmoL/l contre 4,9 chez une personne sans facteur de risque cardiovasculaire identifié (Piepoli *et al.*, 2016, **Tableau I.7**).

Risque cardiovasculaire (SCORE)	Concentration plasmatique de LDL-cholestérol				
	<70mg/dl <1,8mmol/l	**70 – <100mg/dl 1,8 – <2,6mmol/l**	**100 – <155mg/dl 2,6 – <4,0mmol/l**	**155 – <190mg/dl 4,0 – <4,9mmol/l**	**≥190mg/dl ≥4,9mmol/l**
<1 %	Intervention sur le mode de vie	Intervention sur le mode de vie	Intervention sur le mode de vie	Intervention sur le mode de vie	Intervention sur le mode de vie, traitement si la cholestérolémie est incontrôlée
≥1% – <5%	Intervention sur le mode de vie	Intervention sur le mode de vie	Intervention sur le mode de vie, traitement si la cholestérolémie est incontrôlée	Intervention sur le mode de vie, traitement si la cholestérolémie est incontrôlée	Intervention sur le mode de vie, traitement si la cholestérolémie est incontrôlée
≥ 5% – <10%	Intervention sur le mode de vie	Intervention sur le mode de vie, traitement si la cholestérolémie est incontrôlée	Intervention sur le mode de vie, traitement pour la plupart des patients	Intervention sur le mode de vie et traitement	Intervention sur le mode de vie et traitement
≥10%	Intervention sur le mode de vie, traitement si la cholestérolémie est incontrôlée	Intervention sur le mode de vie et traitement concomitant	Intervention sur le mode de vie et traitement concomitant	Intervention sur le mode de vie et traitement concomitant	Intervention sur le mode de vie et traitement concomitant

Tableau I.7 : Intervention possibles en fonction du taux plasmatique de LDL-cholestérol et du score de risque cardiovasculaire.
Depuis Piepoli *et al.*, 2016.

i) Les hypolipidémiants

Les principaux traitements hypolipidémiants utilisés sont les statines (« gold standard »), suivis par l'*Ézétimibe* et les inhibiteurs de PCSK9.

Les statines

Ce sont des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase, enzyme ubiquitaire impliquée dans la voie de biosynthèse du cholestérol à partir des graisses saturées. La conséquence de cette inhibition est une augmentation des récepteurs aux LDL exprimés à la surface des cellules et, par voie de conséquence, une diminution des LDL circulantes. **Une littérature très dense indique que les statines pourraient réduire la mortalité cardiovasculaire en agissant sur d'autres paramètres que la cholestérolémie**. En effet, il a notamment été démontré que les statines limitent *in vitro* l'acquisition d'un phénotype spumeux par les macrophages et y inhibent l'expression de métalloprotéases matricielles responsables de la rupture de plaque. *In vivo* chez le lapin, elles stabilisent les plaques d'athérosclérose en résorbant le cœur lipidique des plaques et en renforçant leur chape fibreuse. Ces effets, qualifiés de pléiotropes, sont certainement la raison du caractère essentiel des statines en prévention secondaire (Liao and Laufs, 2005). **Cependant, ces médicaments font actuellement l'objet d'une forte polémique**. En France, celle-ci trouve son origine à la parution en 2012 du livre « *guide des 4000 médicaments utiles, inutiles ou dangereux* ». En 2013, la haute autorité de Santé publie les résultats d'une enquête révélant que les statines étaient souvent prescrites à tort en prévention primaire et **pas assez en**

prévention secondaire où leurs bienfaits son pourtant indiscutables (https://www.has-sante.fr/jcms/c_1360516/fr/pour-un-bon-usage-des-statines). Aujourd'hui, patients et praticiens restent divisés (Bradley *et al.*, 2019 ; Nelson, Puri and Nissen, 2020). De façon intéressante, une étude publiée très récemment rapporte que la mauvaise réputation des statines s'insinue même dans l'inconscient collectif car **leurs effets secondaires** (notamment les douleurs musculaires) **résulteraient en grande partie d'un effet nocébo** (Wood *et al.*, 2020).

Les inhibiteurs sélectifs de l'absorption du cholestérol

Ils ne sont généralement pas utilisés en monothérapie pour diminuer les concentrations de LDL-C, sauf si les patients sont intolérants aux statines. Une thérapie d'association avec des statines chez certains patient peut être recommandée lorsque l'objectif n'est pas atteint avec la dose maximale tolérée d'une statine. Cette classe de médicament agit en diminuant l'absorption du cholestérol par le tube digestif, le plus connu est l'*Ézétimibe*.

Les inhibiteurs de la pro-protéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9)

Les inhibiteurs de la PCSK9 sont une récente classe de molécules qui ciblent une protéine impliquée dans le contrôle des LDL-R. Une concentration ou une fonction élevée de la PCSK9 dans le plasma réduit l'expression des LDL-R en favorisant le catabolisme lysosomal des LDL-R. Il en résulte une augmentation de la concentration plasmatiques du LDL-cholestérol. Des études ont montré que l'utilisation des inhibiteurs de PCSK9, en plus des statines, permet de réduire encore davantage le risque de développer un accident cardiovasculaire (Sabatine *et al.*, 2017). Il existe plusieurs types d'inhibiteurs de PCSK9 :

- Les anticorps monoclonaux qui bloquent les protéines PCSK9 circulantes. Deux injections mensuelles sont nécessaires.
- Les ARN interférents qui bloquent la synthèse des protéines PCSK9. Trois essais de phase 3 évaluant le nouvel agent hypolipémiant *Inclisiran* développé par *Alnylam Pharmaceuticals* et *The Medicines Company* ont été publiés en 2020. Ils montrent une diminution de près de 50% du taux de LDL-C chez des patients recevant déjà des statines, avec seulement deux injections en sous-cutanée par an (Ray *et al.*, 2020 ; Raal *et al.*, 2020). La thérapie est actuellement en cours d'évaluation par la FDA (*Food and Drug Administration*). Le coût du traitement étant moindre que les anticorps anti-PCSK9, ces ARN interférents pourraient les remplacer à l'avenir.
- De futurs potentiels vaccins : plusieurs sociétés travaillent sur le développement de vaccins pour avoir une immunité active générant nos propres anticorps anti-PCSK9.

L'acide bempédoïque, une nouvelle molécule approuvée depuis 2020

Esperion Therapeutics, spécialisé dans la mise au point d'hypocholestérolémiants, a annoncé en février et en avril 2020 l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché respectivement par la FDA et l'EMA (*European Medicines Agency*) pour son hypocholestérolémiant oral, inhibiteur de l'ATP-citrate lyase, une enzyme de la voie de

biosynthèse du cholestérol. Il sera disponible en Europe une fois la procédure de remboursement acceptée. Il s'agit de l'acide bempédoïque, commercialisé soit en monothérapie soit en association fixe à l'*Ézétimib*. Il s'adresse à des patients intolérants aux statines.

ii) Cibler plus que l'hypercholestérolémie

Pour de nombreux patients ayant été exposés à toute une vie d'hypercholestérolémie et de dyslipidémie, il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant le ciblage de la plaque afin d'en limiter le développement, ou de favoriser sa stabilisation.

Ainsi, plusieurs stratégies anti-oxydantes ont été développées mais se sont révélées infructueuses. L'inhibition de la LpPLA2 (*lipoprotéine-associated phospholipase A2*), malgré une réduction de la progression des lésions athéromateuses coronariennes chez le cochon modèle d'athérosclérose (Wilensky *et al.*, 2008), n'a permis aucune diminution de la mortalité cardiovasculaire par rapport au groupe placebo dans les essais cliniques réalisés chez l'Homme (STABILITY Investigators *et al.*, 2014 ; O'Donoghue *et al.*, 2014). Des résultats tout aussi infructueux ont été observés avec les traitements à base de vitamines D et E, ou de beta carotène, une mortalité cardiovasculaire plus élevée ayant été suggérée pour des doses élevées de beta-carotène et vitamine E (Bjelakovic, Nikolova and Gluud, 2013a, 2013b ; Manson *et al.*, 2019). Enfin, le succinobucol, un puissant antioxydant, bien qu'il limite l'oxydation des LDL *in vitro*, ne permet pas la diminution de la mortalité cardiovasculaire chez l'Homme (Tardif *et al.*, 2008).

Concernant les stratégies anti-inflammatoires développées pour lutter contre la mortalité cardiovasculaire, l'inhibition de la voie p38 MAPK, impliquée dans le processus inflammatoire, ou le recrutement macrocytaire, ciblé à l'aide d'anticorps anti-P-sélectine, n'ont pas permis de diminuer la mortalité cardiovasculaire par rapport au groupe placébo (O'Donoghue *et al.*, 2016 ; Newby *et al.*, 2014 ; Tardif *et al.*, 2013). Un premier succès de la stratégie anti-inflammatoire repose sur l'utilisation de la colchicine, qui a montré une réduction significative de la récidive d'accidents cardiovasculaires dans une étude clinique suivant les patients pendant 3 ans de traitement. La colchicine induit cependant d'importants problèmes gastriques chez plus de 10% des patients, empêchant donc pour eux la poursuite du traitement (Nidorf *et al.*, 2013). Un tournant dans la stratégie anti-inflammatoire est marqué par l'essai clinique CANTOS, qui rapporte les effets d'un anticorps ciblant l'IL-1β, le *Canakinumab*. En effet, cette étude clinique rapporte une diminution significative de l'incidence des événements cardiovasculaires par rapport au groupe placebo ; l'étude rapporte également une diminution significative de la mortalité par cancer (en particulier par cancer du poumon) dans le groupe traité avec 300mg de *Canakinumab*, suggérant le caractère indispensable de l'inflammation dans ces processus pathologiques. Cependant, les auteurs de l'étude ne rapportent aucune différence de la mortalité toute cause entre le groupe placebo et *Canakinumab*, mais rapportent une augmentation, faible mais significative, du nombre de décès par causes infectieuses par rapport au groupe contrôle, en raison d'une interférence

avec les mécanismes d'immunité essentiels à la défense contre les pathogènes (Ridker *et al.*, 2017).

Les traitements actuels et la réduction des facteurs de risques cardiovasculaires en prévention secondaire ont permis de limiter les complications de l'athérosclérose en impactant directement la composition de la plaque elle-même : passant d'une constitution très inflammée et riche en lipide à une composante plus fibrosante, limitant par conséquent le risque de rupture responsable des accidents cardiovasculaires aigües (Libby *et al.*, 2019).

Malgré des traitements efficaces pour cibler la composante lipidémique de la maladie, il est nécessaire de développer des molécules ciblant spécifiquement le développement de la plaque d'athérosclérose, afin de limiter son développement et permettre sa stabilisation. Les effets des anticorps anti-IL-1β soulignent l'intérêt du ciblage de l'inflammation à ces fins, et ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques pour cibler plus spécifiquement la lésion athéromateuse, sans la contrainte des effets systémiques adverses observés.

b) Traitements chirurgicaux

Lorsque la plaque d'athérosclérose, où le caillot consécutif à sa rupture, engendre une sténose artérielle empêchant l'irrigation des tissus situés en aval de manière suffisante pour en couvrir les besoins physiologiques, plusieurs approches thérapeutiques interventionnelles peuvent être envisagées (Adams *et al.*, 2007).

i) Traitement du caillot

Le traitement d'un caillot peut être effectué par **thrombolyse intraveineuse** ou par **thrombectomie**.

La thrombolyse intraveineuse

La thrombolyse consiste à injecter, par voie intraveineuse, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA, *tissue plasminogen activator*) afin de dissoudre le caillot obstruant une artère cérébrale. Le t-PA induit la conversion du plasminogène inactif en une enzyme protéolytique, la plasmine, qui attaque la fibrine et le fibrinogène présent dans le thrombus, provoquant ainsi la lyse et la dissolution des caillots obstruant l'artère. La thrombolyse n'est pas sans risques : dans 6% des cas, elle peut provoquer une hémorragie intracrânienne. Le rapport bénéfice/risque n'est favorable que si le traitement est réalisé dans les 3 à 4,5 heures après le début de l'attaque cérébrale.

La thrombectomie

Pouvant être effectuée seule, ou en complément de la thrombolyse, la thrombectomie consiste à insérer un cathéter et remonter, par le système artériel, jusqu'au thrombus, qui est extrait par un dispositif de retrait. La technique améliore le pronostic clinique des patients victimes d'un AVC ischémique : 50 à 60% d'entre eux seront autonome après cette intervention, contre 20 à 30% après une thrombolyse intraveineuse seule.

ii) Traitement de la plaque d'athérosclérose.

Dans le cadre du traitement de plaques d'athérosclérose, l'emplacement et le nombre de plaques déterminent l'approche chirurgicale employée. Dans le cas où l'artère lésée est facilement accessible, le chirurgien peut opter pour l'**endartériectomie** ou le **pontage**. En cas de plaque unique logée dans des artères difficiles d'accès, telles que les artères coronaires, ou dans l'artère fémorale, l'**angioplastie percutanée** est privilégiée.

L'endartériectomie

Cette technique chirurgicale consiste à retirer la plaque à l'origine de la sténose artérielle. Elle est généralement effectuée pour traiter une artère carotide sténosée. Effectuée dans les jours ou les semaines qui suivent la survenue d'un AVC ischémique, l'endartériectomie a pour but d'éviter la récidive de l'AVC.

Le pontage

Cette technique est privilégiée par le cardiologue interventionnel en cas de lésions multiples au niveau d'artères facilement accessibles. Elle consiste à rétablir la circulation sanguine en contournant la région artérielle lésée à l'aide d'un tube synthétique ou d'un vaisseau sanguin prélevé sur le patient.

L'angioplastie percutanée

Elle est la technique principalement employée pour permettre la revascularisation des tissus. Effectuée sous contrôle radiologique, cette approche chirurgicale non invasive consiste à introduire, dans le réseau artériel, un cathéter muni d'un ballonnet gonflé au niveau de la lésion athéromateuse afin d'écraser la paroi artérielle remodelée, dans le but de rétablir le flux sanguin. De nos jours, l'angioplastie est systématiquement accompagnée de la pose d'une endoprotèse, ou « stent », jouant le rôle de tuteur afin de maintenir l'artère ouverte (**Figure I.25**).

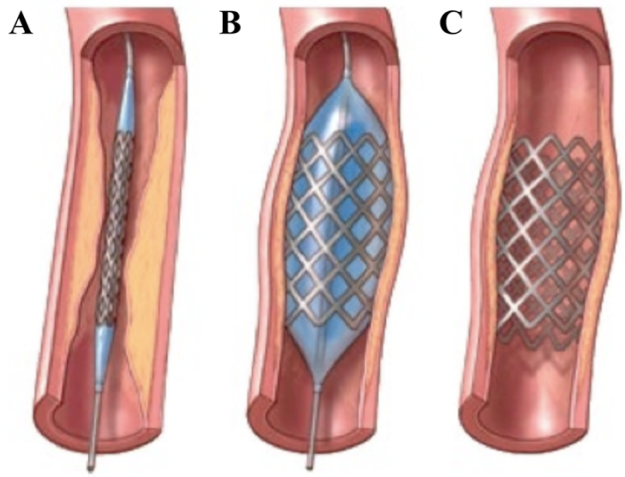


Figure I.25 : L'angioplastie percutanée.
A. un cathéter muni d'un ballonnet gonflable est introduit dans l'artère athérosclérosée. **B.** Le ballonnet est gonflé afin de réduire la sténose en écrasant la plaque d'athérosclérose contre la paroi **C.** Une endoprothèse métallique est déployée contre la paroi de l'artère lors du gonflement du stent, elle permet de limiter les risques de re-sténose précoce.

C. La re-sténose post-angioplastie

L'angioplastie se heurte cependant au phénomène de re-sténose post-angioplastie, caractérisé par le re-rétrécissement de la lumière artérielle. Avant l'implantation de stents, la re-sténose post-angioplastie était observée chez 32 à 42,1% dans les 6 mois suivant l'intervention. L'angioplastie avec pose de stent, introduite en 1986 à Toulouse par les Pr. Sigart et Patel (Sigwart *et al.*, 1987), a permis de faire diminuer ce chiffre entre 22 et 31,6% (Serruys *et al.*, 1994 ; Fischman *et al.*, 1994 et **Figure I.26**).

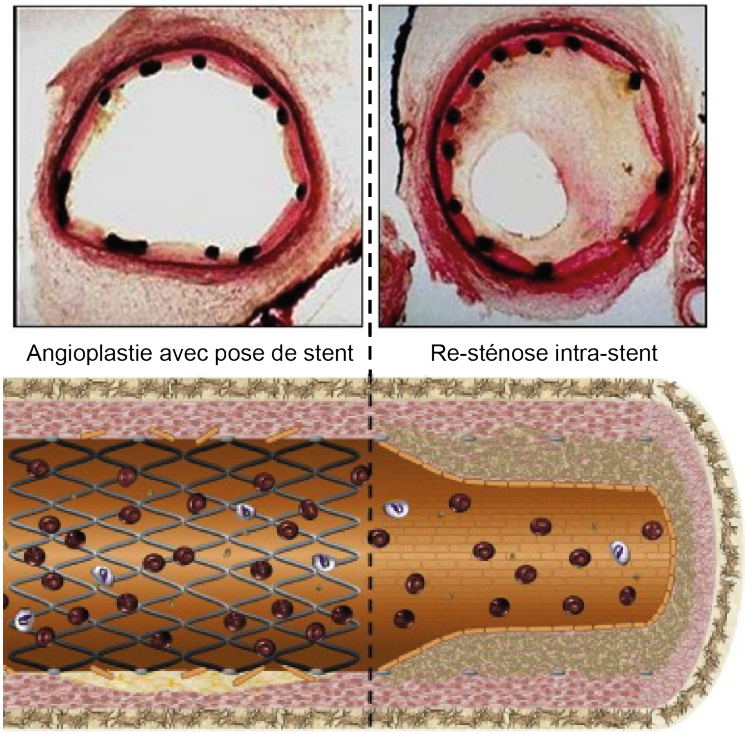


Figure I.26 : La re-sténose post-angioplastie.
Sections (haut) et représentation schématique (bas) d'une artère immédiatement (gauche) et 6 mois (droite) après implantation d'un stent. Modifié depuis Simard *et al.*, 2014.

1. Causes de la re-sténose post-angioplastie

La resténose post-angioplastie résulte principalement d'une hyperplasie néo-intimale des CMLV, conséquence de la réaction inflammatoire de l'endothélium vasculaire provoquée par la chirurgie. En effet, l'endothélium, agressé par la procédure chirurgicale, produit des facteurs pro-inflammatoires et des facteurs de croissance responsables de la trans-différenciation des CMLV. En réponse, celles-ci acquièrent les capacités de migrer dans l'intima, de proliférer et de synthétiser des composants matriciels, formant ainsi une néo-intima pouvant conduire au phénomène de re-sténose (Ferns and Avades, 2000 ; Marx, Totary-Jain and Marks, 2011 ; O' Brien *et al.*, 2011). La transition phénotypique des CMLV au cours de la re-sténose post-angioplastie semble être un processus réversible. En effet, chez le rat blessé par angioplastie au ballonnet, un rétablissement du niveau d'expression des protéines contractiles – *dont le niveau diminue au cours de la formation de l'hyperplasie néo-intimale* – est observé lorsque le remodelage vasculaire est achevé (Kocher *et al.*, 1991).

2. *Les stents actifs : apports et limites*

Pour pallier au phénomène de re-sténose post-angioplastie, des stent actifs délivrant des molécules antiprolifératives ont été développées. Ceux-ci sont constitués d'un support métallique en Cobalt-Chrome enduit d'un polymère chargé de retenir et libérer la drogue dans la paroi artérielle avec laquelle il est en contact. La drogue correspond à des molécules anti-prolifératives chargées de limiter la formation du tissu cicatriciel néo-intimal.

Le premier stent actif, éluant du *sirolimus*, est proposé en 2002 au travers d'un essai clinique concluant à son efficacité, permettant son utilisation massive à travers le monde (Morice *et al.*, 2002). Un stent actif éluant du *paclitaxel* est proposé l'année suivante (Hong *et al.*, 2003 ; Grube *et al.*, 2003 ; Tanabe *et al.*, 2003). Cependant, à partir de 2006, le succès des stents actifs est entaché par la description de phénomènes tardifs de thrombose intra-stent. Les molécules antiprolifératives du stent, bien qu'elles limitent l'hyperplasie néo-intimale en inhibant la prolifération des CML, exercent également un effet adverse sur la régénération de l'endothélium du fait qu'elles inhibent aussi la prolifération des cellules endothéliales et l'inflammation. Il en résulte un environnement pro-thrombotique initié par la sécrétion de facteur tissulaire par les cellules endothéliales (Camenzind, 2006 ; Lüscher *et al.*, 2007).

Pour limiter les complications résultant de l'implantation des stents actifs de première génération, une seconde génération de stent a été développée à partir des années 2010. Celle-ci est caractérisée par une réduction de l'épaisseur du stent, améliorant ainsi sa flexibilité et son adhérence à la paroi vasculaire. La biocompatibilité du polymère est augmentée permettant aussi d'optimiser l'élution des drogues. Certains polymères développés sont même biodégradables. Les stents de seconde génération montrent ainsi une cinétique de ré-endothélialisation bien supérieure aux stents de première génération (Simard *et al.*, 2014). Néanmoins, l'efficacité de cette seconde génération de stent actifs (composée ou non d'un polymère biodégradable) sur la diminution des thromboses très tardive est remise en question par la publication d'une étude clinique au long-court en 2015, révélant que ces stents ne permettraient pas de diminuer les phénomènes de thrombose intra-stent tardifs (Kaiser *et al.*, 2015).

Une solution aux complications associées à la pose de stent pourrait émerger du développement des stents bioabsorbables. Des stents bioabsorbables métalliques sont actuellement en cours de développement au sein d'un laboratoire allemand. Le premier modèle, proposé en 2013 et composé à 93% de magnésium et à 7% de métaux rares, a des propriétés structurales similaires aux stents Cobalt-Chrome, mais se dégrade dans les 60 jours en sels inorganiques. Il n'engendre aucun accident cardiovasculaire et permet une importante revascularisation des tissus cibles (Campos *et al.*, 2013 ; Bouchi and Gogas, 2015). La génération suivante de stents bioabsorbables, éluant du paclitaxel montre, comme la génération précédente, une absence de remodelage vasculaire pathologique 12 mois après implantation (Haude *et al.*, 2016).

Malgré des progrès sur les polymères biodégradables et les stent bioabsorbables, la seconde génération de stent actifs métalliques reste la plus utilisée lors des angioplasties percutanées. Afin de limiter les risques de thrombose intra-stent résultant de l'utilisation des stent actifs, les patients sont placés sous traitement antiplaquettaire de longue durée, ce qui présente l'inconvénient majeur de les rendre incompatibles avec toute procédure chirurgicale en raison des risques hémorragiques encourus. Par conséquent, un des enjeux majeurs de la cardiologie interventionnelle est la mise au point de stents actifs libérant des drogues ciblant spécifiquement les CMLV trans-différenciées impliquées dans le phénomène de re-sténose, sans altérer la ré-endothélialisation impactée par les antiprolifératifs actuels (Kalra *et al.*, 2017).

D. Une approche thérapeutique de plus en plus répandue : les peptides interférents

Les interactions protéine-protéine sont impliquées dans tous les processus cellulaires. L'interactome humain contiendrait entre 130 000 et 660 000 interactions protéine-protéine (Venkatesan *et al.*, 2009 ; Stumpf *et al.*, 2008). **Des interactions inappropriées voire manquantes ont été associées à diverses pathologies. Pour empêcher l'effet potentiellement pathologique d'interactions inappropriées, une stratégie est d'empêcher qu'elles se produisent.** L'utilisation de petites molécules thérapeutiques est rendue difficile du fait que les interactions protéine-protéine s'effectuent *via* des « points chauds »[10] répartis sur une surface comprise entre 1500 à 3000 Å^2 (Arkin and Wells, 2004 ; Lo Conte, Chothia and Janin, 1999). **La solution la plus adaptée serait donc l'utilisation de peptides interférents** (**Figure I.27**). Ces peptides peuvent être identifiés à partir d'une banque, ou générés sur la base de peptides naturels, ou des motifs de l'interface protéine-protéine (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018).

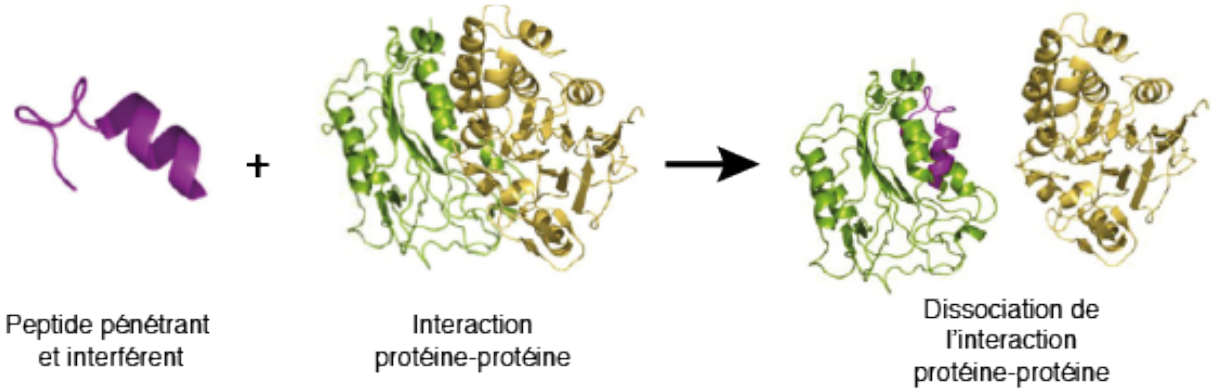


Figure I.27 : Représentation schématique de l'effet d'un peptide interférent ciblant une interaction protéine-protéine.
D'après Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018.

[10] Points chauds : ce sont des régions compactes d'acides aminés cruciaux pour l'interaction protéine-protéine localisés sur chacun des partenaires et hautement complémentaires.

1. *Conception de peptides interférents correspondant aux motifs de l'interface protéine-protéine*

Pour identifier les séquences peptidiques impliquées dans l'interaction protéine-protéine à cibler**,** Il existe plusieurs approches. Le choix dépend des connaissances disponibles sur *i)* la structure tridimensionnelle du complexe protéine-protéine et/ou, *ii)* la structure tridimensionnelle de chaque protéine du complexe.

a) Conception rationnelle des peptides interférents

La structure tridimensionnelle des complexes protéine-protéine peut être élucidée par cristallographie aux rayons X ou par cryo-microscopie électronique (cryo-EM), ou encore par résonnance magnétique nucléaire pour les protéines dont l'interaction est inductible et fugace (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018 ; Takeuchi and Wagner, 2006). En 2017, 8096 structures de complexes protéine-protéine, impliquant 12936 protéines, étaient déjà disponibles sur la banque de données « *Protein Data Bank* ». L'analyse bioinformatique de la structure tridimensionnelle des complexes permet de déterminer les régions hélicales (Bullock, Jochim and Arora, 2011) impliqués dans – et les « points chauds » de – l'interface protéine-protéine.

Quand la structure tridimensionnelle du complexe protéine-protéine est inconnue, mais que la structure des partenaires est disponible, plusieurs approches *in silico* permettent de proposer, à basse ou moyenne résolution, **des régions potentiellement impliquées dans l'interaction entre les deux protéines**. Parmi ces approches, on trouve la simulation d'amarrage[11] de protéines, appelée « stratégie d'amarrage des corps libres rigides » (*free-rigid body docking strategy*). Les interactions sont ainsi simulées sur la base de la complémentarité entre les protéines du complexe en termes de structure, de l'énergie nécessaire à la désolvation[12] ou de forces électrostatiques (**Figure I.28A**). Les interactions peuvent également être modélisées sur la base d'homologies de séquence et/ou de structure par comparaison à des bibliothèques de modèles de complexes protéine-protéine (**Figure I.28B**) (Szilagyi and Zhang, 2014). Le serveur InterEvDock a récemment été proposé par Yu et ses collaborateurs. Celui-ci propose une ré-analyse « co-évolutionnaire » des structures de complexes établies par la stratégie d'amarrage des corps libres rigides en intégrant la structure de protéines homologues aux partenaires d'interaction (Yu *et al.*, 2016 ; Quignot *et al.*, 2018). Elle correspond donc à une approche conjointe des deux méthodologies présentées en **Figure I.28**.

[11] Dans le domaine de la modélisation moléculaire, l'**amarrage** (en anglais, *docking*) une méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable.
[12] Énergie de désolvation : énergie nécessaire pour la transition de la liaison protéine-solvant à la liaison protéine-protéine

Le développement de nouveaux modules dans le logiciel de modélisation *Rosetta* permet de proposer *i)* des fragments peptidiques qui miment l'interaction protéine-protéine (*LoopFinder*, Gavenonis *et al.*, 2014) et *ii)* des peptides linéaires et/ou cycliques bloquant l'interaction entre deux protéines (*PeptiDerive*, Sedan *et al.*, 2016). *In fine*, la solidité des résultats obtenus in silico est toujours évalués expérimentalement *in vitro*, *ex vivo* voire *in vivo*.

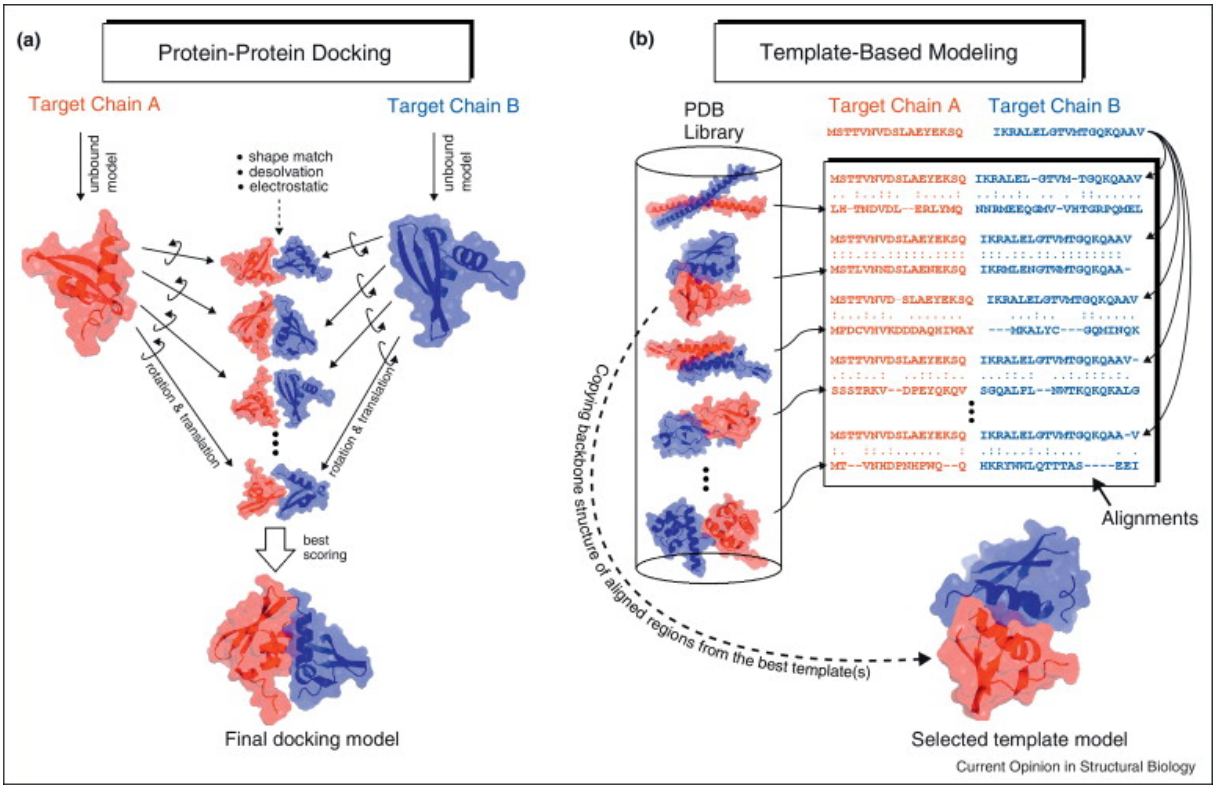


Figure I.28 : Les deux approches principales pour prédire le complexe protéine-protéine *in silico*.
Les protéines rouge et bleue représentent deux chaines polypeptidiques individuelles. **A.** Stratégie « d'amarrage des corps libres rigides ». Amarrage des deux structures connues ou modélisées dans leur état non liée. Le modèle sélectionné est celui présentant la meilleure complémentarité de structure, de forces électrostatiques et avec l'énergie de désolvation la plus faible. **B.** Modélisation basée sur l'homologie de séquence et/ou de structure avec des protéines appartenant à des bibliothèques de modèles de structures. Dans le cas d'un alignement basé sur la séquence, le modèle proposant le meilleur score d'alignement est sélectionné, et la structure des régions alignées est utilisée comme référence pour construire le modèle du complexe cible. Il existe plusieurs protocoles de modélisation basée sur les homologies, ils peuvent être centrée uniquement sur la séquence ou sur la structure. Depuis Szilagyi and Zhang, 2014.

b) *Approches en l'absence de structure tridimensionnelle des protéines formant le complexe*

En l'absence de structure tridimensionnelle des protéines du complexe, des peptides issus de banques de peptides sont criblés à haut débit sur la base de leur efficacité dans des tests cellulaires **pertinents et rapides.** Les peptides candidats sont ensuite évalués pour leur capacité à moduler *in vitro* les processus cellulaires sous le contrôle du complexe ciblé. Une alternative à cette technique sans *a priori* **est celle du PEPscan qui se base sur une procédure de cartographie et de caractérisation d'épitopes, et s'appuie** sur le fait que les structures

primaires des peptides interférant ressemblent souvent à la structure primaire du partenaire naturel en interaction avec la protéine cible (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018). La technique du PEPscan est décrite dans la partie Matériel et méthodes du manuscrit.

Cette approche peut être complétée par *de la mutagenèse in vitro, qui introduit des* ***délétions****, des insertions ou des remplacements ponctuels de bases. Grâce à cette approche* de mutagenèse, Hasbi et ses collaborateurs ont d'ailleurs identifié sur le récepteur à la dopamine D1, la région impliquée dans la dimérisation avec le récepteur D2, et conçu un peptide capable de bloquer spécifiquement la formation du dimère D1-D2 (Hasbi *et al.*, 2014).

2. Ciblage de l'interaction protéine-protéine intracellulaire : apport des séquences « cargo ».

Le développement des peptides est cependant limité par les propriétés intrinsèques des peptides : administration, stabilité et biodisponibilité (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018). **Aussi, le développement de séquences « cargo », permettant le passage des membranes cellulaires, a permis le ciblage des interactions protéine-protéine intracellulaires, et a ouvert de nouvelles perspectives pour l'adressage des peptides vers des compartiments cellulaires spécifiques**. La première description d'une protéine capable de traverser la bicouche lipidique fut rapportée en décembre 1988 par deux équipes différentes, mettant en évidence que la protéine Tat (*trans-activating protein*) du VIH est capable d'entrer dans la cellule jusqu'au noyau cellulaire (Green and Loewenstein, 1988 ; Frankel and Pabo, 1988). L'identification d'autres protéines capables de traverser la bicouche lipidique, et l'élucidation des séquences peptidiques à l'origine de cette propriété, ont permis le développement du domaine des peptides pénétrants et l'augmentation rapide du nombre de ces peptides.

Il existe aujourd'hui une grande variété de peptides pénétrants qui diffèrent par leur composition en acides aminés et leur degré de polarité. Ils peuvent directement franchir la bicouche lipidique ou être internalisés par endocytose, auquel cas, ils doivent être capable de sortir des endosomes pour exercer leur effet biologique.

Les peptides pénétrants peuvent être divisés en 3 classes selon leur propriétés physicochimiques : cationiques, amphipathiques et hydrophobes (Cerrato, Künnapuu and Langel, 2017).

- **Les peptides pénétrants cationiques** contiennent des groupements d'acides aminés chargés positivement, principalement composés d'arginine et de lysine, essentiels pour leur entrée dans la cellule. La liaison à la membrane résulte des interactions électrostatiques entre le peptide chargé positivement et les constituants membranaires chargés négativement. Cependant, l'augmentation de la composition en arginine augmente la pénétration du peptide dans la cellule mais également sa toxicité. Les peptides polyarginine montrent une capacité de pénétration supérieure aux peptides polylysine (Tünnemann *et al.*, 2008).
- **Les peptides pénétrants amphipathiques** sont composés de groupements composés d'acides aminés hydrophiles chargés positivement (lysine et/ou d'arginine) et de groupements d'acides aminés hydrophobes (leucine, alanine, valine). Ils se lient aux

composés lipidiques neutres et anioniques de la membrane plasmique. Certains peptides pénétrants amphipathiques sont constitués par une structure secondaire en hélice-α et feuillets-β où les résidus polaires sont regroupés sur les faces de la structure. Ils ont une affinité plus élevée pour les lipides anioniques de la membrane plasmique que pour les lipides neutres.

- **Les peptides pénétrants hydrophobes** contiennent uniquement des résidus apolaires et peuvent directement traverser la membrane plasmique. Ces peptides présentent l'avantage d'éliminer le risque d'emprisonnement endosomal que présentent les autres peptides pénétrants.

Les séquences cargo peuvent également être utilisées pour la délivrance d'agents thérapeutiques. En effet, les composés pharmacologiquement actifs chargés ou polaires sont incapables de passer les membranes cellulaires et, par conséquent, n'ont que très peu ou aucune biodisponibilité. La liaison de ces molécules à des séquences cargo sont donc une approche pour leur permettre le passage des membranes cellulaires afin d'exercer leur effet biologique.

En outre, la séquence cargo conditionne la pénétrance du peptide dans la cellule. Les travaux publiés par Patel et ses collaborateurs mettent en évidence, par l'analyse de plusieurs motifs de pénétration cellulaire – Pénétratine[13], R8[14], TAT[15], Transportan[16], Xentry[17] –, que celui couplé à une protéine eGFP module l'intensité de fluorescence mesurée dans la cellule. La pénétration cellulaire de la eGFP est très élevée lorsqu'elle est couplée à R8 et Transportane, plus faible lorsqu'elle est couplée TAT et la Penetratin, et très faible lorsqu'elle est couplée avec Xentry. Par ailleurs, la pénétration cellulaire des peptides est fonction du type cellulaire analysé. En effet, le traitement de cellules HeLa, HEK, 10T1/2, HepG2, montre que la pénétration cellulaire dans les cellules 10T1/2 est 3 fois plus élevée que dans les cellules HepG2, l'intensité de fluorescence mesurée est plus faible dans les lignées HeLa et HEK, avec une pénétration cellulaire 4,3 à 5,3 fois plus faible que dans les cellules 10T1/2, respectivement (**Figure I.29**). La cyclisation des peptides pénétrant renforce également la pénétration cellulaire (Patel *et al.*, 2019). L'analyse de 474 séquences de pénétration cellulaire, réalisée par cytométrie en flux après 2h d'incubation avec 10µM de peptide cargo-carboxyfluoresceine met en évidence les 20 cargo les plus pénétrants dans la lignée de cellules HeLa. Parmi ces 20 cargo les plus pénétrants, 19 sont amphipathiques. La pénétration cellulaire du cargo est positivement corrélée au nombre de résidus chargés positivement qui le composent (Ramaker *et al.*, 2018).

[13] Pénétratine : RQIKIWFQNRRMKWKKGG, dérivé de la troisième hélice de l'hémoprotéine antennapedia de la Drosophile.
[14] R8 : RRRRRRRR, peptide synthétique.
[15] TAT : YGRKKRRQRRR, issu de la protéine Tat du VIH.
[16] Transportane : GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL, cargo chimérique composé de 12 acides aminés de l'extremité N-terminale du neuropeptide Galanine et les 14 acides aminés de la mastoparane, une toxine du venin de la guêpe.
[17] Xentry : LCLRPVG, dérivé de la région N-terminale de la protéine X du virus de l'hépatite B.

	HeLa	HEK	10T1/2	HepG2
Cell Only[b]	6 ± 0	5 ± 1	15 ± 3	5 ± 1
No CPP	14 ± 4	9 ± 0	31 ± 1	9 ± 1
Penetratin	55 ± 5	40 ± 2	237 ± 40	74 ± 19
R8	95 ± 28	72 ± 4	358 ± 69	116 ± 17
TAT	51 ± 3	45 ± 1	235 ± 35	76 ± 14
Transportan	89 ± 12	93 ± 17	171 ± 6	959 ± 227
Xentry	27 ± 2	16 ± 1	57 ± 10	43 ± 19

Figure I.29 : Quantification de la pénétration cellulaire de protéines de fusion GFP-cargo. Les cellules ont été traitée avec 10µM de eGFP-cargo pendant 1h à 37°C puis analysées par cytométrie en flux. Moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. Depuis Patel *et al.*, 2019.

Cependant, la pénétrance du peptide n'est pas le seul paramètre à prendre en compte dans le choix de la séquence cargo. En effet, **la résistance du peptide envers les peptidases (stabilité) est un élément déterminant de l'efficacité thérapeutique du peptide**. Des expériences réalisées sur le cargo DPT (Arrouss *et al.*, 2013) révèlent que la modification d'un seul acide aminé du cargo peut modifier sa stabilité. La quantité de (Mut1-)DPT (VKKKKI**K**KEIK) diminue de 60% après 24h dans du sérum murin. Le mutant Mut2-DPT (VKKKKI**N**KEIK) présente une stabilité identique à Mut1-DPT, mais Mut3-DPT (VKKKKI**A**KEIK) se révèle être bien plus stable, avec uniquement 20% de diminution de sa quantité après 24h dans le sérum (Fominaya *et al.*, 2015).

Le compromis entre pénétrance et stabilité détermine donc le choix de la séquence cargo. Aussi, le développement d'un peptide interférent implique nécessairement son optimisation *via* l'analyse de plusieurs séquences cargo, de sa stabilité, voire l'optimisation de la séquence d'interaction.

L'adressage des peptides à un compartiment cellulaire spécifique peur s'avérer nécessaire à leur effet thérapeutique. Des peptides pénétrants modifiés ont été développés afin d'assurer la délivrance d'agents thérapeutiques dans certains organelles spécifiques : noyau, lysosome, mitochondries, Golgi, réticulum endoplasmique. L'adressage de peptides vers un compartiment cellulaire spécifique nécessite l'addition des séquences d'adressage *ad hoc* : *i)* NLS (*nuclear location signal*) pour le ciblage nucléaire ; *ii)* LSP pour le ciblage lysosomal ; *iii)* mMDH (*mitochondrial malate deshydrogenase signal sequence*) pour le ciblage mitochondrial ; *iv)* un motif de rétention au réticulum KDEL pour le ciblage du réticulum endoplasmique (Cerrato, Künnapuu and Langel, 2017).

3. Les peptides : une position croissante sur le marché pharmaceutique

La place des peptides est croissante dans le domaine de l'industrie pharmaceutique. Chaque année, près de 20 nouveaux essais cliniques sur des peptides sont initiés. Plus de 400 peptides sont actuellement en cours d'essais cliniques, et une soixantaine ont été autorisés sur le marché aux États-Unis, en Europe et au Japon (Lee *et al.*, 2019). Aussi, on peut dire que **l'utilisation thérapeutique des peptides est efficace, sûre et bien tolérée par les patients**. Les progrès dans le domaine des peptides ont permis de leur administration par voie orale. Le développement de nouveaux modes d'administration permettra un usage localisé des peptides, ouvrant leur utilisation dans le traitement de nombreuses pathologies, notamment les pathologies inflammatoires (Fosgerau and Hoffmann, 2015).

III. La signalisation AMPc dans les cellules musculaires lisses vasculaires

A. Isoformes d'adenylyl cyclase exprimées dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Les premières études sur les isoformes d'AC exprimées dans les CMLV remontent à la fin des années 1990. Les travaux de l'équipe du Professeur Lanier ont mis en évidence, par détection des transcrits, l'expression des AC3, -4, -5, -6 et -8 dans des cultures primaires de CMLV de rat et des AC3, -5 et -6 dans la lignée de CMLV A7r5 (J. Zhang *et al.*, 1997 ; Webb *et al.*, 2001). Les travaux d'Ostrom et ses collaborateurs, publiés l'année suivante, confirment l'expression, au niveau protéique, des AC3, -5 et 6 dans des cultures primaires CMLV de rat (Ostrom *et al.*, 2002). Les isoformes d'AC, leur niveau d'expression et leur localisation subcellulaire ont été analysés dans différents types de CMLV dans différents modèles (**Tableau I.8**).

Isoforme	Type de CML	Espèce	Spécifications	Référence
AC3	Culture primaire de CML thoracique	Rat	Première isoforme identifiée dans les CML	J. Zhang *et al.*, 1997
AC3, AC4*, AC5, AC6, AC8*	Culture primaire de CML aortique et lignée A7r5	Rat	*Ne sont pas présents dans la lignée A7r5	Webb *et al.*, 2001
AC3, AC5, AC6	Culture primaire de CML aortique	Rat	Montre l'expression des AC au niveau protéique	Ostrom *et al.*, 2002
AC1, AC3, AC4, AC5, AC6, AC7, AC9.	Culture primaire de CML des voies respiratoires ; explants trachéaux	Homme	Rôle prédominant de l'AC5	Xu *et al.*, 2001
AC1 à AC8	CMLV d'artères pulmonaires	Rat	AC2, AC3, et AC5/6 sont prédominantes	Jourdan *et al.*, 2001
AC2, AC4, AC6	CML bronchiques	Homme	Localisations dans des micro-domaines distincts	Bogard, Adris and Ostrom, 2012

Tableau I.8 : Profil d'expression des isoformes d'AC dans divers types de CML.
NB : la majorité de ces études ont été réalisées sur des CML différenciées.

B. Effets de la signalisation AMPc dans les cellules musculaires lisses

Les différentes isoformes d'AC seraient impliquées dans des réponses aux molécules messagères et processus cellulaires distincts. L'activation des AC3 et -5 seraient respectivement impliquées dans la régulation négative et positive de la prolifération cellulaire (Wong *et al.*, 2001 ; Ivanov *et al.*, 2006). L'AC6 participerait à la réorganisation du cytosquelette qui sous-tend la relaxation des CMLV (Gros *et al.*, 2006). L'AC3 serait l'unique AC des CMLV impliquée dans la réponse à la PGE_2 (Wong *et al.*, 2001). La relaxation des CMLV en réponse à une stimulation β-adrénergique est principalement consécutive à l'activation de AC6, peu de l'AC3, et pas du tout de l'AC5 (Nelson *et al.*, 2011). L'AC6 induit un épaississement intimal du canal artériel médié par le hyaluronane, tandis que l'AC2 inhibe la production de hyaluronane induite par l'AC6 (Yokoyama *et al.*, 2010). La surexpression et l'activation de

l'AC2, mais pas celles des AC3 et AC6, augmente la production d'interleukine (IL)-6, définissant une signalisation compartimentée régulant la production d'IL-6 (Bogard, Birg and Ostrom, 2014). Bogard et ses collaborateurs suggèrent, au regard de leurs résultats et de ceux présentés dans les autres études citées, qu'**un changement dans les populations d'AC exprimées dans les CML pourrait être à l'origine d'une reconfiguration des cascades de signalisation AMPc qui modifierait les réponses des CMLV à leur environnement**. En accord avec cette idée, *i)* l'intégration de signaux excitateurs et inhibiteurs est modifiée en fonction de la population d'isoformes d'AC exprimées dans les cellules dérivées de CML de canal déférent de hamster (DDT1-MF2, Marjamaki *et al.*, 1997) ; *ii)* une différence d'isoformes d'AC sensibles au Ca^{2+} entre deux types de CML est déterminant pour l'effet de la vasopressine sur la production d'AMPc stimulée par l'isoprotérénol (Webb *et al.*, 2001).

La signalisation induite par l'AMPc, connue pour son implication majeure dans la régulation de la contraction des CML différenciées, module également leur processus de trans-différenciation. Toutefois, au regard de la littérature, le rôle de l'AMPc dans ce processus demeure ambigu, voire même contradictoire.

Les résultats de Fetalvero et ses collaborateurs révèlent que l'AMPc produit en réponse à une stimulation à l'Iloprost[18], et le 8-bromo-cAMP[19], favorisent l'expression des marqueurs contractiles et de différenciation des CMLV (SM-MHC, SMα-actine, calponine, *h*-caldesmone ; Fetalvero *et al.*, 2006). En revanche, d'autres études montrent une diminution de l'expression de la tropomyosine, de l'α-actine et de l'organisation de ses filaments, à l'origine du phénotype étoilé des CMLV (Pelletier *et al.*, 2005 ; Ohara *et al.*, 1991).

Concernant phénotype inflammatoire des CMLV, Newman et ses collaborateurs rapportent que la production d'AMPc en réponse à la forskoline, ou le 8-bromo-cAMP, diminuent la sécrétion de TNFα et d'IL-6 de CMLV d'artères coronaires et de veines saphènes, respectivement (Newman *et al.*, 1998, 2003). De façon similaire, Chatterjee et ses collaborateurs mettent en évidence que, dans des cultures primaires de CMLV de veines saphènes humaines, la maserine 1[20] diminue l'expression de molécules d'adhésion, sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires en diminuant l'activité de la voie NF-κB et augmentant la concentration cytosolique en AMPc (Chatterjee *et al.*, 2014). A l'inverse, les travaux d'Antonio et ses collaborateurs démontrent que l'AMPc exerce un effet synergique avec l'IL-1β sur l'activité du promoteur de la phospholipase A2, favorisant ainsi le phénotype inflammatoire des CMLV dans des cultures primaires de CMLV d'aorte de rat (Antonio *et al.*, 2002).

Concernant l'apoptose des CMLV, les travaux de Li et ses collaborateurs rapportent que l'AMPc, produit en réponse à une stimulation à l'Iloprost, initie l'apoptose des CMLV d'aorte de rat *via* l'inhibition de la voie ERK (Li *et al.*, 2004). Pourtant, les travaux d'Orlov et ses collaborateurs font état du fait que l'AMPc produit en réponse à la forskoline, l'adénine ou l'isoprotérénol, et le 8-bromo-cAMP, inhibent l'apoptose des CMLV induite par la protéine

[18] Iloprost : agoniste du récepteur à la prostacycline.
[19] 8-bromo-cAMP : analogue non hydrolysable de l'AMPc.
[20] Maserine 1 : médiateur lipidique anti-inflammatoire de la famille des résolvines.

E1A (Orlov *et al.*, 1999). Ces résultats sont d'ailleurs confortés par les travaux de Taurin et ses collaborateurs publiés l'année suivante (Taurin *et al.*, 2002).

A ce jour, une seule étude suggère un rôle protecteur de la signalisation AMPc sur **l'acquisition du phénotype spumeux.** Celle-ci met en lumière que l'internalisation du cholestérol induite par les radicaux libres s'accompagne d'une inhibition de la synthèse d'AMPc (Gesquière, Loreau and Blache, 2000).

Au travers de la littérature, le rôle de la signalisation AMPc dans l'inhibition des propriétés migratoires et prolifératives des CMLV, tant *in vitro* et qu'*in vivo*, chez le rongeur et chez l'Homme est bien documenté.

En effet, **le rôle anti-migratoire de l'AMPc** est mis en avant par les travaux publiés par Palmer et ses collaborateurs, qui rapporte que l'AMPc produit en réponse à la forkoline inhibe la migration des CMLV de rat induite par le PDGF, et que cette inhibition est potentialisée par l'inhibition sélective des PDE3 et -4 (Palmer, Tsoi and Maurice, 1998). Ce résultat contraste avec les travaux de Dronadula et ses collaborateurs, qui présentent que l'extinction de CREB inhibe la migration des CMLV induite par l'acide arachidonique (Dronadula *et al.*, 2006). Toutefois, les travaux d'Ono et ses collaborateurs rapportent que la migration CREB-dépendante induite par le TNFα résulte de l'activation de la voie p38-MAPK, et n'implique aucunement la voie AMPc (Ono *et al.*, 2004). Récemment, McKean et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'AMPc produit en réponse à un traitement beraprost[21] inhibe la migration des CMLV de la veine cave humaine en activant Epac (McKean *et al.*, 2015).

Concernant le rôle antiprolifératif de l'AMPc, les travaux de Vadiveloo et ses collaborateurs démontrent que le 8-bromo-cAMP inhibe la prolifération des CMLV *via* l'activation de la PKA (Vadiveloo *et al.*, 1997). Ils sont appuyés par *i)* Indolfi et ses collaborateurs, qui publient des résultats similaires avec le 8-chloro-cAMP (Indolfi *et al.*, 2000) ; et *ii)* d'autres auteurs dont les études utilisent des inhibiteurs sélectifs de la PDE3 (Hayashi *et al.*, 2000 ; Begum, Hockman and Manganiello, 2011). Par ailleurs, la prolifération des CMLV induite par l'hypoxie est associée à une diminution de l'activité de CREB (Klemm *et al.*, 2001), ce qui est en accord avec le fait que la surexpression d'une protéine CREB mutée empêche l'effet antiprolifératif de l'AMPc (Kamiya *et al.*, 2007). On notera toutefois que les résultats sur CREB contrastent avec plusieurs études qui montrent l'implication de CREB dans les capacités prolifératives des CMLV (Tokunou *et al.*, 2001 ; Funakoshi *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2007). Plus récemment, Hewer et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'inhibition de la prolifération des CMLV par l'AMPc résulte d'un effet synergique de deux de ses effecteurs : la PKA et Epac (Hewer *et al.*, 2011). Toutefois, ce résultat s'oppose aux conclusions des travaux publiés par Yokoyama et ses collaborateurs où l'activation sélective d'Epac par traitement au 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP[22] favorise la migration des CML du canal artériel, inhibée par l'extinction d'Epac1 (Yokoyama *et al.*, 2008).

[21] Beraprost : analogue de la prostacycline
[22] 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP : analogue de l'AMPc, activateur spécifique d'Epac.

L'inhibition des capacités migratoires et prolifératives des CMLV par la signalisation AMPc se traduit *in vivo* par la diminution de l'hyperplasie intimale chez le rongeur et la re-sténose post-angioplastie chez l'Homme. En effet, l'extinction génique ou l'invalidation pharmacologique de la PDE1C – *dont l'expression augmente dans les CMLV trans-différenciées par rapport aux CMLV contractiles* – chez la souris réduit la sténose carotidienne résultant d'une ligature artérielle (Cai *et al.*, 2015). Par ailleurs, le 8-chloro-cAMP (Indolfi *et al.*, 2000), l'inhibition de la PDE3 par le cilostamide (Inoue *et al.*, 2000) et l'invalidation du transporteur MRP4[23] – *dont l'expression augmente dans au cours de la formation de l'hyperplasie néo-intimale* – (Sassi *et al.*, 2008) limitent l'hyperplasie néo-intimale chez le rat blessé par angioplastie au ballonnet. Chez l'Homme, plusieurs études cliniques démontrent que l'inhibition de la PDE3 par le cilostazol réduit la re-sténose post-angioplastie des artères coronaire, carotide, et fémorale 6 et/ou 12 mois après l'intervention (Douglas *et al.*, 2005 ; Takigawa *et al.*, 2010 ; Iida *et al.*, 2013). Par ailleurs, le cilostazol limite la progression des lésions athéromateuses carotidiennes chez des patients atteints d'un diabète de type II (Katakami *et al.*, 2010).

[23] Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4) : canal capable d'extruder l'AMPc hors de la cellule.

C. L'adenylyl cyclase 8 : une actrice inattendue des remodelages vasculaires pathologiques

1. *Généralités sur l'adenylyl cyclase 8*

a) ***Gène et homologie entre espèces***

L'AC8 est codée par le gène *ADCY8* chez l'Homme (NCBI Gene ID 114), *Adcy8* chez la souris (NCBI Gene ID 11514) et le rat (NCBI Gene ID 29241). Chez l'Homme, Il est localisé sur le chromosome 8 en position 8q24.22 ; chez la souris et le rat, sur le chromosome 15 en position 15D1 et sur le chromosome 7 en position 7q33, respectivement. Il est hautement conservé entre l'Homme et les rongeurs, avec environ 90% d'homologie dans la séquence codante. Au niveau protéique, la redondance du code génétique permet d'augmenter cette homologie à environ 99%.

b) ***Propriétés de régulation et partenaires d'interaction***

Activation de l'AC8 par le Ca^{2+}/CaM

L'AC8 est activée par le calcium capacitatif lié au complexe Ca^{2+}/CaM (Cali *et al.*, 1994). Elle est peu sensible à celui libéré des stocks intracellulaires de calcium (Fagan, Mahey and Cooper, 1996 ; Shuttleworth and Thompson, 1999 ; Martin and Cooper, 2006). L'AC8 possède deux sites de liaison à la calmoduline : *i)* une hélice amphipathique contenue entre les résidus 34 et 51 de l'extrémité N-terminale ; *ii)* un motif IQ[24]-like contenu entre les résidus 1196 et 1212 du domaine C2b, constituées par une hélice-α subdivisée en deux régions fonctionnelles distinctes H1 et H2 (Macdougall *et al.*, 2009). L'analyse du mode d'activation de l'AC8 en réponse au complexe Ca^{2+}/CaM a mis en évidence un mécanisme d'auto-inhibition de l'AC8 levé par l'activation du complexe Ca^{2+}/CaM. Un modèle d'activation de l'AC8 par la CaM proposé par Macdougall et ses collaborateurs en 2009 soulignent les régions clé de l'AC8 impliquées dans ce mécanisme d'auto-inhibition (Macdougall *et al.*, 2009). La description du mode d'activation de l'AC8 par le Ca^{2+}/CaM est proposée en **Figure I.30**.

[24] Motif IQ : séquence d'acide aminés impliqués dans la liaison à la calmoduline – [FILV]Qxxx[RK]Gxxx[RK]xx[FILVWY]

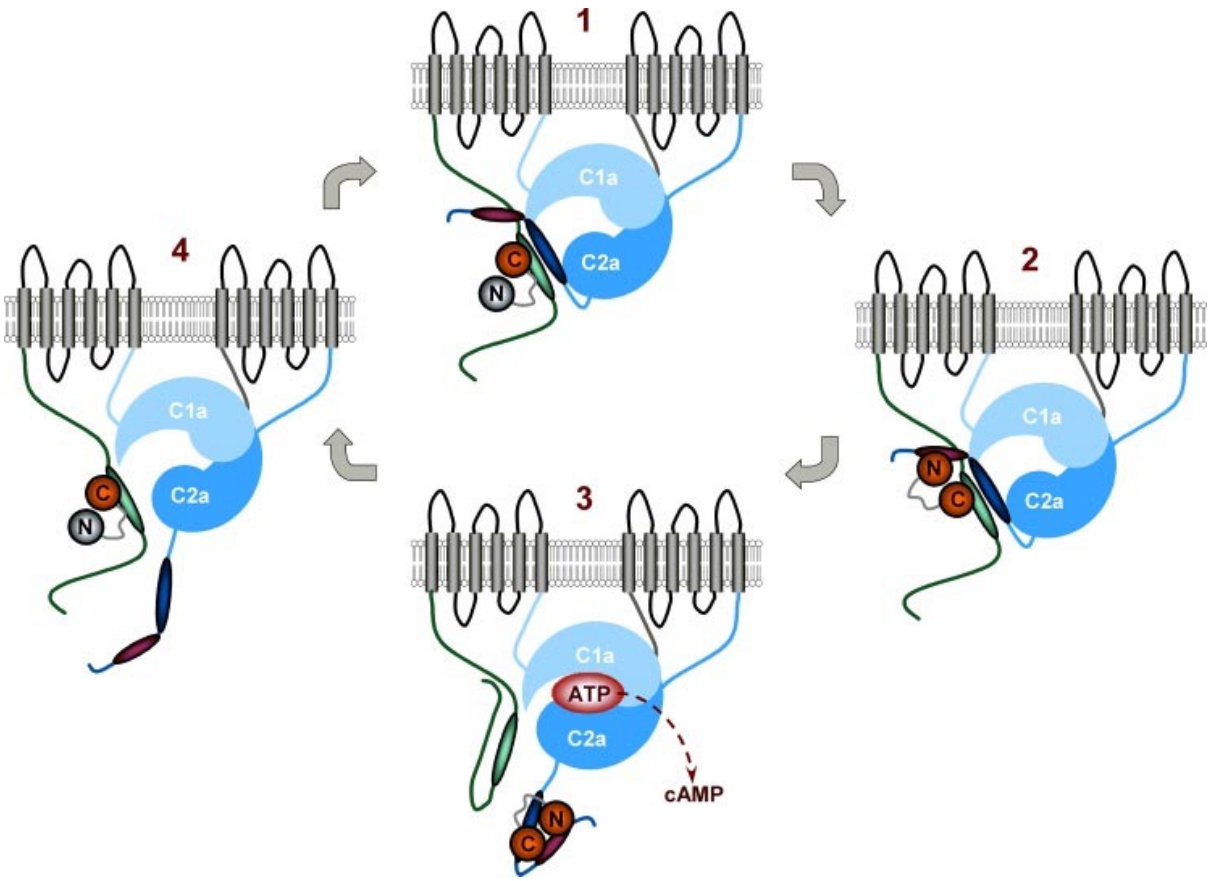


Figure I.30 : Mécanisme d'activation de l'AC8 par le Ca^{2+}/CaM.

La CaM est représentée par l'altère composée des lobes N et C, la couleur de chaque lobe signale indique l'état de liaison au calcium (gris : libre ; orange : lié au Ca2+). Les régions C1 et C2 de l'AC8A sont représentées en turquoise et bleu foncé, respectivement. Les lobes représentent les portions C1a et C2a de ces domaines. L'extrémité N- terminale de l'enzyme est représentée en vert, la portion ovale représente l'hélice amphipathique. Les hélices H1 et H2 du motif IQ-like sont signalées par deux ovales respectivement bleu foncé et violet. **1.** Organisation du complexe AC8A-CaM au repos. L'hélice amphipathique de l'AC8A est associée au lobe C de la CaM lié au calcium. L'hélice H1 de l'enzyme organise un complexe d'auto-inhibition autour du site catalytique. **2.** L'élévation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} induit la fixation d'ions Ca^{2+} sur le lobe N de la CaM, qui se lie avec l'hélice H2 du motif IQ-like de l'AC8A. **3.** Le lobe C de la CaM bascule depuis l'hélice amphipathique de l'enzyme vers l'hélice H1 du motif IQ-like. La CaM est désormais uniquement liée au motif IQ-like de l'AC8A, ce qui entraine la dissociation du complexe d'auto-inhibition, se traduisant par l'activation de l'AC8. **4.** Avec la diminution de la concentration en calcium, la CaM n'est plus capable de fixer les ions Ca^{2+} au niveau de son lobe N. Elle interagit alors à nouveau avec l'hélice amphipathique de l'AC8A par l'intermédiaire de son lobe C, reprenant ainsi sa conformation de repos : le complexe d'auto-inhibition est reformé et l'enzyme est inactivée. D'après Macdougall *et al.*, 2009.

L'AC8 est régulée par plusieurs autres partenaires capables d'interagir physiquement avec l'AC8 pour en réguler l'activité. On citera *i)* le dimère GβɣX des protéines G hétérotrimériques qui inhibe son activité (Tang and Gilman, 1991 ; Steiner *et al.*, 2006) ; *ii)* la PKA, qui est localisée à proximité de l'AC8 par l'intermédiaire de l'AKAP79, qui interagit avec l'extrémité N-terminale de l'AC8. L'interaction AKAP79-AC8 permet alors la phosphorylation inhibitrice de l'AC8 par la PKA sur son résidu Ser112 (Wayman *et al.*, 1996 ; Willoughby *et al.*, 2010 ; Willoughby, Halls, *et al.*, 2012) ; *iii)* la protéine Orai1, un canal calcique qui se fixe au niveau de l'extrémité N-terminale de l'AC8 et coordonne l'entrée de calcium dans la cellule avec production d'AMPc (Willoughby, Everett, *et al.*, 2012). Le rôle de Orai1, mais également de STIM1[25] et TRPC1[26], est mis en évidence par le fait que la modulation de leur niveau d'expression respectif module l'activité de l'AC8 (Martin *et al.*, 2009 ; Willoughby *et al.*, 2014). **Au regard de ces résultats, on note que le domaine N-terminal de l'AC8 se révèle être primordial dans ses propriétés de régulations.**

c) *Variants d'épissage alternatif de l'adenylyl cyclase 8*

Des variants d'épissage alternatifs de l'AC8 ont été caractérisés peu après l'identification de l'AC8 en 1994 par Cali et ses collaborateurs. L'AC8 pleine taille, longue de 1248 acides aminés, est codée par une séquence codante de 3747pb incluant 18 exons (Cali *et al.*, 1994). Deux ans plus tard, les mêmes auteurs identifient deux variants d'épissage alternatif de l'AC8 à partir d'une banque de cDNA de cerveau de rat. L'AC8B diffère de l'AC8 pleine-taille, nommée AC8A, par la délétion d'une région de 30 acides aminés, correspondant à la cinquième boucle extracellulaire de l'enzyme, entre les domaines transmembranaires 9 et 10, sur laquelle se trouvent deux sites de N-glycosylation fonctionnels, résultant de la délétion des 90pb de l'exon 11. L'AC8C diffère de l'AC8A par la délétion de 66 acides aminés dans la région C1b, résultant de la délétion des 198pb de l'exon 8 (Cali, Parekh and Krupinski, 1996). En 2003, Delmeire et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'un quatrième variant, appelé AC8D, présentant une double délétion des exons 8 et 11. Ce variant est exprimé chez le rat dans le cerveau, les cellules β-pancréatiques, et dans la lignée cellulaire RIN-m5f[27] (Delmeire *et al.*, 2003).

Des variants de l'AC8 similaires ont été identifiés chez la souris et chez l'Homme. Chez la souris, Muglia et ses collaborateurs mettent en évidence en 1999 l'existence des variants B et C de l'AC8, équivalents à ceux caractérisés chez le rat, dans le cerveau et les poumons (Muglia *et al.*, 1999). Chez l'Homme, Defer et ses collaborateurs, qui clonent l'AC8 humaine en 1994 à partir d'une banque de cDNA issus de tronc cérébraux humains, identifient également, dans une banque d'ADNc de testicules humains, un variant de l'AC8 présentant une délétion de 90pb identique à celle identifiée chez le rat dans l'AC8B (Defer *et al.*, 1994).

[25] STIM1 : protéine impliquée dans la détection des stores intracellulaires de calcium, impliquée dans l'activation de Orai1.
[26] TRPC1 : canal cationique non spécifique
[27] RIN-m5f : lignée cellulaire de cellules β-pancréatiques de rat.

Une représentation schématique des séquences et protéines des variants d'épissage alternatif de l'AC8 est proposée en **Figure I.31**.

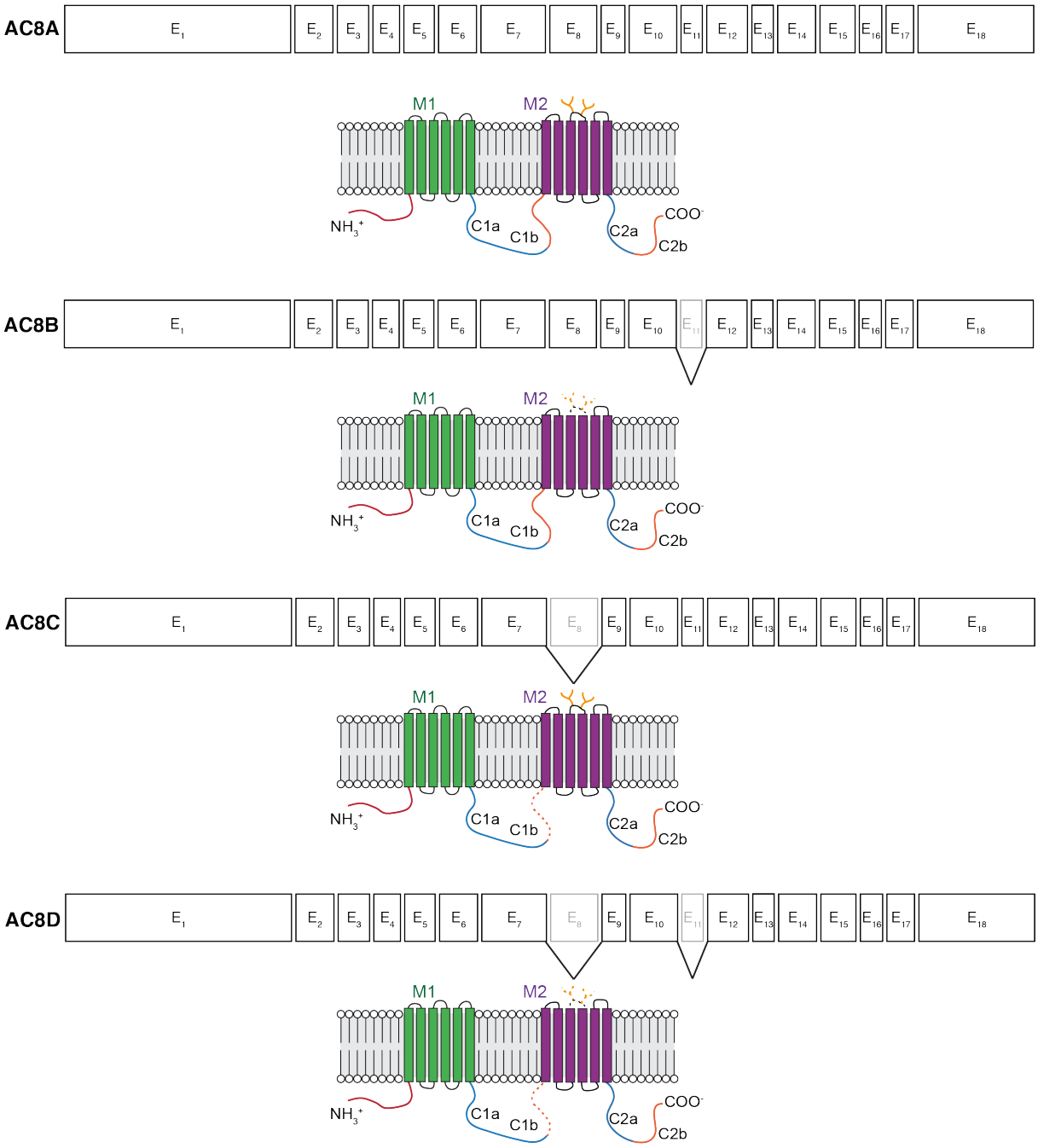


Figure I.31. Représentation schématique des ARNm et protéines des variants d'épissage alternatif de l'AC8.
Les segments protéiques absents sont indiqués en pointillés.

L'étude fonctionnelle des variants AC8B et AC8C, effectuées par Cali et ses collaborateurs en 1996, ainsi que par Steiner et ses collaborateurs en 2005, mettent en évidence les conséquences des délétions sur la stabilité, l'affinité pour le substrat et les propriétés de régulation de l'AC8. En ce qui concerne le variant AC8B, la perte de la N-glycosylation de l'enzyme, due à la délétion des deux sites N814 et N818 de la cinquième

boucle extracellulaire, se traduit par un niveau d'expression bien plus faible du variant par rapport aux AC8A et -C. La boucle extracellulaire et/ou la N-glycosylation de l'AC8 seraient donc impliquées dans la stabilité de l'enzyme. L'AC8B est catalytiquement active. Pourtant, les dosages d'activité et d'accumulation d'AMPc dans les cellules surexprimant ce variant révèlent une diminution de l'activité cyclase, par rapport aux cellules surexprimant l'AC8A, du fait de l'instabilité protéique de l'AC8B. En ce qui concerne l'AC8C, celle-ci est catalytiquement active, mais semblerait montrer une diminution de son affinité pour son substrat qui se traduit par une diminution de son activité par rapport aux AC8A et -B (Cali, Parekh and Krupinski, 1996 ; Steiner *et al.*, 2005).

d) Distribution tissulaire et fonctions physiologiques

Le profil d'expression de l'AC8 se base essentiellement sur l'étude des transcrits par RT-PCR, northern blot et hybridation *in situ*. Les analyses fonctionnelles réalisées sur ces tissus, ainsi que l'utilisation de modèles murins transgéniques ont permis de confirmer l'expression de l'AC8 et de déterminer les fonctions physiologiques auxquelles elle prend part. Aussi, plusieurs modèles murins sont disponibles pour étudier le rôle de l'AC8 : *i)* le KO total de l'AC8 ($AC8^{-/-}$, Schaefer *et al.*, 2000) ; *ii)* le double KO AC1/AC8 ($AC1^{-/-}/AC8^{-/-}$, Wong *et al.*, 1999) ; *iii)* la souris surexprimant l'AC8 humaine dans le cœur (Lipskaia *et al.*, 2000). Ces modèles, comme le modèle murin invalidé pour l'AC1 ($AC1^{-/-}$), sont viables et fertiles, présentent une croissance normale et une bonne coordination moteur.

Le cerveau est le principal tissu d'expression de l'AC8. Ses transcrits sont détectables dans toutes les régions cérébrales, mais ont été plus fortement détectés dans l'hippocampe, le cervelet, le cortex, le thalamus et l'hypothalamus (Sanabra and Mengod, 2011). A l'échelle protéique, l'AC8 a été immunodétectée précisément dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex de la souris (Conti *et al.*, 2007). L'AC8 présente des propriétés de régulations très similaire à celles de l'AC1 ; par ailleurs, leur expression est cantonnée aux mêmes régions cérébrales. Aussi, l'analyse des fonctions qu'elles y exercent, met souvent en évidence un rôle conjoint des deux AC dans les processus cognitifs qu'elles régulent. L'AC8 est impliquée dans la potentialisation à long terme (LTP) essentiel au processus de mémorisation et d'apprentissage (Schaefer *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2003), fonction qu'elle partage avec l'AC1. En effet, la perte de la LTP n'est totale que dans le double KO $AC1^{-/-}/AC8^{-/-}$ (Wu *et al.*, 1995 ; Abdel-Majid *et al.*, 1998 ; Storm *et al.*, 1998). L'AC1 et l'AC8 participent également toutes deux à *i)* l'établissement de la mémoire de la peur induite par le stress (Wang *et al.*, 2003 ; Wong *et al.*, 1999) ; *ii)* aux phénomènes de dépendance aux opiacés ou à l'alcool, les souris double KO $AC1^{-/-}/AC8^{-/-}$ montrant une réponse à la morphine diminuée, ainsi que des symptômes de manque bien moins marqués par rapport aux souris sauvages (Li *et al.*, 2006). Pour autant, les AC1 et AC8 contribuent chacune à différents processus initiés par la consommation d'alcool : l'AC1 est impliquée dans l'effet sédatif de l'éthanol, mais pas dans le phénomène de dépendance à l'éthanol, qui serait imputable à l'AC8 (Maas *et al.*, 2005). Enfin, l'AC8 est particulièrement impliquée dans la plasticité synaptique associée au stress

(Schaefer *et al.*, 2000), tandis que l'AC1 exerce un rôle fondamental dans la transmission de la nociception (Vadakkan *et al.*, 2006). Dans l'hypothalamus, l'AC8 participe à l'adaptation à un régime riche en lipides et contribue ainsi, de manière indirecte, à la sécrétion d'insuline par le pancréas. En effet, les souris présentant une invalidation ciblée de l'AC8 dans l'hypothalamus sont incapables d'augmenter leur insulinémie (Raoux *et al.*, 2015).

L'expression de l'AC8 a été montrée dans de multiples tissus chez le Rongeur. Aussi, en plus d'exercer un effet indirect sur la sécrétion d'insuline, l'AC8 exerce un effet direct sur ce processus en raison de son expression **dans les cellules β-pancréatiques** murines, où elle participe à la sécrétion d'insuline en réponse à l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc induite par le calcium (Raoux *et al.*, 2015). Des résultats concordants ont été obtenus chez le rat, où l'AC8 des cellules β-pancréatiques participe à la sécrétion d'insuline induite par le glucose et augmentée par le GLP1 (*glucagon-like peptide 1*, Delmeire *et al.*, 2003 ; Roger *et al.*, 2011). L'AC8 est également exprimée **dans la glande parotide**[28] de la souris ; dans ce tissu, elle produit de l'AMPc en réponse à une entrée capacitative de calcium, et serait ainsi impliquée dans la sécrétion d'α-amylase (Watson *et al.*, 1998, 2000). Son expression a également été détectée **dans les cholangiocytes**[29] de rat, où l'AMPc produit en réponse à une stimulation par la sécrétine participe à la sécrétion biliaire (Strazzabosco *et al.*, 2009). Chez le cochon d'Inde et le lapin, l'AC8 est également exprimée au **niveau cardiaque, dans les radeaux lipidiques des cellules du nœud sino-atrial**, où elle est impliquée dans la fonction pacemaker de cette région du cœur (Mattick *et al.*, 2007 ; Younes *et al.*, 2008). En accord avec ces observations, la surexpression de l'AC8 humaine spécifiquement dans le cœur de souris augmente la contractilité des cardiomyocytes (Lipskaia *et al.*, 2000).

A l'exception du cœur et du cerveau, l'AC8 apparaît comme étant exprimée exclusivement dans des cellules sécrétrices. Cependant, l'analyse comparative de la distribution tissulaire de l'AC8 révèle des différences notoires entre la souris et l'Homme, où ses transcrits n'ont été détectés que dans le cerveau et les testicules (Ludwig and Seuwen, 2002), et au niveau protéique dans les cellules β-pancréatiques (Raoux *et al.*, 2015). Par conséquent, le profil d'expression et les fonctions physiologiques identifiées chez la souris ne peuvent être transposés à l'Homme qu'avec précaution.

2. Adenylyl cyclase 8 et trans-différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires

L'IL-1β est une cytokine de première importance dans l'établissement des remodelages vasculaires pathologiques. En effet, son implication est mise en avant par de nombreuses études qui rapportent que *i)* l'invalidation du gène codant l'IL-1β ou son récepteur, l'IL-1R, chez la souris KO ApoE$^{-/-}$ induit une diminution significative de la surface des lésions athéromateuses (Kirii *et al.*, 2003 ; Chi *et al.*, 2004) ; *ii)* la surexpression d'un

[28] La glande parotide est la plus volumineuse des glandes salivaires principales. Elle est notamment responsable de la sécrétion d'α-amylase, enzyme impliquée dans la dégradation des sucres.

[29] Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales du canal biliaire, par leur activité sécrétrice, ils contribuent à la composition biliaire.

antagoniste du récepteur à l'IL-1, l'IL-1Ra, induit également une diminution significative de la surface des lésions athéromateuses, ainsi qu'une diminution de l'inflammation de l'aorte (Merhi-Soussi *et al.*, 2005) ; *iii)* le ciblage de l'IL-1β chez l'homme à l'aide d'anticorps monoclonaux, mis en évidence par l'essai clinique CANTOS, se caractérise par une diminution des accidents cardiovasculaires aigües (Ridker *et al.*, 2017).

Or, en 2006, notre équipe démontre que les modulations phénotypiques des CMLV dépendantes de l'IL-1β impliquent l'expression *de novo* de l'adenylyl cyclase 8. Cette AC, absence des CMLV contractiles, participe à l'acquisition des propriétés inflammatoires et sécrétoires des CMLV trans-différenciées à l'IL-1β *in vitro*. En effet, l'expression de l'AC8 est impliquée dans la potentialisation de la sécrétion de la phospholipase A_2 induite par l'IL-1β, en présence de PGE_2 (Clément *et al.*, 2006). L'AC8 des CMLV trans-différenciées est également impliquée dans l'acquisition des propriétés migratoires des cellules (Gueguen *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'invalidation de l'AC8 induit une diminution significative de la sécrétion des métalloprotéases matricielles 2 et 9 par les CMLV (résultats non publiés). Son implication dans le développement des lésions athéromateuses a été montrée chez la souris KO ApoE$^{-/-}$ où l'invalidation de l'AC8 se traduit par une diminution *i)* de l'inflammation de l'aorte abdominale (résultats non publiés) et *ii)* de la surface de la paroi artérielle présentant des lésions athéromateuses (**Figure I.32**, Gueguen *et al.*, 2016).

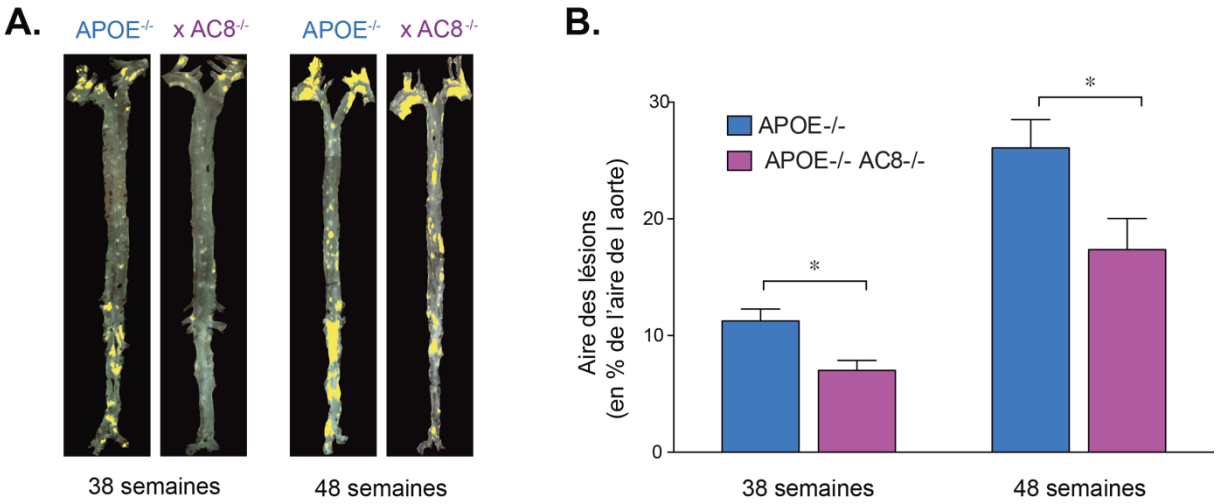


Figure I.32 : Implication de l'AC8 dans le développement des lésions athéromateuses chez la souris KO ApoE$^{-/-}$.

A. Photographies d'aortes en vue *en face* chez la souris KO ApoE$^{-/-}$ ou double KO ApoE$^{-/-}$/AC8$^{-/-}$. **B.** Quantification de l'aire lésée en pourcentage de l'aire totale. Les données sont présentées en moyennes des aires lésées ± SEM pour chaque groupe. *n = 8 à 12* ; **P < 0,05.* Depuis Gueguen *et al.*, 2016.

L'implication de l'AC8 dans le processus de trans-différenciation des CMLV se traduit par son expression transitoire au cours de la formation de l'hyperplasie néo-intimale chez le rat blessé par angioplastie au ballonnet, un modèle de re-sténose. En effet, l'analyse des immunomarquages dirigés contre l'AC8 montre que celle-ci est indétectable sur les coupes d'artères non lésées. L'expression de l'AC8 apparaît dans les cellules de la media 6 jours après la lésion. Dix jours après la lésion, le marquage de l'AC8 est principalement cantonné à la néo-intima, constituée de CMLV trans-différenciées qui migrent et prolifèrent. L'AC8 devient

indétectable 30 jours après la lésion, quand l'hyperplasie est achevée et que les CMLV ne migrent et ne prolifèrent plus, et que l'endothélium est reconstitué, comme l'indique le marquage PECAM-1. Au cours de ce processus, l'immunomarquage de la cycline D1 précède celui de l'AC8, mettant en évidence que cette dernière ne serait pas impliquée dans le phénotype prolifératif des CMLV néo-intimales (**Figure I.33**, Gueguen *et al.*, 2010). Le rôle de l'AC8 dans la formation de l'hyperplasie néo-intimale est entériné par le fait que l'injection d'ARN interférents ciblant l'AC8 immédiatement après la lésion diminue significativement le phénomène de re-sténose chez le rat observé 7 jours après la lésion, par rapport à des ARN interférents contrôles (résultats non publiés).

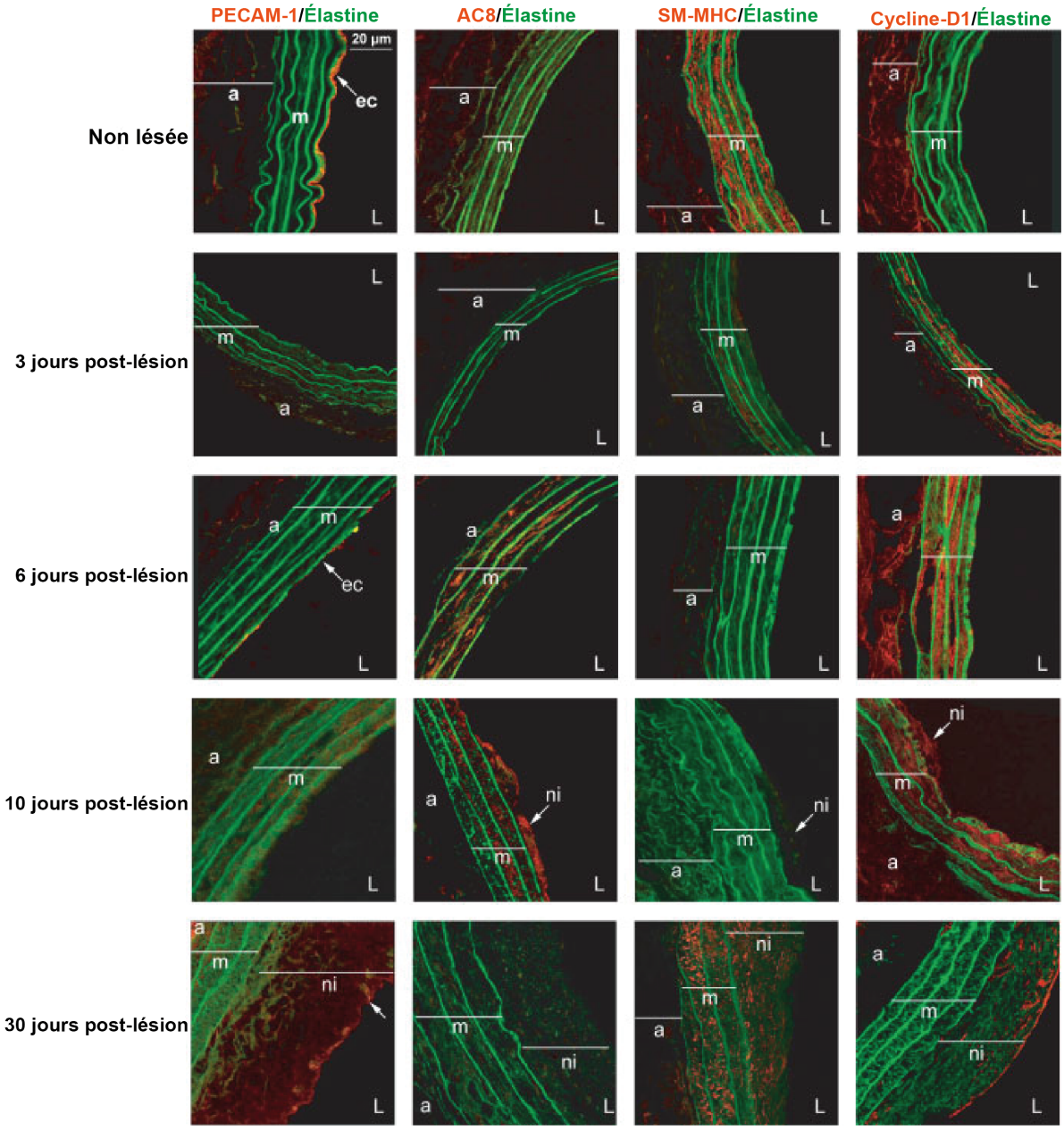


Figure I.33 : Immunomarquages de PECAM-1, AC8, SM-MHC et Cycline D1 sur des coupes de carotides de rat après angioplastie au ballonnet.

Observations confocales sur des coupes de carotides de rat non lésées ou 3, 6, 10 ou 30 jours après angioplastie au ballonnet. Marquages rouges à l'aide d'anticorps dirigés contre PECAM-1, AC8, SM-MHC ou Cycline-D1. Le marquage vert correspond à l'auto-fluorescence de l'élastine. Barre = 20 µm ; a : adventice ; m : media ; ni : neo-intima ; L : lumière ; ec : cellules endothéliales. Depuis Gueguen *et al.*, 2010.

Enfin, le laboratoire a mis en évidence que chez l'Homme, l'AC8 est exprimée dans les lésions athéromateuses d'artères coronaires et carotidiennes. Le marquage anti-AC8 est cantonné aux CMLV néo-intimales de ces artères, comme en témoigne le marquage SMA réalisé sur ces mêmes artères. Très peu de CMLV se montrent positives pour l'AC8 dans la media des artères saines et lésées (Gueguen *et al.*, 2010).

L'expression de l'AC8 dans les CMLV de rat résulte de l'altération de la voie Notch3 par l'IL-1β. En effet, *i)* l'expression de l'AC8 dans les CMLV en réponse au traitement l'IL-1β s'accompagne de la diminution de Notch3 ; *ii)* l'inhibition de cette voie augmente l'effet de l'IL-1β sur l'expression de l'AC8 ; *iii)* L'activation de la voie Notch3, ou la surexpression de ses gènes cibles *Hrt1* et *Hrt3*, diminuent significativement l'expression de l'AC8 en réponse à l'IL-1β ; *iv) in vivo*, chez le rat blessé par angioplastie au ballonnet, l'expression *de novo* de l'AC8 coïncide avec la régulation négative de la voie Notch3 (Keuylian *et al.*, 2012).

L'implication d'une adenylyl cyclase, supposée produire de l'AMPc, dans l'établissement de l'hyperplasie néo-intimales apparaît contradictoires avec le rôle vasculoprotecteur de l'AMPc présenté ci-avant (**voir *Partie 2.III.B. Effets de la signalisation AMPc dans les CMLV***). L'équipe a donc étudié la dynamique de production d'AMPc, par imagerie de biosenseur optique, dans des CMLV traitées ou non à l'IL-1β. Elle a découvert que l'AC8 des CMLV trans-différenciées inhibe la dynamique de production d'AMPc (**voir *Résultats. I. Article Fig.2***). Le laboratoire a ensuite cloné et séquencé l'AC8 exprimée dans les CMLV trans-différenciées, et mis en évidence 4 nouveaux variants d'épissage de l'AC8 jusqu'alors inconnus : les AC8E-H (**voir *Résultats. I. Figure R.1***). Ces variants sont catalytiquement inactifs et exercent un effet inhibiteur sur la production d'AMPc dans les CMLV (**voir *Résultats. I. Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.2***).

Objectifs et approche générale :

Ce projet vise à de caractériser la fonction de AC8E, modéliser sa structure 3D, concevoir des peptides pour perturber sa fonction, et démontrer leur efficacité *in vitro* puis, à plus long terme, *in vivo* sur le phénomène de re-sténose dans un modèle de rat. Il contribuera à avancer dans le ciblage thérapeutique des isoformes AC pour le développement de traitements spécifiques.

La sténose athérosclérotique et ses complications ischémiques nécessitent une reconstruction artérielle. L'angioplastie suivie de la pose d'un stent actif (éluant des molécules antiprolifératives) est la thérapie couramment utilisée pour traiter l'athérosclérose. Ces stents actifs minimisent le phénomène de re-sténose intra-stent consécutif à l'hyperplasie de CMLV observée lors de la pose d'un stent « nu ». Les composés antiprolifératifs délivrés par les stents actifs actuels sont associés à un retard de cicatrisation et à des complications thrombotiques tardives nécessitant une thérapie antiagrégante, incompatible avec toute intervention chirurgicale. Les efforts pour améliorer la performance des stents à élution portent principalement sur le système de diffusion et non sur la molécule délivrée. Notre travail devrait conduire au développement d'un nouveau concept de stent qui éluerait des peptides agissant sur les CMLV trans-différenciées migratoires et prolifératives, prévenant ainsi en toute sécurité la re-sténose intra-stent sans nécessiter de traitement antiplaquettaire potentiellement problématique.

En effet, nous avons découvert une famille de nouvelles isoformes d'adenylyl cyclases, les AC8E-H, spécifiquement exprimée dans des CMLV trans-différenciées, qui est caractérisée par l'absence des 5 premiers domaines transmembranaires de l'enzyme et des boucles intra- et extracellulaires qui y sont associées. Ces variants tronqués sont catalytiquement inactifs et exercent un effet inhibiteur sur la dynamique de production d'AMPc. Pour mémoire, l'AMPc, produit des AC fonctionnelles, inhibe les propriétés des CMLV trans-différenciées à l'origine de la re-sténose post-angioplastie et de l'expansion des lésions athéromateuses.

Ce travail vise à montrer que cibler les AC8E-H dans les CMLV trans-différenciées permet de restaurer une production d'AMPc normale dans les CMLV trans-différenciées. Le ciblage de ces variants après une angioplastie permettrait ainsi l'inhibition des propriétés migratoires et prolifératives développées par les CMLV trans-différenciées et responsables du phénomène de re-sténose, tout en permettant la reconstruction de la barrière endothéliale.

Il se décline ainsi :

- **Objectif 1 : caractérisation fonctionnelle et biochimique de l'AC8E** – à qui il manque, comme pour les AC8F G et H, les 5 premiers domaines transmembranaires et les boucles intra- et extracytosoliques associées – en système d'expression hétérologue.

En utilisant l'imagerie de biosenseur optique FRET, des approches biochimiques et de biologie moléculaire (incluant notamment de la mutagénèse dirigée, des expériences de dosages immunologiques d'accumulation d'AMPc, de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence), nous avons montré que les AC8E-H sont catalytiquement inactives et exercent un effet inhibiteur sur l'activité des AC fonctionnelles. Cet effet inhibiteur résulte de l'interaction physique entre les AC8E-H et les AC fonctionnelles qui empêche l'adressage des AC fonctionnelles à la membrane plasmique. L'hétérodimérisation et la rétention intracellulaire des AC fonctionnelles sont suffisantes pour que les AC8E-H exercent leur effet dominant-négatif sur la production globale d'AMPc.

- **Objectif 2 : conception de peptides interférents perturbant l'interaction de l'AC8E avec les autres AC.**

Pour ce faire, nous avons :
i) synthétisé la totalité de l'AC8E sous la forme d'une série de dodécapeptides chevauchants et avons testé leur capacité à interagir avec l'AC3 et/ou l'AC6 par une approche PEPscan (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018). L'expérience inverse a également été réalisée.
ii) modélisé, en collaboration avec le Pr. M. Dauchez et le Dr M. Velusamy, la structure tridimensionnelle de l'AC8E et de l'AC3 afin de modéliser la structure du complexe AC8E/AC3 pour optimiser les peptides issus du PEPscan.
iii) testé la capacité des peptides candidats à dé-complexifier les héterodimères d'AC comprenant l'AC8E et restaurer une réponse AMPc normale dans CMLV trans-différenciées.

MATERIEL ET METHODES

La majorité du matériel et méthode de ce travail est contenue dans la publication présentée dans les résultats (voir page 110). Les méthodes qui y sont décrites ne le sont donc pas dans cette section, où sont uniquement présentées les méthodes n'ayant pas encore été décrites.

I. Constructions plasmidiques

La provenance des plasmides codant les AC8E, AC8E-VSV-G, AC3, AC3-HA est décrite dans (Vallin *et al.*, 2018). Le plasmide AC6 de chien nous a été fourni par le Dr. Carmen Dessauer. Toutes les amorces ont été conçues à l'aide du Infusion Primer Design Tool (https ://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools).
L'ensemble des clonages a été réalisé à l'aide du kit de clonage Infusion (Takara). L'AC6-HA, l'AC8E-HA et les cassettes transmembranaires des AC3 et AC6, étiquetées HA, ont été clonés dans un vecteur p3-HA (N-terminal) entre les sites de restriction BamHI et EcoRI. Les cassettes transmembranaires de l'AC8 étiquetées VSV-G, ont été clonés de la même façon mais entre les sites de restriction KpnI et BamHI Les délétions de l'ADNc codant l'AC8E ont été réalisées par PCR. Lors des clonages, les vecteurs digérés ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à l'aide du QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Les plasmides générés ont été séquencés chez GATC/Eurofins Genomics.

II. Purification de protéines pour le PEPscan

Les protéines AC8E, AC6 et AC3 étiquetées HA sont purifiées à partir des lignées monoclonales de cellules HEK293 exprimant ces protéines de façon stable (environ 100 boites de culture de 150 mm de diamètre par clone). Les cellules sont lysées en additionnant 750µL de tampon de lyse par boite de culture de 150 mm de diamètre. La composition du tampon – qui est la suivante : 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate – est compatible avec la méthode de purification. Les protéines d'intérêt sont purifiées par chromatographie d'affinité utilisant un anticorps anti-HA couplé à des billes magnétiques (ThermoFisher-Scientific ; 40 µL par boite de 150mm). L'élution des complexes *anticorps anti-HA – protéine d'intérêt* est réalisé par incubation un tampon acide (100 mM Glycine, pH 2.0 ; 1µl de tampon d'élution pour 1µl de billes). Après neutralisation à l'aide d'un tampon Tris (1M tris, pH 8.5 ; 0,15µl de tampon de neutralisation pour 1 µl de tampon d'élution acide), la pureté et la quantité de protéine purifiée sont évaluées sur SDS PAGE en comparant son intensité de coloration au bleu de Coomassie, à celle d'une gamme de BSA. Afin d'isoler la protéine d'intérêt, l'immunoprécipitat est déposé dans un large puit unique d'un SDS-PAGE 5%. Après migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie G250 1h à température ambiante (Novex SimplyBlueTM SafeStain, InVitrogen). La bande de la taille attendue est découpée au scalpel dans le gel puis dilacérée. La protéine d'intérêt est électroéluée par application d'un courant électrique de 3W pendant 2h dans un tampon Tris-Acétate (10 mM Tris-Acétate, pH

8.6, 0,01% SDS) contenu dans un pont liant deux chambres d'une cuve d'électro-élution contenant un tampon Tris-Acétate (40 mM Tris-Acétate, pH 8.6, 0,01%SDS).

III. PEPscan

Le PEPscan est une approche de criblage haut débit des motifs potentiellement impliqués dans l'interaction protéine-protéine (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018). La séquence peptidique de la cassette transmembranaire M2 de l'AC8E est décomposée en dodécapeptides chevauchants, décalés de 2 acides aminés par rapport au peptide précédent. Les peptides sont déposés sous forme de taches sur une membrane de nitrocellulose puis hybridés avec la protéine partenaire purifiée, ici l'AC3-HA ou l'AC6-HA. La formation de complexes peptide(s)-AC-HA est détectée en incubant la membrane de nitrocellulose avec un anticorps anti-HA. Ainsi, les taches immunoréactives correspondent aux séquences peptidiques de l'AC8E susceptibles d'interagir avec l'AC3 ou l'AC6 (**Figure M.1**). L'expérience inverse consiste à déposer les dodécapeptides chevauchants représentant les séquences peptidiques des cassettes transmembranaires de l'AC3 ou de l'AC6 sur une membrane de nitrocellulose et à les hybrider avec l'AC8E purifiée et étiquetée HA. Dans ce cas, les séquences peptidiques d'interaction identifiées sont celles présentes dans les AC3 et AC6.

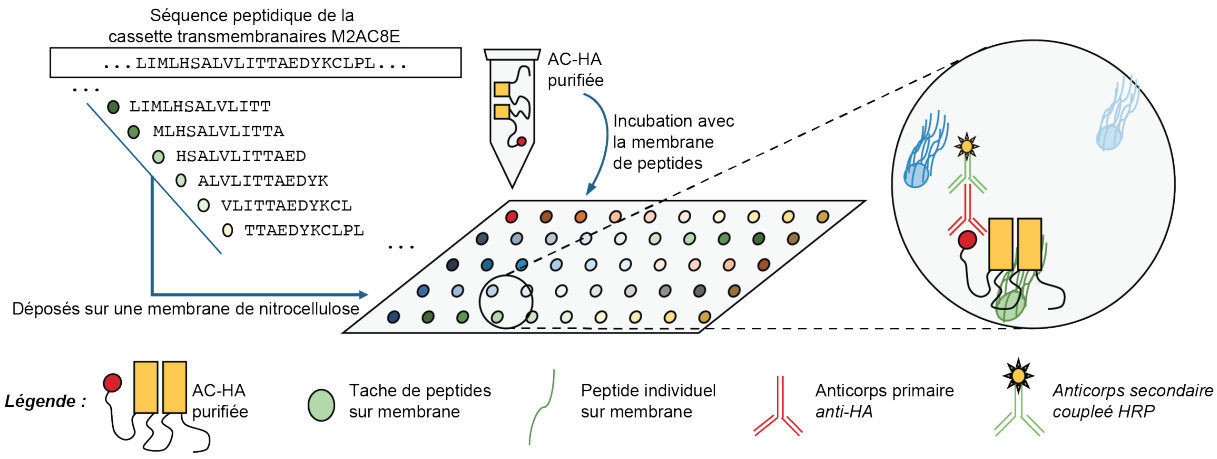


Figure M.1 : Représentation schématique de l'approche PEPscan.

IV. Traitement des CMLV par les peptides candidats

Les peptides interférents (GL Biochem Ltd.) sont resuspendus pour atteindre la concentration de 10mM dans du DMSO.

Les CMLV sont ensemencées sur lamelle, dans une plaque de culture 24 puits, préalablement recouverte de collagène de type I (Sigma), à une densité de 25 000 cellules par puit et mises en culture à 37°C dans du DMEM contenant 1 g/l de glucose additionné de 10% de SVF, de L-glutamine (4 mM), et d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml ; streptomycine 100 g/ml). Après 72h de culture, les cellules sont mises à jeun 12h avant traitement permettant leur

transdifférenciation (IL-1β, 10 ng/ml, 24h). Les peptides sont alors additionnés dans le milieu de culture à la concentration de 500nM.

V. Anticorps

Les anticorps utilisés, ainsi que la dilution pour chaque application, sont présentés dans le **Tableau M.1**.

Cible	Espèce	Fabriquant	Rérérence	Dilution	
				Western	Co-IP
AC5/6	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology INC	sc-590	1/400	-
AC8	Chèvre	Santa Cruz Biotechnology INC	sc-1967	1/400	-
VSV	Chèvre	Abcam	ab3861	1/1300	1/100
VSV	Souris	Abcam	ab50549	1/1000	-
HA	Souris	Abcam	ab130275	1/1000	1/100

Tableau M.1 : Liste des anticorps et dilution pour chaque application.

VI. Modélisation *in silico* des adenylyl cyclases

La séquence protéique des AC provient de *Uniprot*. Dans le but d'identifier les régions et sous-domaines composant les AC3 et -8A, de multiples alignements de séquence sont réalisés contre l'AC9 à l'aide du serveur *T-coffee*. Puis la combinaison de modélisation comparative, modélisation *ab initio*, et de méthodes de reconnaissance conformationnelle est utilisée pour modéliser les régions dont la structure tridimensionnelle était inconnue (N-terminal et C1b) et le domaine C2b des AC3, -8A et -9 en utilisant respectivement *SWISS MODEL*, *ROSETTA*, et les serveurs *Phyre2*. L'orientation des régions hélicoïdales (C1a et C2a) des deux régions transmembranaires (M1, TM1-6 et M2, TM7-12) est cross-validée à l'aide de multiples serveurs de prédictions membranaire en ligne. Ensuite, tous les modèles de domaines connus et inconnus sont assemblés par la combinaison de l'assemblage de domaines modélisés *ab initio* et par l'amarrage protéine-protéine en utilisant les serveurs *AIDA* et *CLUSPRO* (amarrage aveugle), et le serveur *HADDOCK* (amarrage site-spécifique), respectivement. Le modèle final de l'AC9 est ré-affiné et validé à l'aide du serveur *3D REFINE SERVER*. L'amarrage à l'aveugle des combinaisons suivantes : *i)* modèle de l'AC3 contre modèle de l'AC8E, *ii)* modèle de l'AC8E contre modèle de l'AC83, *iii)* modèle de l'AC3 contre modèle de l'AC8A et *iv)* modèle de l'AC8A contre modèle de l'AC3 ; sont effectués à l'aide du serveur *CLUSPRO*. Les résultats d'amarrage sont évalués sur la base des résultats obtenus lors des expériences de PEPscan, où toutes les combinaisons de peptides en résultant ont été évaluées en utilisant l'outil d'analyse d'interaction moléculaire *Pymol*.

RESULTATS

La transition phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), ou **trans-différenciation**, d'un phénotype quiescent et contractile, vers un phénotype migratoire, prolifératif, inflammatoire et spumeux joue un rôle clé dans l'initiation et la progression des lésions athéromateuses. Quand l'athérosclérose est symptomatique, une des techniques la plus largement utilisée est l'angioplastie. De nos jours, cette technique s'accompagne systématiquement de la pose d'un stent nu ou à élution médicamenteuse appelé stent actif. Chez 20 à 30% des patients porteurs d'un stent nu, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de l'artère remodelée migrent dans l'intima et y prolifèrent pour générer un tissu cicatriciel conduisant à une resténose post-angioplastie 3 à 6 mois après l'intervention. Les stents actifs délivrant des composés anti-prolifératifs contrent très efficacement cet effet secondaire mais exposent le patient à un risque important de thrombose intra-stent en raison de leur effet délétère sur la régénération de l'endothélium. Les stents actifs impliquent donc une thérapie anti-aggrégante, pendant au moins 6 mois après l'intervention avec, pour inconvénient majeur, une incompatibilité avec toute chirurgie en raison des risques hémorragiques encourus. Une solution serait la mise au point de stents délivrant un principe actif agissant sélectivement sur la capacité migratoire et/ou proliférative des CMLV de façon à éviter le traitement anti-aggrégant post-opératoire et ses contraintes. La migration et la prolifération de ces cellules sont consécutives à un phénomène appelé transition phénotypique ou trans-différentiation. L'un des **objectifs de notre équipe** est de participer à **l'identification des entités moléculaires qui contrôlent, ou du moins participent, au changement de phénotype des CMLV**. Ces entités moléculaires sont susceptibles de servir de cibles aux molécules éluées par les stents actifs en vue d'améliorer le bénéfice tiré par ce procédé. Ceci est d'autant plus pertinent que la contribution des CMLV aux lésions athéromateuses a été grandement sous-estimée en raison de leur capacité à exprimer, au sein des lésions, des marqueurs d'autres types cellulaire tels que des macrophages, des cellules mésenchymateuses, ou encore des myofibroblastes (Shankman *et al.*, 2015 ; Chappell *et al.*, 2016 ; Feil *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2019).

La réponse des CMLV à leur environnement est fonction de l'expression et de la localisation cellulaire des adenylyl cyclases (AC) qui, avec les phosphodiesterases (PDE) et les canaux MRP, sont les principales enzymes régulant la signalisation AMPc (**voir *Introduction – Partie 1 : La voie AMPc***).

Comme développé dans l'introduction, le laboratoire a mis en évidence *in vitro* que la transition phénotypique des CMLV en culture primaire vers un phénotype inflammatoire résulte de l'expression *de novo* de l'AC8 (Clément *et al.*, 2006 ; Keuylian *et al.*, 2012). Dans un contexte non-inflammatoire, les CMLV expriment principalement les AC3 et AC6 (Webb *et al.*, 2001 et résultats non publiés). Ces résultats sont également relevant *in vivo*, dans un modèle murin d'athérosclérose : l'extinction de l'AC8 diminue l'inflammation de l'aorte abdominale (résultats non publiés) et la surface de la paroi artérielle présentant des lésions athéromateuses (Finn *et al.*, 2007). Le laboratoire a également montré que les CMLV néo-intimales d'artère coronaires humaines, sécrétant potentiellement des facteurs pro-inflammatoires, montrent un niveau élevé d'AC8 ; en

revanche, seulement quelques CMLV AC8-positives sont détectées dans la couche médiane d'artères saines et présentant des lésions athérosclérotiques (Gueguen *et al.*, 2010). Enfin, l'équipe a démontré une relation causale entre l'expression de l'AC8 et la réponse migratoire des CMLV, et l'hyperplasie intimale post-angioplastie induisant la re-sténose (Gueguen *et al.*, 2010 et résultats non publiés). L'AC8 est donc spécifiquement exprimée dans les CMLV trans-différenciées de la paroi vasculaire de rongeurs et humaine *in vitro*, dans des cultures cellulaires, et *in vivo*, dans des lésions vasculaires. Plus important encore, les résultats obtenus montrent l'importance de l'AC8 dans l'athérogénèse et la formation de la néo-intima, *via* son implication dans l'acquisition des propriétés migratoires et inflammatoires par les CMLV.

Ces résultats apparaissaient contradictoires avec de nombreuses données qui étayent le fait que l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc inhibe les propriétés migratoires (Johnson *et al.*, 2006 ; McKean *et al.*, 2015), prolifératives (Vadiveloo *et al.*, 1997 ; Begum, Shen and Manganiello, 2011 ; Hewer *et al.*, 2011 ; Indolfi *et al.*, 1997) et inflammatoires (Newman *et al.*, 2003 ; Chatterjee *et al.*, 2014) des CMLV trans-différenciées. L'expression *de novo* d'une adenylyl cyclase dans les CMLV trans-différenciées, impliquée dans les remodelages vasculaires pathologiques était donc surprenante.

I. AC8E-H : une nouvelle sous-famille d'AC, issue de variants d'épissage de l'Adenylyl Cyclase 8

Les figures de cette partie présentent les résultats auxquels j'ai contribué.

Afin d'identifier le rôle de l'AC8 dans la trans-différenciation CMLV, l'équipe a tout d'abord mesuré la dynamique de production d'AMPc dans des CMLV traitées à l'IL-1β (trans-différenciées) *vs* contrôles à l'aide du biosenseur optique $^{T}Epac^{VV}$ (Klarenbeek and Jalink, 2014 ; Blirando *et al.*, 2015). Ce biosenseur est une protéine chimérique capable d'émettre deux fluorescences distinctes en fonction de sa liaison à l'AMPc (**voir description de l'outil en introduction** ***– Partie 1.I.A.3.c. Mesure dynamique de la production d'AMPc***). Il permet de suivre en temps réel l'évolution de la concentration intracellulaire en AMPc sur cellules vivantes. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que l'expression de l'AC8 dans les CMLV trans-différenciées, limitait, de façon paradoxale, la production d'AMPc en réponse à la forskoline. L'ADNc codant l'AC8 exprimée dans les CMLV trans-différenciées a donc été cloné et séquencé afin de disposer d'un outil pour en comprendre son mode d'action. Ce clonage a permis de mettre en évidence que l'AC8 exprimée dans les CMLV trans-différenciées par un traitement à l'IL-1β est issue d'une nouvelle sous-famille de variants d'épissage alternatif comprenant 4 membres nommés AC8E à H (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.1***). Les AC8E, AC8F, AC8G et AC8H, présentent une délétion commune de 414 pb localisée sur l'exon 1, se traduisant par une délétion des cinq premiers domaines transmembranaires de l'enzyme, et des boucles intra- et extracellulaires associées (**Figure R.1**).

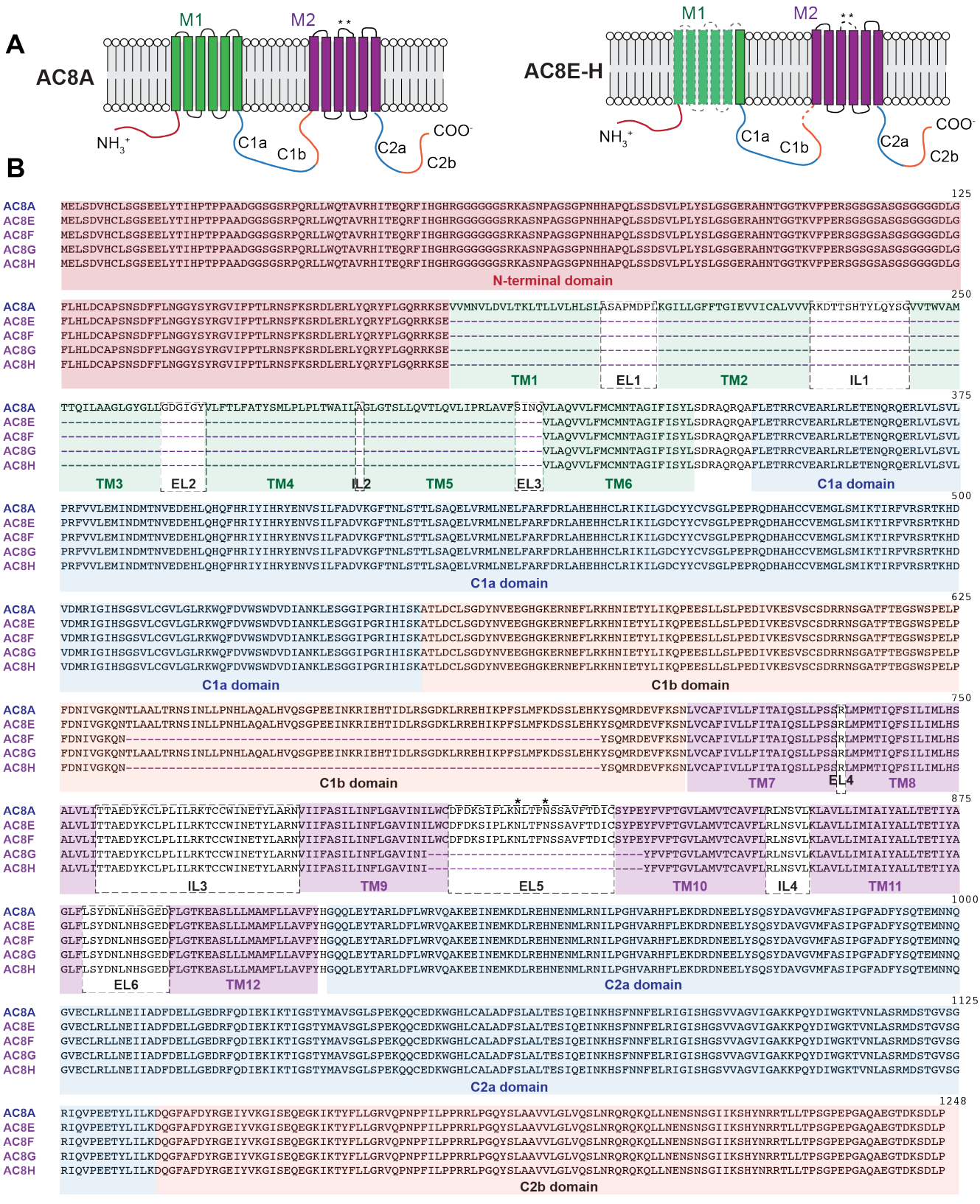


Figure R.1 : Représentation schématique et séquence peptidique des variants de l'AC8.

R. Représentation schématique de l'AC8A et des AC8E-H. Les séquences délétées dans les variants AC8E-H sont présentées en pointillé. **B.** Séquence peptidique de l'AC8A et des AC8E-H.

L'évaluation fonctionnelle de ces protéines tronquées réalisées dans des lignées monoclonales de cellules HEK293 exprimant stablement les AC8E-H (**Figure R.2A**), démontrent qu'elles ne présentent aucune activité catalytique et que deux d'entre elles, l'AC8E et l'AC8F, exercent un effet inhibiteur significatif sur la dynamique de production d'AMPc (**Figure R.2B**).

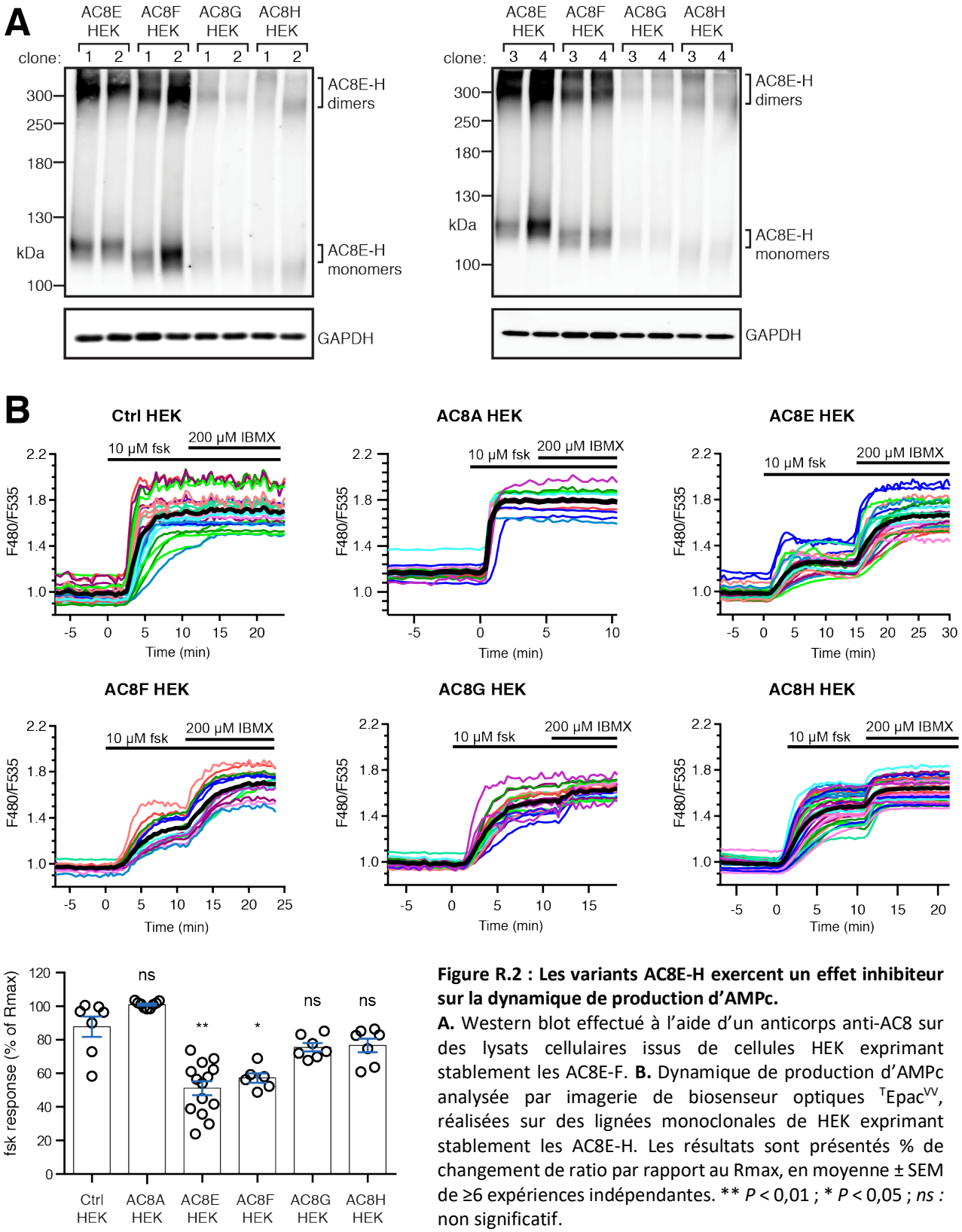


Figure R.2 : Les variants AC8E-H exercent un effet inhibiteur sur la dynamique de production d'AMPc.
A. Western blot effectué à l'aide d'un anticorps anti-AC8 sur des lysats cellulaires issus de cellules HEK exprimant stablement les AC8E-F. **B.** Dynamique de production d'AMPc analysée par imagerie de biosenseur optiques ^{T}Epac^{VV}, réalisées sur des lignées monoclonales de HEK exprimant stablement les AC8E-H. Les résultats sont présentés % de changement de ratio par rapport au Rmax, en moyenne ± SEM de ≥6 expériences indépendantes. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; *ns :* non significatif.

Les expériences de fractionnement subcellulaire révèlent que l'AC8E, est exprimée au niveau des membranes de forte densité, à savoir celles du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.3B***). Les expériences d'immunofluorescence, réalisées à l'aide d'un anticorps anti-VSV-G, ciblant l'AC8E étiquetées VSV-G, révèlent une expression qui semble cantonnée à la périphérie nucléaire (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.3C et 3D***). Ces résultats sont cohérents avec ceux issus des expériences de biotinylation de surface, où l'AC8E n'est pas détectée parmi les protéines de surface purifiées contrairement à l'AC8A. Enfin, les expériences qui mesurent l'accumulation et de la vitesse de production d'AMPc réalisées en présence de 3-isobutyl-1méthylxanthine (IBMX), un inhibiteur non spécifique de PDE, sont en faveur du fait que cette sous famille d'AC8 exerce un effet dominant-négatif sur l'activité des Adenylyl Cyclases fonctionnelles (**Figure R.3**).

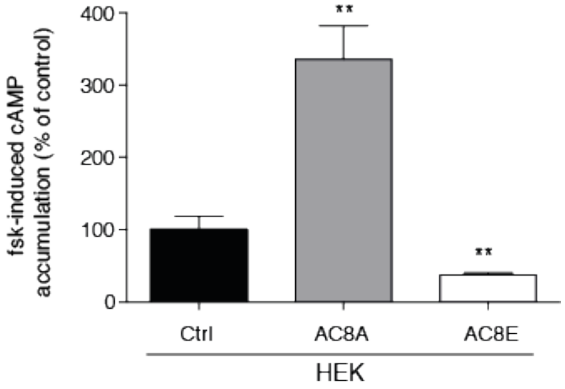


Figure R.3 : L'AC8E exerce son effet dominant-négatif via une inhibition de l'activité des AC fonctionnelles. Dosage immunologique d'accumulation d'AMPc effectué sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E et/ou l'AC2, l'AC3 ou l'AC6, après un traitement de 60 min à la forskoline (10µM) en présence d'IBMX (500µM). Les résultats sont exprimés en % des cellules contrôles et sont représentés en moyennes ± SEM de 5 expériences indépendantes. AC8A : 336,2 ± 46,5 % ; AC8E : 37,8 ± 2.6 %. L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Mann-Whitney. ** $P < 0,01$.

Cet effet prendrait place du fait d'une interaction physique entre les AC8E-F et les AC endogènes fonctionnelles : dans un système hétérologue d'expression, les cellules HEK293, l'AC8E co-immunoprécipite avec l'AC3 (**Figure R.4A et B**), l'une des principales isoformes d'AC exprimées dans les CMLV (Webb *et al.*, 2001 ; Ostrom *et al.*, 2002). Au vu des expériences d'immunocytochimie réalisées dans des cellules HEK exprimant transitoirement l'AC8A ou l'AC8E étiquetées VSV-G, et l'AC3 étiquetée HA, l'AC8E empêche l'export de l'AC3 à la membrane plasmique (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.6D***). Enfin, l'interaction entre l'AC8E et l'AC3 se traduit par une inhibition de l'activité enzymatique de l'AC3 mesurée par dosage immunologique d'accumulation d'AMPc dans des cellules HEK293 exprimant l'une et/ou l'autre de ces deux AC (**Figure R.4C**).

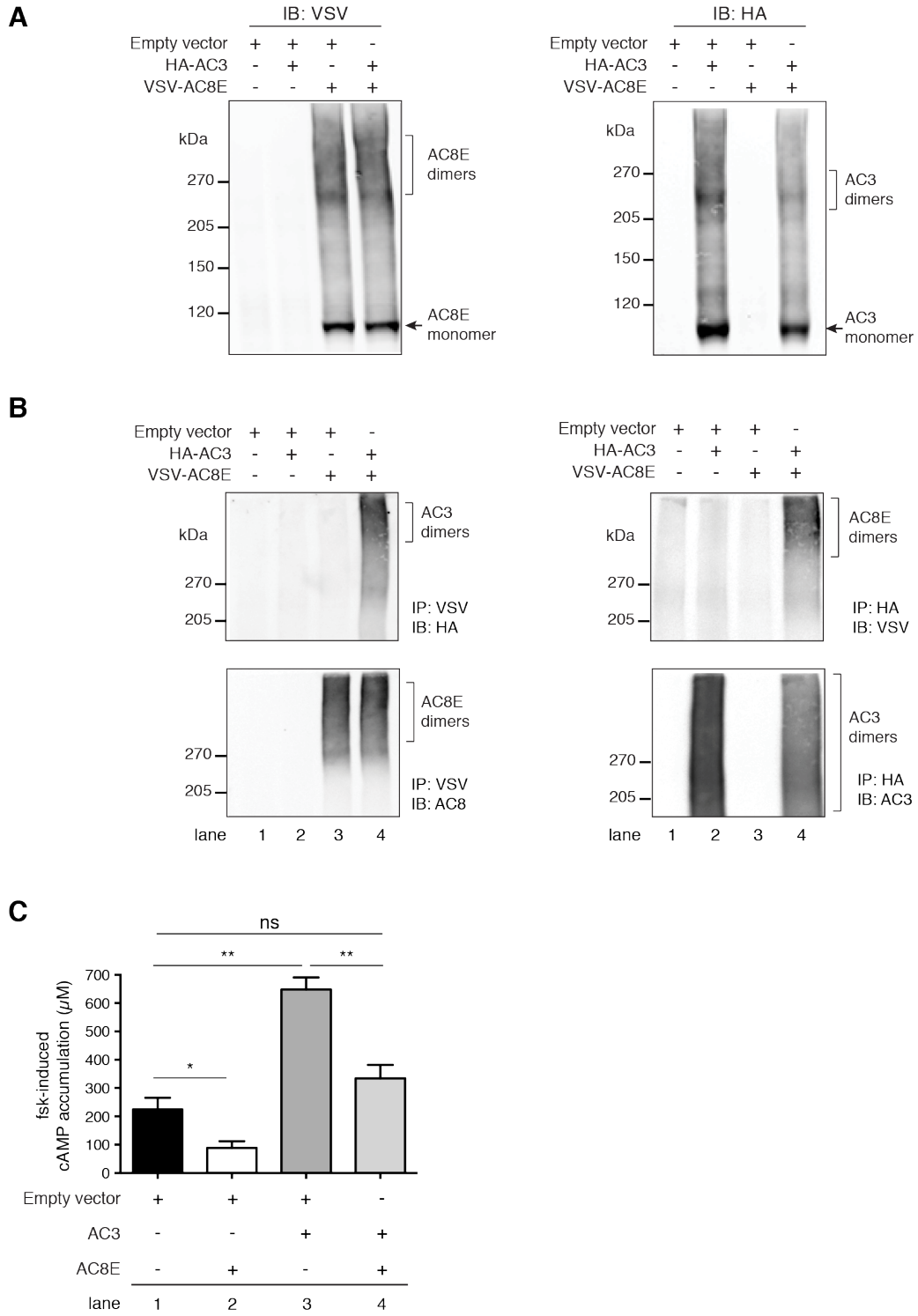


Figure R.4 : L'AC8E interagit physiquement avec l'AC3 et inhibe son activité catalytique.

Les protéines des lysats et immunoprécipitats (IP) sont séparées sur SDS-PAGE Tris-Acétate 3-8% en condition dénaturante/non-réductrice. **A.** Western blots montrant l'expression des dimères d'AC dans des cellules HEK293 exprimant transitoirement AC8E-VSV-G et/ou AC3-HA. **B.** Les lysats et immunoprécipitats obtenus à l'aide de l'anti-VSV (IP : VSV-G, panel de gauche) ou de l'anti-HA (IP : HA, panel de droite) ont été analysés à l'aide d'anticorps anti-HA ou d'anti VSV-G. IB : immunoblot. **C.** Dosage immunologique d'accumulation d'AMPc effectué sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E et/ou l'AC3, après un traitement de 60 min à la forskoline (10µM) en présence d'IBMX (500µM). Les résultats sont exprimés en µM et sont représentés en moyennes ± SEM de 5 expériences indépendantes. Contrôle (*Empty vector*) : 224,4 ± 41,3 µM ; AC8E : 88,9 ± 23,2 µM ; AC3 : 648,4 ± 42,7 µM ; AC8E/AC3 : 334,5 ± 47,5 µM. L'analyse statistique est effectuée avec le test non paramétrique Mann-Whitney. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$; *ns* : non significatif.

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue en juin 2018 dans la revue Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research, de laquelle je suis deuxième auteur (***Article*** Vallin *et al.*, 2018).

BBA - Molecular Cell Research 1865 (2018) 1326–1340

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production

Benjamin Vallin[a], Yohan Legueux-Cajgfinger[a], Nathalie Clément[a], Martine Glorian[a], Laurent Duca[b], Pierre Vincent[a,*,1], Isabelle Limon[a,*,1], Régis Blaise[a,1]

[a] Sorbonne Université, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR CNRS 8256 Adaptation biologique et vieillissement (B2A), 75005 Paris, France

[b] UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne Ardenne (URCA), UMR CNRS 7369 Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Laboratoire Signalisation et Récepteurs Matriciels (SiRMa), Campus Moulin de la Housse, 51687 Reims, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Short adenylyl cyclases
cAMP signaling
Dominant-negative
Heterodimerization
Vascular smooth muscle cells

ABSTRACT

Here, we cloned a new family of four adenylyl cyclase (AC) splice variants from interleukin-1β (IL-1β)-trans-differentiated vascular smooth muscle cells (VSMCs) encoding short forms of AC8 that we have named "AC8E-H". Using biosensor imaging and biochemical approaches, we showed that AC8E-H isoforms have no cyclase activity and act as dominant-negative regulators by forming heterodimers with other full-length ACs, impeding the traffic of functional units towards the plasma membrane. The existence of these dominant-negative isoforms may account for an unsuspected additional degree of cAMP signaling regulation. It also reconciles the induction of an AC in transdifferentiated VSMCs with the vasoprotective influence of cAMP. The generation of alternative splice variants of ACs may constitute a generalized strategy of adaptation to the cell's environment whose scope had so far been ignored in physiological and/or pathological contexts.

1. Introduction

Cells responses to the environment depend on the expression and membrane localization of adenylyl cyclases (ACs), which, together with cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) and multidrug resistance-associated proteins (MRPs), are the principal enzymes controlling the cAMP signal. Nine membrane forms of AC have been identified in mammals, with discrete tissue distributions and unique regulatory properties, providing a potential focal point within the cell for the integration of diverse stimuli [1,2]. It has been shown that changes in the AC population expressed in hamster *vas deferens* smooth muscle cells modify the processing of stimulatory and inhibitory inputs from α_2-adrenoceptors [3]. In vascular smooth muscle cells (VSMCs), *i*) the effect of vasopressin on cAMP production induced by β-adrenoceptor activation depends on the nature of the Ca^{2+}-sensitive AC isoforms expressed [4], *ii*) AC6 but not AC1, 2 or 5 overexpression induces cAMP-dependent cytoskeletal reorganization [5], *iii*) AC6 promotes hyaluronan-mediated intimal thickening of the *ductus arteriosus*, whereas AC2 inhibits AC6-induced hyaluronan production [6].

We have shown *in vitro* that the transdifferentiation of rat VSMCs towards a migratory/inflammatory phenotype in response to the pro-atherogenic cytokine interleukin-1β (IL-1β) is dependent on the *de novo* expression of AC8 [7,8]. By contrast, in a non-inflammatory context, differentiated/contractile VSMCs mostly express AC isoforms 3, 5, and 6 [4,9]. In the rat carotid artery balloon injury model, we have demonstrated that post-angioplasty restenosis is associated with a marked transient upregulation of AC8 expression in VSMCs migrating to form the intimal cushion [10]. In a mouse model of atherosclerosis, knocking out the Adcy8 gene decreases the inflammation of the abdominal aorta (unpublished data) and atherosclerotic lesions [11]. We have expanded these *in vivo* findings by showing, on human samples, that neointimal VSMCs display high levels of AC8, whereas very few AC8-positive VSMCs are detected in the medial layer in either atherosclerotic or healthy arteries [10].

This increase in AC expression in transdifferentiated VSMCs (tdVSMCs) initially appeared counterintuitive. Indeed, increases in intracellular cAMP concentration ($[cAMP]_i$) have been shown to inhibit the migratory, proliferative and inflammatory properties of tdVSMCs [12–19]. In addition, several *in vivo* studies have shown that increases in $[cAMP]_i$ in tdVSMCs antagonize pathological vascular remodeling [20–23].

Four different splice variants of AC8, encoding the AC8A-D

* Corresponding authors.
E-mail addresses: pierre.vincent@upmc.fr (P. Vincent), isabelle.limon@upmc.fr (I. Limon).
[1] P.V, I.L and R.B equally contributed to this work.

https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.012
Received 29 January 2018; Received in revised form 15 June 2018; Accepted 20 June 2018
Available online 22 June 2018
0167-4889/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

isoforms, have been identified in humans, mice and/or rats so far [24–27]. AC8A-D all display different structure, subcellular location and enzymatic activity [24,26]. We show here that the ACs expressed *de novo* in IL-1β-tdVSMCs correspond to a family of short AC8 proteins derived from new AC8 splice variants that we have named "E" (accession number MH521156), "F" (accession number MH521157), "G" (accession number MH521158) and "H" (accession number MH521159) in accordance with the nomenclature of previously identified variants [24,26]. AC8E-H isoforms are catalytically inactive and act as dominant-negatives by dimerizing with endogenous full-length ACs and retaining them in the rough endoplasmic reticulum (RER), thereby reducing global cAMP production within the cell. The existence of these dominant-negative isoforms may account for an unsuspected additional degree of cAMP signaling regulation and reconcile the *de novo* expression of an AC with the transdifferentiation process of VSMCs.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), type I collagen from calf skin, poly-L-lysine, L-glutamine, penicillin, streptomycin, thapsigargin, isoproterenol and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) were purchased from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France. We obtained fetal calf serum (FCS) and collagenase from Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France and G418 from InvivoGen, San Diego, CA, USA. Elastase and the LightCycler 480 SYBR Green I Master mix were obtained from Roche Diagnostics, Meylan, France. Recombinant human IL-1β was purchased from PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France and forskolin (fsk) was obtained from Tocris Bioscience, Bristol, UK. Opti-MEM, Lipofectamine RNAiMAX, M-MLV reverse transcriptase, oligo (dT) primers, RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor, NuPAGE LDS sample buffer and polyacrylamide gels were obtained from Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France. We purchased the QIAquick gel extraction kit from Qiagen, Les Ulis, France. FuGENE HD, the ReliaPrep RNA Cell Miniprep System and GoTaq DNA polymerase were purchased from Promega, Charbonnières-les-Bains, France. Control and AC8 small interfering RNAs (siRNAs) were obtained from siTOOLs Biotech GmbH, Planegg, Germany. ArrayScript reverse transcriptase, Platinum SuperFi DNA polymerase, Halt protease inhibitor cocktail, EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin and streptavidin agarose resin were obtained from Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France. We purchased GelRed from Biotium, Fremont, CA, USA and oligonucleotides from Eurofins Genomics, Les Ulis, France. The DC protein assay and the Clarity western ECL substrate were purchased from Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France. Protein G PLUS-Agarose was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA and nitrocellulose membranes were purchased from Amersham, Courtaboeuf, France. N-glycosidase F was obtained from New England Biolabs, Évry, France. We obtained the cAMP - Gs HiRange kit from Cisbio Bioassays, Codolet, France and the Dako fluorescence mounting medium from Dako, Carpinteria, CA, USA.

2.2. Cell culture

Adult male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were ethically sacrificed by an intraperitoneal injection of pentobarbital (300 $mg \cdot kg^{-1}$) and VSMCs were isolated from thoracic aortas as previously described [7], according to European Directive 2010/63/EU and the rules laid down by the university ethics committee. Primary VSMC cultures were subcultured from passages 1 to 3 in culture dishes coated with type I collagen from calf skin. Cells were grown at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO_2, in DMEM containing 1 $g \cdot L^{-1}$ glucose, 4 mM L-glutamine, 10% FCS, 100 $U \cdot mL^{-1}$ penicillin and 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ streptomycin. VSMCs were starved by incubation for 12 h in serum-free DMEM before treatment with IL-1β (10 $ng \cdot mL^{-1}$) for 72 h.

HEK-293 cells were grown at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO_2, in DMEM containing 4.5 $g \cdot L^{-1}$ glucose, 4 mM L-glutamine, 5% FCS, 100 $U \cdot mL^{-1}$ penicillin and 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ streptomycin.

2.3. Transfection

Before transfection with siRNAs, VSMCs at 80% confluence were incubated for 2 h in antibiotic-free DMEM containing 1 $g \cdot L^{-1}$ glucose, 4 mM L-glutamine and 10% FCS. Cells were then transfected by adding 0.25% Lipofectamine RNAiMAX and 5 nM siRNAs diluted in 12.5% final Opti-MEM. Cells were transferred, 24 h after transfection, to starvation (serum-free) medium for 12 h. The AC8 siRNA is a mixture of 30 different siRNAs directed against mRNA regions conserved in all AC8 splice variants (reference sequence: NM_017142.1). The AC8E-H siRNA consists of 6 different siRNAs directed against the E5SS-3SS junction that is present only on AC8E-H mRNAs.

Plasmid transfection was systematically performed with HEK-293 cells at 80% confluence in complete growth medium and in the presence of FuGENE HD and Opti-MEM, according to the information provided in the FuGENE HD Protocol Database (Promega). Cells were systematically used 48 h post-transfection. Stable transfection was performed in the same complete growth medium supplemented with 0.8 $\mu g \cdot mL^{-1}$ G418 for one week and monoclonal cell populations were generated by limiting dilution.

2.4. Cloning strategies

To clone the AC8 splice variants expressed in IL-1β-tdVSMCs, cells were treated with IL-1β (10 $ng \cdot mL^{-1}$) for 72 h and total RNA was extracted with the ReliaPrep RNA Cell Miniprep System. Total RNA (1 μg) was then reverse-transcribed with ArrayScript reverse transcriptase and 2.5 μM oligo(dT) primers. The cDNAs encoding the rat AC8s were amplified with Platinum SuperFi DNA polymerase using phosphorylated forward and reverse primers (Table S1) binding to the 5′-untranslated region and the 3′-untranslated region of the rat AC8A cDNA (NM_017142.1), respectively. The final PCR products were visualized by electrophoresis in a 1% agarose gel. Amplicons of the expected size were purified with the QIAquick gel extraction kit and blunt-cloned into the *Eco*RV site of pcDNA3. Positive clones were sequenced and four cDNAs encoding AC8 were identified and named AC8E, F, G and H.

We obtained pcDNA3-VSV by inserting a double-stranded *Hin*dIII/*Kpn*I-compatible ends oligonucleotide adaptor (Table S1) containing the vesicular stomatitis virus glycoprotein epitope sequence (VSV) between the *Hin*dIII and *Kpn*I restriction sites of pcDNA3. AC8A, AC8E and AC8H coding sequences were amplified by PCR with primers deleting the translation start codon and conferring 5'-*Kpn*I and 3'-*Xba*I compatible ends (Table S1). The PCR fragments were inserted between the *Kpn*I and *Xba*I restriction sites of pcDNA3-VSV to generate plasmids encoding N-terminally VSV-tagged AC8A, AC8E and AC8H.

We generated the HA-AC3 expression vector by replacing the *Eco*RI/*Bam*HI fragment of pcDNA3-rAC3 (which includes the first 26 coding bases of AC3) with a double-stranded *Eco*RI/*Bam*HI-compatible ends oligonucleotide adaptator (Table S1) containing the human influenza hemagglutinin epitope sequence (HA) and the coding bases +3 to +29 of the rat AC3 sequence.

All clones and constructs were sequenced on both strands, by dye-labeling chain-terminator chemistry method, with an ABI 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

2.5. PCR

Total RNA was extracted with the ReliaPrep RNA Cell Miniprep System, according to the manufacturer's protocol. After annealing oligo (dT) primers (1 μM) to template RNAs (0.5–1 μM) at 70 °C for 5 min, we

initiated primer extension by adding M-MLV reverse transcriptase plus 0.5 mM dNTPs, 1 unit of RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor and 20 mM DTT, and incubated the reaction mixture for a further 60 min at 37 °C.

Quantitative PCR was performed with a LightCycler 480 instrument as described previously [28]. The forward and reverse primers used for selective amplification of the cDNAs encoding rat cyclophilin A, ACs and C-C motif chemokine ligand 3 (CCL3) are presented in Table S1. Real-time quantitative PCR data are presented as the amount of each target mRNA relative to the amount of mRNAs for the cyclophilin A housekeeping gene.

For the relative quantification of the various AC8 transcripts, cDNAs from rat brain and VSMCs (equivalent to 50 ng of total RNA) were amplified in a Prime Full Size Thermal Cycler (Techne, Stone, UK) with 1.25 U of GoTaq DNA polymerase, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP and 0.5 μM of forward and reverse primers. Equal loading of the reverse-transcribed mRNAs was controlled by amplifying GAPDH cDNAs in each sample. Primer pairs for PCR analysis were tested for self-complementarity, dimer formation and melting temperature with Serial Cloner 2-6-1 software. PCR was performed with the following thermal settings: denaturation and enzyme activation at 95 °C for 2 min, 25 to 33 cycles of 95 °C for 1 min, 58 to 64 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 5 min. The sizes of the amplified fragments were determined by GelRed staining after electrophoresis in a 2% agarose gel. The PCR fragments were visualized with an E-BOX VX5 digital image processor (Vilber Lourmat, Collégien, France) and signal intensity was determined with ImageJ software. The forward and reverse primers used for selective amplification of the AC8 and GAPDH cDNAs are presented in Table S1.

2.6. Preparation of cell lysates

HEK-293 cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), scraped into RIPA lysis buffer (25 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, Halt protease inhibitor cocktail) and subjected to three five-second bursts of sonication with a Sonifier 150 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA). The resulting cell lysates were briefly incubated on a rotating wheel for 15 min at 4 °C and then cleared by centrifugation (13,000 × *g* for 15 min at 4 °C). Protein concentrations were determined with the DC protein assay. Proteins were then mixed with the NuPAGE LDS sample buffer and denatured for 1 h at 37 °C before SDS-PAGE analysis.

When indicated, whole-cell lysates were treated with N-glycosidase F before electrophoresis. Briefly, proteins (20 μg) were denatured by heating at 100 °C for 10 min in 0.5% SDS and 40 mM DTT. Denatured proteins were incubated with 500 units of N-glycosidase F or the same volume of 50% glycerol (controls) in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% NP-40 for 1 h at 37 °C. Proteins were then mixed with the NuPAGE LDS sample buffer and incubated for 5 min at 100 °C before SDS-PAGE analysis.

2.7. Subcellular fractionation

HEK-293 cells grown in 10-cm dishes were washed with ice-cold PBS and lysed by passing 10 times through a 26-gauge needle in fractionation (F) buffer containing 20 mM HEPES pH 7.4, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and Halt protease inhibitor cocktail. The lysate was first centrifuged at 600 × *g* for 10 min. The supernatant (supernatant 1) was then centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min to isolate the heavy membrane pellet. The resulting supernatant 2 was centrifuged at 100,000 × *g* for 1 h in an Optima MAX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) to separate the light membrane pellet from the cytosolic fraction. The heavy and light membrane pellets were then resuspended in F buffer, passed 10 times through a 26-gauge needle and recentrifuged at the speeds indicated above. The resulting pellets, corresponding to the heavy membrane and light membrane fractions, were washed twice with PBS and resuspended in a final PBS buffer supplemented with 2% SDS.

2.8. Cell surface biotinylation

HEK-293 cells grown in 6-cm dishes were biotinylated in the presence of PBS+ (0.1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, pH 8.0) supplemented with 1.5 $mg{\cdot}mL^{-1}$ sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido) ethyl-1,3-dithiopropionate (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin) for 45 min at 4 °C. Cells were then incubated for another 45 min at 4 °C with a quenching solution containing PBS+ supplemented with 100 mM glycine. Cells were washed with PBS and solubilized in lysis buffer (20 mM Tris HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, Halt protease inhibitor cocktail). Biotinylated proteins were precipitated with streptavidin agarose resin suspended in 50 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, Halt protease inhibitor cocktail. Precipitated proteins were resuspended in 2× NuPAGE LDS sample buffer, denatured for 30 min at 37 °C and subjected to western blot.

2.9. Co-immunoprecipitation

HEK-293 cells grown in 10-cm dishes were washed with ice-cold PBS and lysed in 1 mL of solubilization (S) buffer (50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.3% NP40 and Halt protease inhibitor cocktail). After incubation for 15 min on a rotating wheel, the cell suspension was passed 10 times through a 21-gauge needle and centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min. The supernatant was then harvested, incubated on a rotating wheel for 1 h with 5 μL of anti-HA or anti-VSV antibody (Table S2) and then incubated overnight with 40 μL of 50% Protein G PLUS-Agarose bead slurry. Beads were washed five times in S buffer and complexes were eluted in 2× NuPAGE LDS sample buffer. The final eluate was vortexed vigorously and incubated for 1 h at 37 °C before western blot analysis.

2.10. Western blot

Proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked by incubation for 1 h at room temperature with tris-buffered saline (TBS) supplemented with 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dried milk. Then, membranes were successively incubated with the primary antibodies indicated in Table S2 and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies diluted in TBS supplemented with 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dried milk. Signals were detected by enhanced chemiluminescence using the Clarity western ECL substrate, on Fujifilm LAS-300 (Fujifilm Medical Systems, Standford, CT, USA). When indicated, we used β-actin detection to control for equal protein loading and transfer efficiency.

2.11. Immunocytochemistry

Cells were grown to subconfluence on collagen (VSMCs)- or poly-L-lysine (HEK-293)-coated coverslips and fixed by incubation with PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min. PFA was then neutralized by incubation for 10 min with PBS plus 50 mM NH_4Cl at room temperature. Cells were then permeabilized by incubation with PBS supplemented with 0.2% Triton X-100 for 5 min. Before immunodetection, non-specific sites were blocked by incubating cells in PBS supplemented with 5% donkey serum and 0.2% Triton X-100. Then, cells were successively incubated with the primary antibodies indicated in Table S2 and Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies diluted in PBS supplemented with 5% donkey serum. The coverslips were mounted in Dako fluorescence mounting medium. Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.12. Measurement of cAMP dynamics

Cells on collagen (VSMCs)- or poly-L-lysine (HEK-293)-coated coverslips were infected with the $^{T}Epac^{VV}$-encoding adenoviral vector (~100 particles per VSMC) or transfected with the $^{T}Epac^{VV}$-encoding vector (HEK-293) for 24 h. The generation of the $^{T}Epac^{VV}$-encoding adenovirus has been described elsewhere [28]. Coverslips were placed in a microscope chamber continually perfused (2 mL·min^{-1}) with BBS buffer (125 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1.25 mM NaH_2PO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 25 mM glucose) maintained at 32 °C and saturated with 95% O_2–5% CO_2. Ratiometric analyses were performed as follows: fluorescence was excited with a LED source at 435 nm and fluorescence emission was monitored with a dichroic mirror (T450LPXR) and alternating emission filters for the donor (HQ480/40) and acceptor (D535/40). Pairs of images were recorded with an Orca-ER CCD camera (Hamamatsu Photonics, Japan), at 20-s intervals. Changes in $[cAMP]_i$ are expressed as the ratio of donor fluorescence (F480) to acceptor fluorescence (F535). The ratios were multiplied by a same constant for all experiments, such that the baseline ratio was 1 in basal conditions. The maximum ratio change (Rmax) was obtained by stimulating cells with 10 μM fsk and 200 μM IBMX. Filters and mirrors were obtained from AHF analysentechnik AG, Tübingen, Germany.

2.13. cAMP accumulation assay

cAMP accumulation in whole-cell lysates was measured with the cAMP - Gs HiRange kit after incubation for 60 min with the PDE inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 500 μM) and the general AC activator forskolin (fsk, 10 μM), according to the manufacturer's instructions.

2.14. Statistics

All data are presented as the means ± SEM of at least three independent experiments. The statistical significance of differences between groups was assessed with GraphPad Prism 6 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The nonparametric two-tailed Mann-Whitney test was used for pairwise comparisons. The nonparametric two-tailed Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test were used for multiple comparisons. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. The AC8 molecules expressed in IL-1β-transdifferentiated VSMCs belong to a novel family of AC8 isoforms, all lacking the first five transmembrane domains

We previously showed that the *de novo* expression of AC8 is a key feature of rat VSMCs undergoing transdifferentiation (tdVSMCs) in response to IL-1β [7,8,10]. Four different splice variants of AC8, encoding the AC8A-D isoforms, have been identified [24–27]. AC8A is the full-length isoform. AC8B, C and D variants lack exon 11, exon 8 and both these exons, respectively. We cloned the AC8 cDNAs from rat VSMCs stimulated with IL-1β (10 ng·mL^{-1}) for 72 h. All 13 clones sequenced displayed a non-frameshift 414 bp deletion at the end of the exon 1, termed c.538_951del. The non-frameshift deletion stretches from a canonical alternative 5′ donor site in exon 1 (E5SS, changing the 3′ boundary of exon 1) to the 3′ acceptor splice site (3SS) of intron 1. Some cDNAs lack exon 8 and/or exon 11 (Figs. 1A and S1). Thus, IL-1β-tdVSMCs express a new family of four splice variants of the AC8 precursor mRNA named AC8E to H: the AC8E mRNA lacks only the end of exon 1, whereas the AC8F, G and H mRNAs also lack exon 8, exon 11, and both these exons, respectively (Fig. 1A).

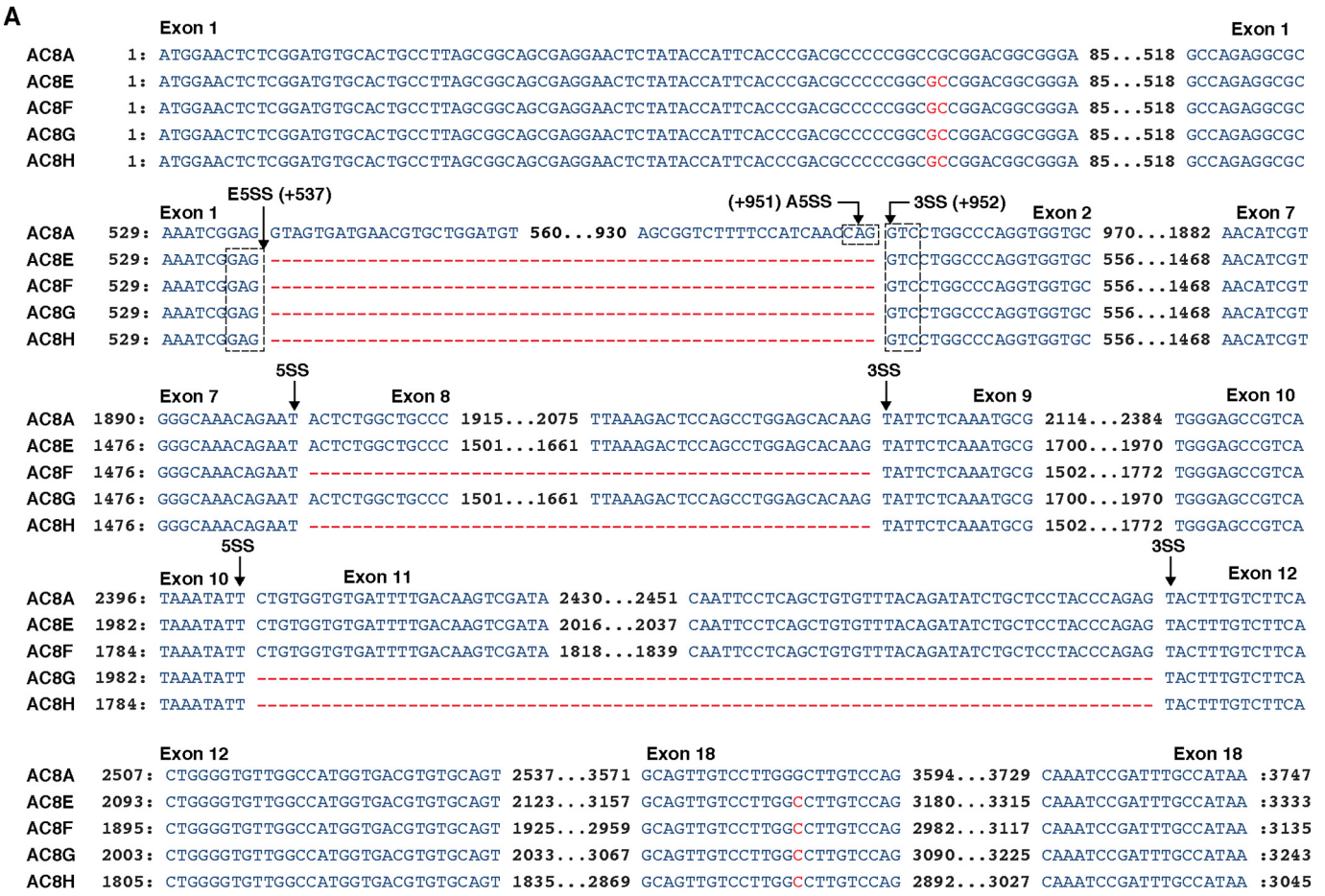
We then determined the relative abundances of AC8E-H transcripts and AC8A-D messengers (pooled together). We distinguished between these two pools of variants by amplifying cDNAs generated from IL-1β-tdVSMC mRNAs with forward (F) and reverse (R) primers annealing on either side of c.538_951del (Fig. 1B, left), assuming that the AC8E-H PCR products would be 395 bp long whereas the AC8A-D PCR products would be 800 bp long. We used cDNAs from contractile VSMCs and rat brain as negative and positive controls of AC8 expression. As expected [29], an intense 800 bp band was detected in brain samples, in which the 395 bp band was barely visible (Fig. 1B, middle); neither of these two bands was detected in contractile VSMC samples, confirming the lack of AC8 expression in these cells. In IL-1β-tdVSMC samples, the 395 bp PCR products relating to AC8E-H were highly abundant, whereas the 800 bp PCR products corresponding to AC8A-D were barely detectable. Based on a densitometric analysis of fluorescent amplicons, AC8E-H accounted for > 90% of total AC8 transcripts in IL-1β-tdVSMCs (Fig. 1B, right). Consistently, siRNAs specifically targeting AC8E-H (*i.e.* spanning the E5SS-3SS junction) and siRNAs targeting all AC8 splice variants decreased the expression of C-C motif chemokine ligand 3 (CCL3) and cyclooxygenase-2 (COX-2) to a similar extent (Fig. S2).

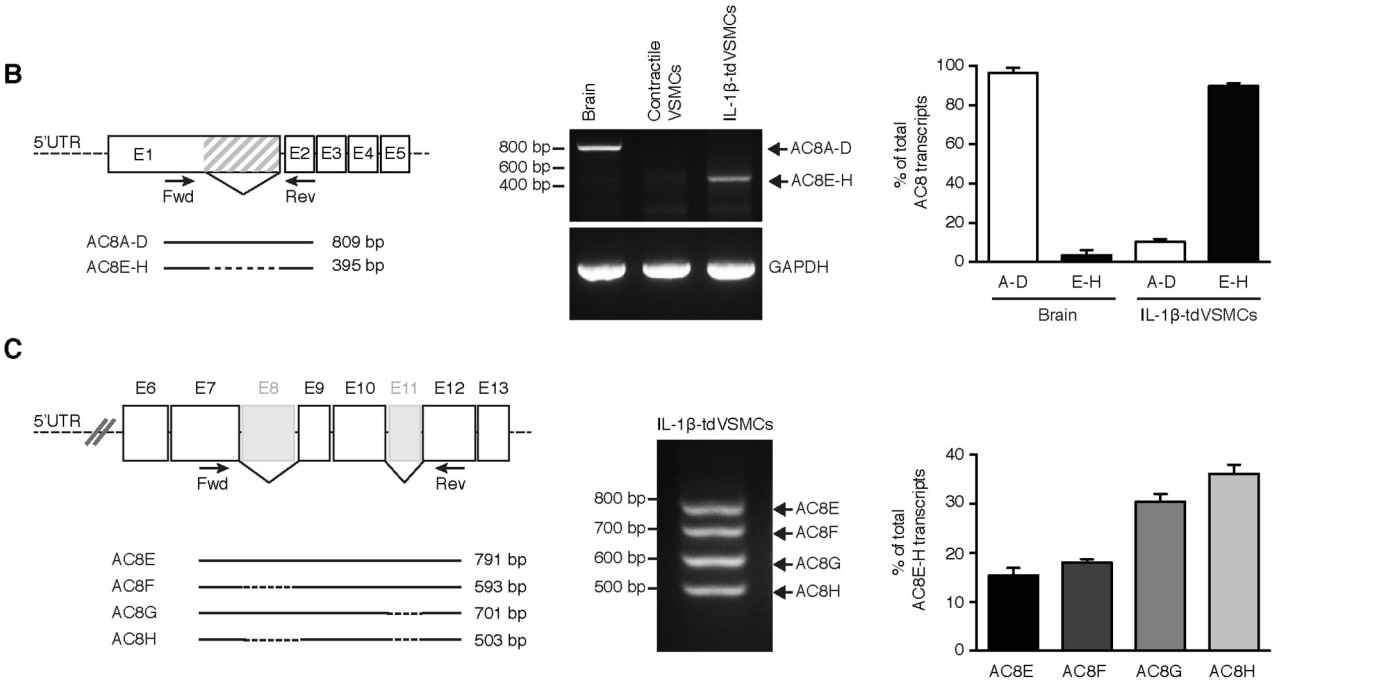
The relative abundances of AC8E to H variants were determined with forward (F) and reverse (R) primers binding to exons 7 and 12, respectively (Fig. 1C, left and middle). These amounts are expressed as percentages of total AC8E-H mRNAs: 15.5% for AC8E, 18% for AC8F, 30.5% for AC8G and 36% for AC8H in IL-1β-tdVSMCs (Fig. 1C, right). All the AC8E-H transcripts lack the 414 bp region encoding the putative first five transmembrane domains (TM) along with three extracellular and two intracellular loops of the enzyme (Figs. S1 and S3). The AC8F and AC8G mRNAs additionally lack either exon 8 (198 bp) encoding a 66-amino acid cytoplasmic domain corresponding to almost the entire C1b region, or exon 11 (90 bp) encoding a 30-amino acid extracellular domain corresponding to the TM9-10 loop with two functional sites for N-linked glycosylation, respectively [30]. AC8H displays all three deletions.

3.2. The de novo expression of AC8E-H in IL-1β-transdifferentiated VSMCs downregulates cAMP production

We then investigated a possible change in the dynamics of cAMP production associated with the *de novo* expression of AC8E-H in VSMCs, using the FRET-based biosensor $^{T}Epac^{VV}$ [31]. Rat VSMCs were transdifferentiated by IL-1β treatment (10 ng·mL^{-1}) for 72 h. Relative changes in $[cAMP]_i$ in response to the AC activator forskolin (fsk, 10 μM) were monitored over time, by calculating the ratio R of donor (F480 nm) to acceptor (F535 nm) fluorescence. cAMP level is reported as a percentage of the maximum ratio change (Rmax), corresponding to saturation of the biosensor. Rmax was systematically determined at the end of the experiment by adding 200 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), a broad-spectrum PDE inhibitor, in the presence of 10 μM fsk. In contractile VSMCs, fsk addition increased the mean fluorescence ratio to 96.9 ± 1.7% of Rmax (Fig. 2A). By contrast, cAMP responses barely reached 53.3 ± 6.6% of Rmax in IL-1β-tdVSMCs. At the start of the experiment, the baseline ratio was similar for contractile VSMCs and IL-1β-tdVSMCs (Fig. S4A). A similar decrease in cAMP responses was observed in IL-1β-tdVSMCs when the experiments were performed with isoproterenol (25 nM), a non-selective β-adrenoceptor agonist (Fig. S5).

We used a siRNA strategy to investigate whether the smaller increase in $[cAMP]_i$ in IL-1β-tdVSMCs was due to the *de novo* expression of AC8E-H (Fig. 2B). As expected, in IL-1β-tdVSMCs transfected with the control siRNA, the response to fsk was similar to that of untransfected IL-1β-tdVSMCs (46.0 ± 6.1 *vs.* 53.3 ± 6.6% of Rmax, Fig. 2A *vs.* Fig. 2B). However, a partial recovery of the cAMP responses was observed in IL-1β-tdVSMCs transfected with the AC8 siRNA: in these cells, fsk increased the fluorescence ratio to a significantly higher level than in IL-1β-tdVSMCs transfected with the control siRNA (65.5 ± 6.7 *vs.* 46.0 ± 6.1% of Rmax, Fig. 2B). Baseline ratios were similar in IL-1β-tdVSMCs transfected with the control siRNA and in IL-1β-tdVSMCs transfected with the AC8 siRNA (Fig. S4B). The efficacy





(caption on next page)

and specificity of the AC8 siRNA were demonstrated by real-time PCR 48 h post-transfection (Fig. S6). Together, these data demonstrate that the *de novo* expression of AC8E-H profoundly affects cAMP dynamics by reducing the increase in $[cAMP]_i$ in IL-1β-tdVSMCs. This reconciles the increased expression of AC8 in atherosclerotic vessels with the reduced cAMP levels required for the pathological proliferation and migration of inflammatory VSMCs.

Fig. 1. Four AC8 splice variants are expressed in IL-1β-transdifferentiated VSMCs.
A: Alignment of the AC8A reference sequence (NM_017142.1) with the AC8E-H coding sequences. Red dotted lines represent the nucleotide regions deleted in AC8E-H variants; black arrows indicate the 5′ donor sites (5SS) and the 3′ acceptor site (3SS) involved in alternative splicing; AC8E-H polymorphisms relative to the AC8A reference sequence (NM_017142.1) are marked in red.
B: Relative abundances of AC8E-H and AC8A-D transcripts in rat brain, contractile VSMCs and IL-1β-tdVSMCs assessed by conventional PCR. Left panel: diagram of the PCR strategy with primers annealing on either side of c.538_951del and expected PCR products. Middle panel: agarose gel of the resulting PCR products. Equal loading of the reverse-transcribed mRNAs was controlled by amplifying GAPDH cDNAs in each sample. Right panel: relative quantification of AC8A-D and AC8E-H mRNAs in brain and IL-1β-tdVSMCs, based on a densitometric analysis of fluorescent amplicons. Results are expressed in % of total AC8 transcripts and represent the means ± SEM of 4 independent experiments.
C: Relative abundances of the AC8E to H transcripts in IL-1β-tdVSMCs assessed by conventional PCR. Left panel: diagram of the PCR strategy with forward (F) and reverse (R) primers binding to exons 7 and 12 and expected PCR products. Middle panel: agarose gel of the resulting PCR products. Right panel: relative quantification of AC8E-H mRNAs in IL-1β-tdVSMCs. Results are expressed in % of total AC8E-H transcripts and represent the means ± SEM of 5 independent experiments.

3.3. Expression and localization of AC8E-H isoforms

The lack of the TM9-10 loop with two functional sites for N-linked glycosylation in AC8B reduces its expression relative to that of AC8A and AC8C [24]. Since AC8G and H both miss this N-glycosylated extracellular domain, we next analyzed in western blot the protein expression of AC8E-H from four different clones of stably transfected HEK cells (Fig. 3A). The antibody we used was raised against the C2b terminal domain, a region that remains present in AC8E-H isoforms. AC8E and AC8F clones expressed high protein levels. Consistently with the study of Cali et al. [24], we found that AC8G and AC8H were very poorly expressed.

Subcellular fractionation experiments demonstrated that AC8E-H isoforms still insert into cellular membranes (Fig. 3B). Indeed, AC8E-H and the full-length AC8A mainly concentrated in the heavy membrane fraction and were absent from the cytosolic fraction. Heavy membranes include the plasma, endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes, as attested by the levels of markers for these membranes, β1-integrin, calnexin and cyclooxygenase IV (COX IV), respectively, and the absence of β-actin, a cytosolic marker. In AC8A HEK samples (Fig. 3B), the immunoreactive bands between the 180 and 250 kDa molecular mass markers are of the size expected for AC8A monomers; the bands above 300 kDa are compatible with the predicted size of AC8A homodimers. In the samples derived from AC8E-H HEK, bands at or below 130 kDa and those around 300 kDa correspond to the monomeric and dimeric AC8E-H species, respectively (Fig. 3A and B). The anti-AC8 antibody does not cross-react with any endogenous AC, as no bands were detected in the control HEK samples (Fig. 3B).

Immunocytochemistry showed AC8A at the plasma membrane whereas AC8E-H were intracellular and extranuclear (Fig. 3C). Hence, AC8A but not AC8E was detected when purifying biotinylated cell surface proteins (Fig. 3D). Unfortunately, these results could not be confirmed in IL-1β-tdVSMCs due to the low expression level of endogenous AC8E which, along with the low efficiency of AC8 antibodies, led to insufficient signal-to-noise ratios. AC8E is unlikely targeted to mitochondria since it lacks the characteristic specific sequences (TargetP1.1, WoLF PSORT and Predotar 1.04 software). Consistent with AC8E-H progressing through the RER, the migration profile of AC8E was efficiently altered by the exposure of cell lysates to N-glycosidase F (Fig. S7). Interestingly, the migration patterns of AC8A and AC8E were differently sensitive to N-glycosidase F: whereas AC8A showed a continuum of molecular species indicative of partial deglycosylation, the treatment had a less pronounced effect on AC8E. Thus, AC8E likely possesses less diversified N-glycans motifs, in line with AC8E-H isoforms being, to some extent, stuck in the RER during the maturation process. In addition to demonstrating that AC8E and AC8F are the two most strongly expressed isoforms, these results indicate that AC8E-H are all retained in the RER during the maturation process and form intermolecular dimers.

3.4. The AC8E-F isoforms are catalytically dead and lower intracellular cAMP concentration

Consistently, only the expression of AC8E and AC8F in HEK cells significantly limits the increase in $[cAMP]_i$ in response to fsk as compared to pcDNA (control)-transfected cells (Fig. 4A). Indeed, the mean fluorescence ratio was 51.1 ± 4.1% and 57.2 ± 2.8% of Rmax in AC8E- and AC8F-transfected cells, respectively, whereas in control HEK cells or in AC8G- and AC8H-expressing cells it reached 87.8 ± 6.1%, 75.5 ± 2.5% and 76.6 ± 4.0% of Rmax, respectively. In AC8A-expressing HEK cells, fsk alone leads to biosensor saturation (101.0 ± 0.6% of Rmax); the basal ratio in AC8A HEK was higher than that in control HEK and AC8E-H HEK, consistent with the overexpression of AC8A increasing basal and induced cAMP production.

As shown previously [32], AC8A is activated by capacitative calcium entry (CCE). We next passively depleted calcium stores with the SERCA inhibitor thapsigargin (500 nM) in the absence of extracellular calcium (1 mM EGTA), and AC activity was jump-started with a low dose of fsk (10 nM). The addition of extracellular calcium (2 mM $CaCl_2$) led to CCE, which increased intracellular cAMP levels in AC8A- but not in control and AC8E-expressing cells (Fig. 4B). This additional experiment shows that AC8E does not exhibit the typical calcium-activated cyclase activity of AC8A. Overall, these results demonstrate that the c.538_951 deletion, despite lying outside the catalytic domains, kills the enzymatic activity of AC8E-H while retaining the ability to lower cAMP responses in AC8E and AC8F.

3.5. AC8E has a dominant-negative effect on endogenous AC activity

We hypothesized that AC8E-F expression reduces cAMP synthesis. We tested this hypothesis by focusing on AC8E as it displays the minimal deletion conferring the ability to restrain increases in $[cAMP]_i$. To do so, we monitored the speed of cAMP synthesis with the FRET-based biosensor $^{T}Epac^{VV}$ by stimulating ACs with a low dose of fsk (1 μM) while blocking PDEs with IBMX (200 μM) (Fig. 5A, upper and middle panels). The ratio increase depends on the buffering effect of the biosensor on cAMP, and a slower onset is expected when the biosensor is present at a higher concentration. Therefore, for each cell, we plotted the slope at the origin of the ratio increase as a function of fluorescence intensity, used as a proxy for biosensor concentration. For a same amount of biosensor, the initial slope of the ratio curve was shallower in AC8E HEK than in control HEK (Fig. 5A, lower panel). In contrast and as expected, cells expressing AC8A showed a dramatically fast response onset. Similar results were obtained when performing cAMP accumulation assays in whole-cell lysates. AC8E significantly downregulated, by more than three times, whereas AC8A increased, by the same factor, the accumulation of cAMP after a 60-min period of incubation with fsk (10 μM) plus IBMX (500 μM) as compared to control HEK cells (Fig. 5B). Altogether, these data demonstrate that the inactive AC8E isoform acts as a dominant-negative on endogenous AC activity.

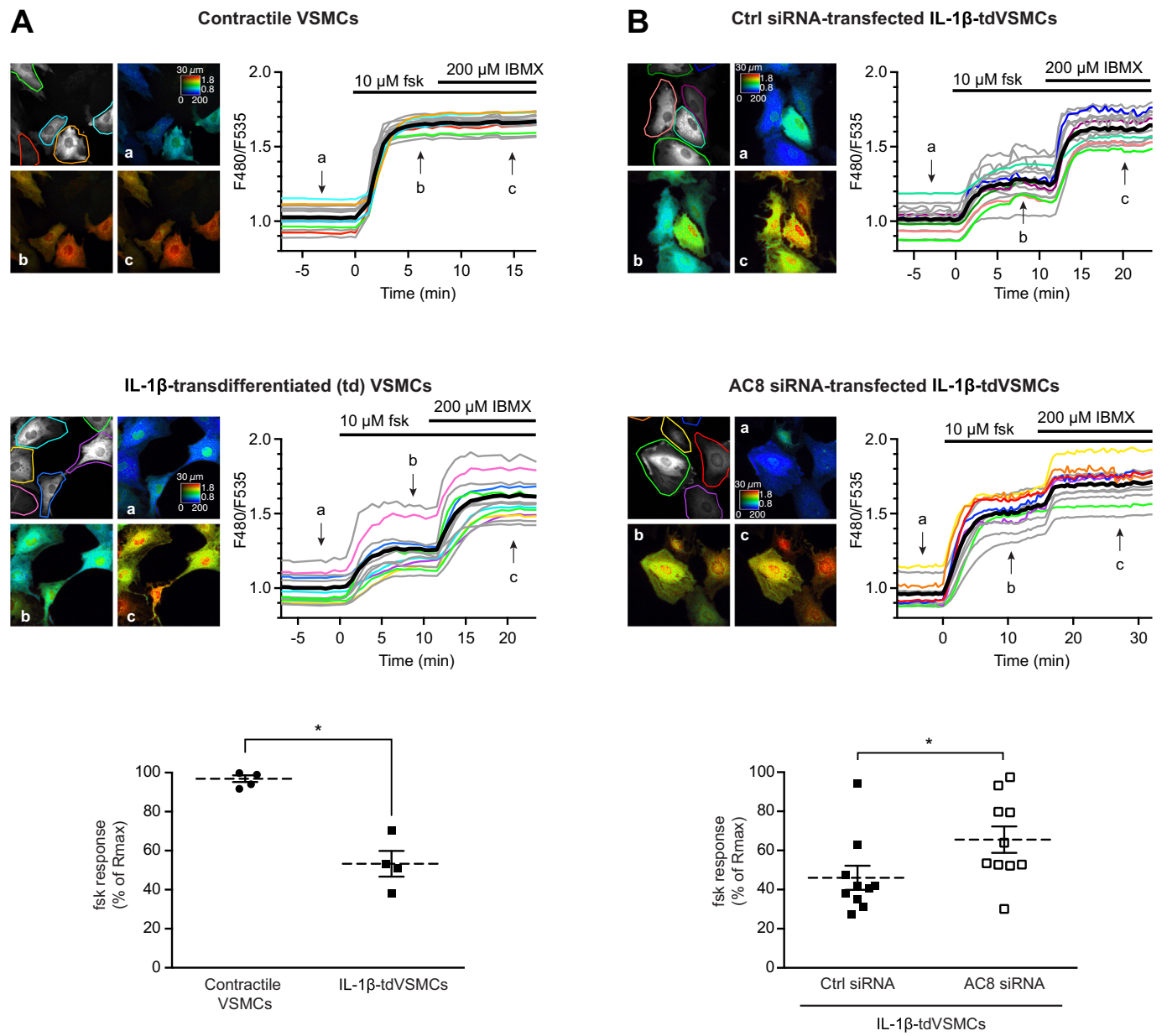
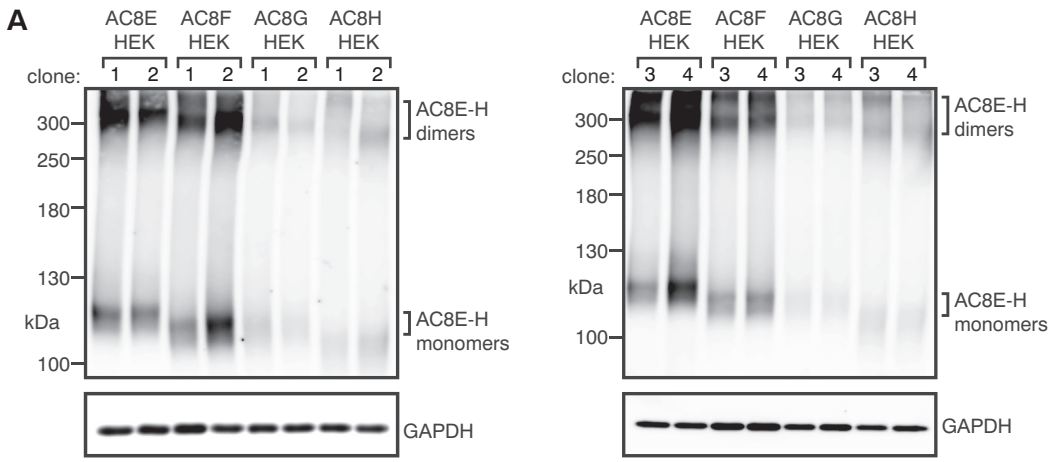
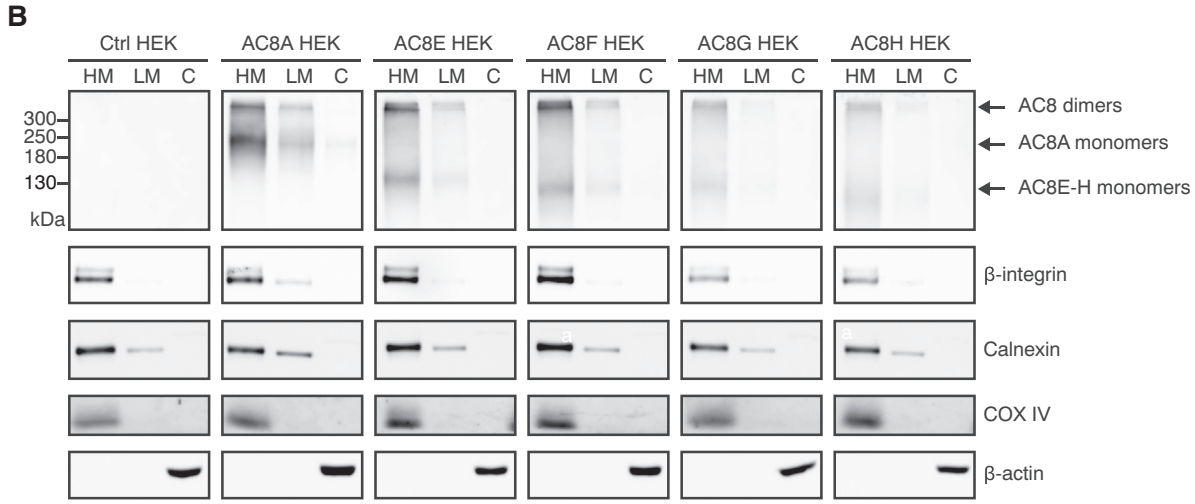


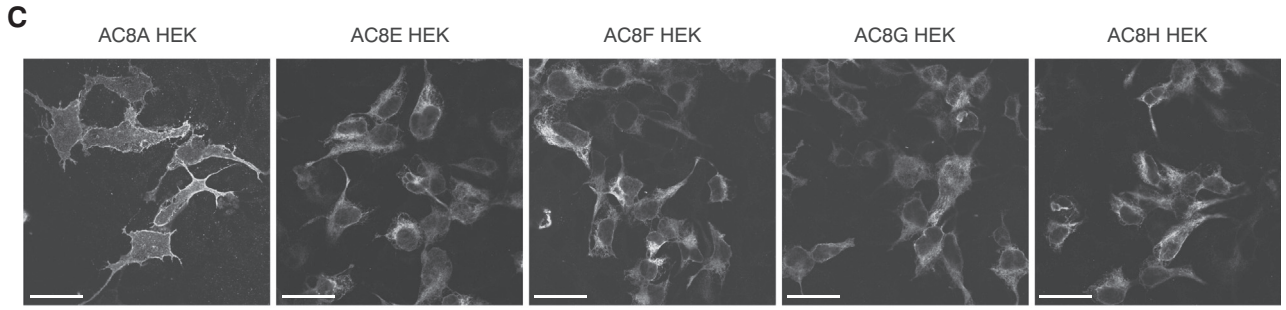
Fig. 2. The *de novo* expression of AC8E-H in IL-1β-transdifferentiated VSMCs reconfigures the dynamics of the cAMP signal.
A, B: Biosensor imaging of relative changes in $[cAMP]_i$ following treatment with fsk (10 μM) in contractile VSMCs *versus* IL-1β-tdVSMCs (A) and in Ctrl siRNA- *versus* AC8 siRNA-transfected IL-1β-tdVSMCs (B). Left panels: microscopy fields in grayscale (top left) showing biosensor crude fluorescence at 535 nm. The F480/F535 ratio was determined for individual cells, within regions of interest (ROIs) delimited with colored contours. The calibration square indicates the range of intensity (in counts/pixel/s) horizontally and the F480/F535 ratio vertically. Pseudocolored images represent the F480/F535 ratio indicating the $[cAMP]_i$ (a) before treatment, (b) during stimulation with fsk (10 μM) and (c) during the application of fsk (10 μM) + IBMX (200 μM). Right panels: traces indicate the F480/F535 emission ratio over time in the ROIs delimiting each cell. The black line represents the average of all traces. Gray traces correspond to the F480/F535 emission ratio of cells outside the displayed region. Lower panels: dot plot representing the mean values for fsk responses. Results are expressed as a percentage of the maximal ratio change (% of Rmax) determined by the final application of fsk (10 μM) + IBMX (200 μM). Data shown are the means ± SEM of at least $N = 4$ independent experiments performed on $n = 10$ to 20 individual cells. In (A), fsk responses were as follows: for contractile VSMCs: 96.9 ± 1.7%, $N = 5$; for IL-1β-tdVSMCs: 53.3 ± 6.6%, $N = 4$, $P = 0.0159$. In (B), fsk responses were as follows: for Ctrl siRNA-transfected IL-1β-tdVSMCs: 46.0 ± 6.1%, $N = 10$; for AC8 siRNA-transfected IL-1β-tdVSMCs: 65.5 ± 6.7%, $N = 10$, $P = 0.0288$. Side-by-side comparisons were performed with the Mann-Whitney test for unpaired data. *: $P < 0.05$.

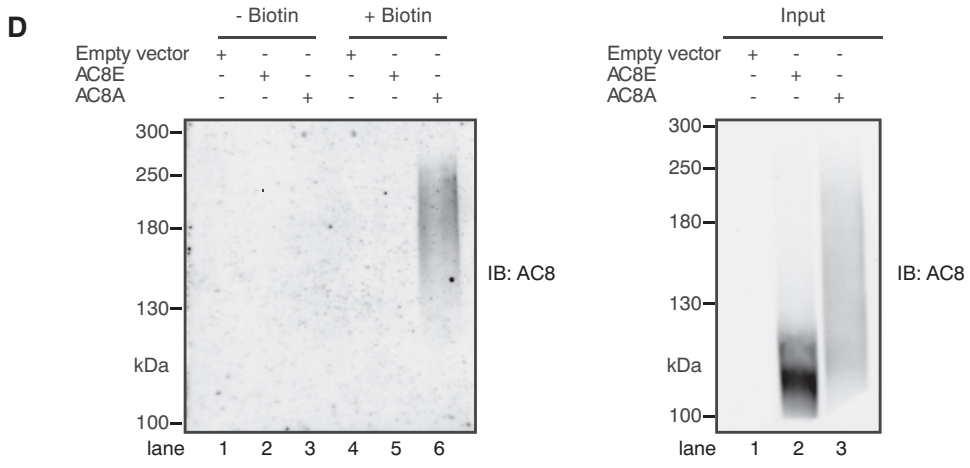
3.6. The dominant-negative effect of AC8E combines with direct AC interaction and the blocking of functional AC trafficking

Previous studies have shown that heteromeric complexes assemble between full-length ACs and engineered deletion mutants [33,34]. We next explored whether the dominant-negative AC8E isoform directly influences AC activity through heterodimer formation. We first assessed the ability of AC8E to interact with AC3, a major AC isoform expressed in VSMCs [4]. HEK cells were transfected with the VSV-tagged AC8E vector or the HA-tagged AC3 vector or both (Fig. 6A), and the interaction between these two proteins was assessed by co-immunoprecipitation. On western blots (Fig. 6B, upper left), after immunoprecipitation of the VSV-tagged AC8E, we detected an immunoreactive band with the anti-HA antibody above 270 kDa in samples from cells transfected with both the VSV- and HA-tagged constructs (lane 4). It corresponds to AC heterodimers containing glycosylated AC3 molecules. No bands were observed in the corresponding negative controls [cells transfected with either the VSV-AC8E (lane 3)









(caption on next page)

Fig. 3. Expression and localization of AC8E-H isoforms.
A: Western blot showing the stable expression of AC8E, F, G and H in HEK-293 cells. For each construct, four independent clones, numbered 1 to 4, were analyzed.
B: Western blot showing the subcellular distribution of AC8A and AC8E-H in heavy membranes (HM), light membranes (LM) and the cytosol (C). β-integrin, calnexin, cyclooxygenase IV (COX IV) and β-actin are markers of the plasma membrane, rough endoplasmic reticulum, mitochondria and cytosol, respectively.
C: Immunostaining showing the subcellular distribution of AC8A and AC8E-H in HEK-293 cells. Slides were analyzed with a Leica SP5 confocal microscope (63×). Scale bar = 50 μm.
D: Western blot analysis of cell surface biotinylated proteins purified from HEK-293 cells transfected with the empty vector or with AC8E- or AC8A-encoding plasmid and inputs. Right panel samples include non- or partially glycosylated AC8As of low molecular weight that are absent from the left panel samples, which only contain mature and fully glycosylated AC8As from the plasma membrane.
Data information: In (A–D), the western blot and immunofluorescence images shown are representative of at least 3 independent experiments. All AC8 immunodetections were performed with anti-AC8 (sc-1967) antibody.

or HA-AC3 (lane 2) construct or with the empty vector alone (lane 1)]. As expected, the anti-VSV antibody gave a similar pattern (Fig. 6B, lower left, lanes 3 and 4). Reverse co-immunoprecipitation with the anti-HA antibody for precipitation and the anti-VSV antibody for immunoblotting was just as effective (Fig. 6B, upper right).

This physical interaction translated into significantly lower levels of cAMP synthesis in response to fsk in cells co-expressing AC3 and AC8E than in cells expressing only AC3 (Figs. 6C, 4, *vs.* 3). Again, the expression of AC8E alone decreased the fsk-induced production of cAMP observed in pcDNA3 (control)-transfected cells (Figs. 6C, 2, *vs.* 1).

In addition, HA-AC3 was clearly present within the cell when co-expressed with VSV-AC8E, whereas it reached the plasma membrane when expressed with VSV-AC8A (Fig. 6D). The Pearson's colocalization coefficients with Costes'automatic thresholding were $r = 0.86$ for AC8A/AC3 and $r = 0.84$ for AC8E/AC3 (Fiji software, Coloc2 plugin). The mis-targeting of endogenous AC3 in IL-1β-tdVSMCs could not be clearly evidenced by immunocytochemistry due to the low expression level of AC3 and the low efficiency of AC3 antibodies leading to insufficient signal-to-noise ratios (Fig. S8).

Overall, these data demonstrate a dominant-negative effect of AC8E on AC3 function associated with a physical interaction between these two proteins, and they suggest that the AC8E-dependent decrease in cAMP synthesis is due to a loss of AC trafficking to the plasma membrane.

4. Discussion

The transdifferentiation process of medial VSMCs, which allows them to proliferate and migrate towards the intima, is a major cause of atherosclerosis and post-angioplasty restenosis. It has become clear that the contribution of VSMCs to atherosclerotic lesions has been greatly underestimated, because these cells may express macrophage, mesenchymal stem cell and/or myofibroblast markers in lesions [35]. Identification of the molecular mechanisms and entities driving changes in VSMC phenotype is therefore crucial for future drug development programs. Increases in intracellular cAMP concentration inhibit the proliferation and migration of mouse, rat and human VSMCs [12–18], thereby exerting a potent vasculoprotective influence [20–23]. In line with this, several studies have demonstrated that VSMCs undergoing transdifferentiation deploy strategies of cellular desensitization to cAMP signaling, including cAMP hydrolysis by PDEs [20,36–39] and cAMP extrusion by MRPs [23]. The importance of these mechanisms in counteracting the vasculoprotective influence of cAMP is underlined by the fact that PDE inhibitors already moved to human clinical trials and showed positive outcomes on post-angioplasty restenosis [40] and progression of atherosclerotic lesions in patients with type II diabetes [41].

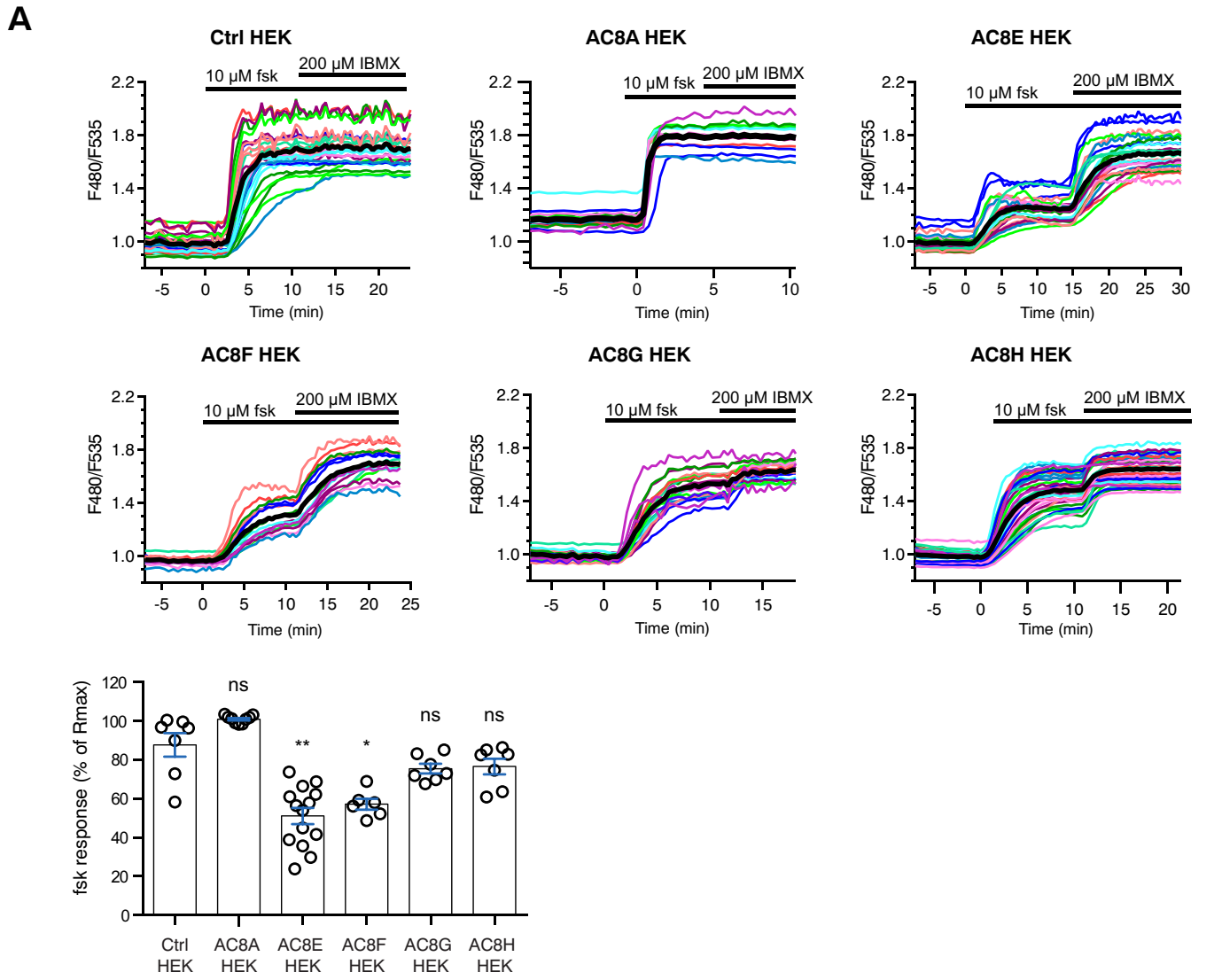
We show here that the IL-1β-dependent transdifferentiation of VSMCs is associated with the *de novo* expression of a new family (the E-H family) of AC8 isoforms. These isoforms are catalytically inactive and have dominant-negative effects, decreasing total cAMP production. The inhibitory effect of AC8E on AC activity is accompanied by the formation of heterodimers between AC8E and functional ACs. The *de novo* expression of AC8E-H in VSMCs is a novel mechanism of cAMP signaling inhibition complementary to those involving PDEs and MRPs. In our experiments, the induction of PDEs and/or MRPs in IL-1β-tdVSMCs could also explain why silencing of AC8 expression did not completely restore the cAMP responses to fsk as compared to contractile VSMCs (Fig. 1).

The lack of enzymatic activity of AC8E-H is consistent with the notion that the C1/C2 interaction forming the catalytic site is not the only one interaction required for cyclase activity, instead being promoted by an intramolecular interaction between intact M1 and M2 transmembrane cassettes [42,43]. The need of this intramolecular interaction also accounts for improper transfer of AC8E-H isoforms towards the plasma membrane [42].

AC molecules within homo- and heterodimers of ACs cross-regulate each other. This is well illustrated by *i*) the work of Baragli et al., showing that AC2 and 5 assemble *in vivo* and exhibit enhanced cyclase activity as compared to AC2/AC2 or AC5/AC5 homodimers [44], *ii*) the study of Gu et al., demonstrating that the co-expression of a full-length AC8 together with an inactive engineered mutant (lacking part of the catalytic C1 domain) suppresses its activity [34]. Therefore, the negative regulation of cAMP synthesis by AC8E-F in IL-1β-tdVSMCs is likely due to the ability of these isoforms to form complexes with endogenous full-length ACs. The findings of previous mutagenesis studies suggest that the region involved is the second transmembrane (M2) cassette [34,42]. The M2 hydrophobic cassette of AC8 contains seven SmxxxSm motifs (where Sm is a small residue: Gly, Ala, Ser or Thr) that have been proposed to drive TM helix dimerization in multi-pass proteins [45]. VSMCs mainly express AC3, 5 and 6 [4,9], all of which being capable of forming heterodimers with AC8 (Fig. 6B; [34]). Taking this supplementary information into account, we further propose that AC8E-F inhibit cAMP synthesis within IL-1β-tdVSMCs by acting on AC isoforms 3, 5 and 6.

The theoretical molecular weights of non-glycosylated monomeric AC8E-H range from only 114 to 125 kDa (SerialCloner software). We demonstrated that AC8E-H co-immunoprecipitate endogenous AKAP79 in HEK cells (Fig. S9). AKAP79 binds to the N-terminus of AC8A [46], which also interacts with calmodulin [47], Orai1 [48], PP2A [49] and the actin cytoskeleton [50]. Based on that and on additional studies assuming the existence of ACs oligomers [51,52], we suggest that the bands detected above 300 kDa in Fig. 3 and Fig. 6 correspond to multimeric complexes including more than two AC molecules and/or additional protein partners. A single molecule of AC8E-H interacting with more than one molecule of functional AC may explain why AC8E-F robustly decrease cAMP responses despite a relatively low expression level in IL-1β-tdVSMCs.

Intact M1 and M2 cassettes within a single unit are essential for the correct translocation of AC8A to the plasma membrane (Fig. 3C and D; [42]). The overall decrease in cAMP production may therefore be due to AC8E-H isoforms retaining full length ACs in the RER. Several lines of evidence suggest that this is probably the case: *i*) AC3 was excluded from the plasma membrane when co-expressed with AC8E (Fig. 6D); *ii*) Ding and collaborators have demonstrated that a truncated form of AC6, similar to the AC8E-H isoforms in the sense that it also lacks one of the two membrane cassettes, prevents full-length AC6 molecules from reaching the plasma membrane [33]. The RER is the seat of protein



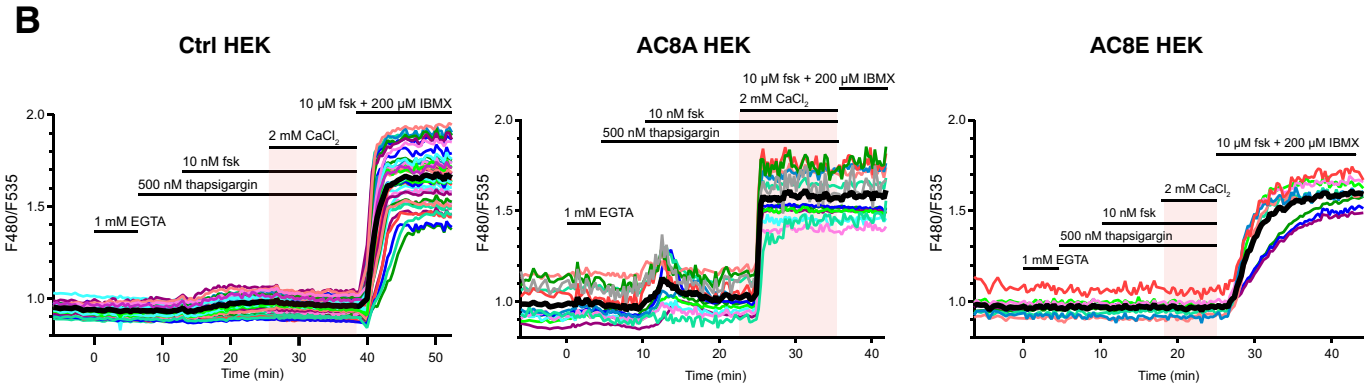
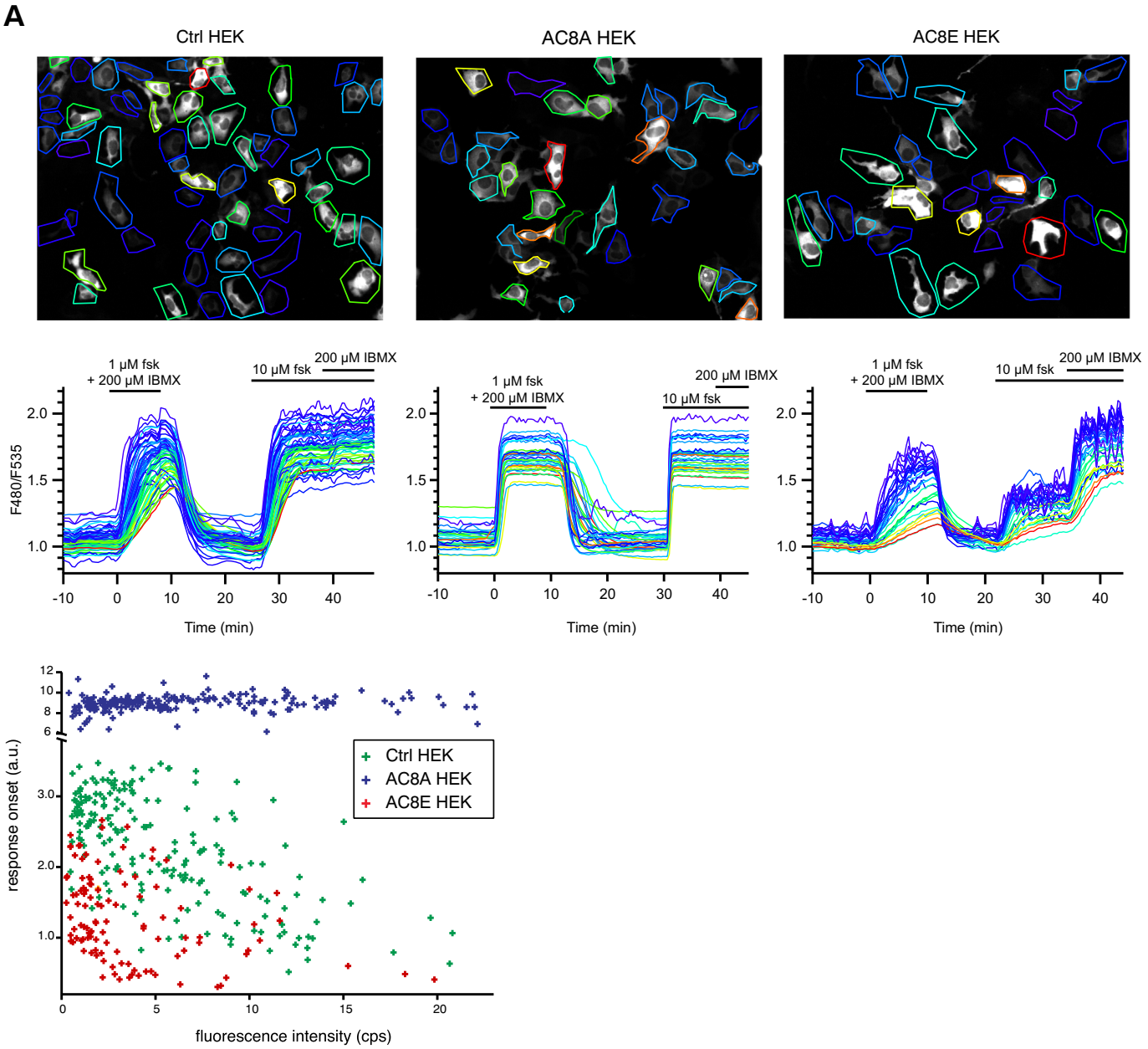


Fig. 4. The AC8E-F isoforms are inactive and prevent increases in cellular cAMP.

A: Biosensor imaging of relative changes in $[cAMP]_i$ following treatment with fsk (10 µM) in control HEK clones and in clones stably expressing AC8A or AC8E-H. The final application of fsk (10 µM) together with IBMX (200 µM) determined the maximal ratio change. Upper panels: each trace indicates the F480/F535 emission ratio over time in individual cells. The black line represents the average of all traces. Lower panel: dot plot and bars representing the mean values for fsk responses. Results are expressed as a percentage of the maximal ratio change (% of Rmax). Data shown are the means ± SEM of at least $N = 6$ independent experiments performed on independent clones. For each independent experiment, the calculated value represents the mean of $n = 10$ to 20 individual cells. Fsk responses were as follows: for control HEK: 87.8 ± 6.1%, $N = 7$; for AC8A HEK: 101.0 ± 0.6%, $N = 9$, $P = 0.6888$; for AC8E HEK: 51.1 ± 4.1%, $N = 14$, $P = 0.0030$; for AC8F HEK: 57.2 ± 2.8%, $N = 6$, $P = 0.0366$, for AC8G HEK: 75.5 ± 2.5%, $N = 7$, $P > 0.9999$; for AC8H HEK: 76.6 ± 4.0%, $N = 7$, $P > 0.9999$. Multiple comparisons to the control condition were performed with the Kruskal-Wallis test for unpaired data and Dunn's post-test. **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, ns: not significant.

B: Biosensor imaging of relative changes in $[cAMP]_i$ in response to capacitive calcium entry in control HEK, AC8A HEK and AC8E HEK. The final application of fsk (10 µM) together with IBMX (200 µM) determined the maximal ratio change. Each trace indicates the F480/F535 emission ratio over time in each cell. The black line represents the average of all traces. Data shown are representative of $N = 3$ independent experiments performed on $n = 10$ to 20 individual cells.



(caption on next page)

Fig. 5. AC8E expression reduces cAMP production.
A: Changes in $[cAMP]_i$ monitored with $^{T}Epac^{VV}$ in control (pcDNA3-transfected) HEK cells (left) or clones stably expressing AC8A (middle) or AC8E (right). A fast perfusion system was used to apply a low concentration of fsk (1 μM) to activate ACs moderately, in the presence of IBMX (200 μM) to block cAMP degradation by PDEs. After recovery, the final application of fsk (10 μM) together with IBMX (200 μM) determined the maximal ratio change. Upper panels: for each cell, biosensor concentration was estimated by measuring the intensity of the brightest 10% of the pixels within the region of interest. The color code of each ROI reflects biosensor concentration: from blue (low) to red (high). Middle panels: traces indicate the F480/F535 emission ratio over time in the ROIs delimiting each cell. Lower panel: onset slope of the fluorescence ratio for each cell plotted against fluorescence intensity (cps) reflecting biosensor expression level. Results of 3 independent experiments are shown.
B: cAMP accumulation assays on HEK cells transfected with empty vector (control), AC8A- or AC8E-encoding vector. Results are expressed in % of control and the means ± SEM of 5 independent experiments are shown. Values were as follows: for AC8A HEK: 336.2 ± 46.5%, $P = 0.0079$; for AC8E HEK: 37.8 ± 2.6%, $P = 0.0079$. Side-by-side comparisons were performed with the Mann-Whitney test for unpaired data. **: $P < 0.01$.

quality control, addressing misfolded proteins to the ubiquitin-proteasome pathway for degradation. We therefore hypothesize that the lower levels of cAMP production observed in AC8E-expressing cells might be due to the degradation of AC dimers *via* the ER-associated protein degradation (ERAD) system. This could partly explain our inability to detect endogenous AC8E-H proteins in IL-1β-tdVSMCs. In favor of that assumption, the truncated form of AC6 mentioned by Ding and collaborators not only alters the trafficking of full-length AC molecules but also decreases their protein expression level. Such process would amount to a hijacking of the RER protein quality control system from its original purpose, as it would prevent the trafficking of normal proteins to the plasma membrane. Together with alternative splicing, this may constitute a new type of mechanism for regulating protein levels and/or signaling in cells. Although such a regulatory mechanism has never been described before, a role of alternative RNA processing in specifying the post-endocytic sorting of G-protein-coupled receptors has already been established [53].

Our finding that AC8E is N-glycosylated suggests that the two unique functional glycosylation sites of the TM9-10 loop are located within the RER lumen during protein processing (Fig. S7). According to the charge balance rule [54,55], the net charge difference of the 15 amino acids surrounding each end of a transmembrane domain determines its orientation in the lipid bilayer, with the most positive neighboring region facing the cytosol. It has also been shown that *i*) predictive transmembrane domains with a low hydrophobicity may become extramembrane domains and *ii*) highly hydrophobic transmembrane domains stabilize neighboring transmembrane domains of low hydrophobicity [56]. From the charge balance rule, the glycosylation status and the hydrophobic profile of AC8E, one can assume that the remaining sixth transmembrane domain of the M1 cassette relocates to the cytosol and that the M2 cassette anchors to the RER membrane in the same orientation as AC8A. This is even more likely foreseen due to the fact that VSV-tagged AC8E molecules pulled-down endogenous AKAP79 in co-immunoprecipitation experiments, a cytosolic protein known to interact with the N-terminus of AC8A (Fig. S9). Based on that, and consistently with the study of Gu et al. [34], the whole N-terminus/TM6/C1 region of AC8E-H isoforms may be close enough (< 5 nm) to inhibit their AC partners whether by direct interaction or by causing steric hindrance.

The *de novo* expression of AC8E-H in IL-1β-tdVSMCs likely results from both transcriptional activation and splicing regulation. We suggest that the IL-1β-induced activation of the AC8 promoter is primarily cAMP-dependent. This assumption is based on the facts that only IL-1β- as opposed to TNF-α and IFN-γ- induces the *de novo* expression of AC8 (unpublished data) along with an increase in intracellular cAMP levels *via* PGE2 auto-secretion in rat VSMCs [28]. This is also consistent with previous studies of the mouse AC8 promoter that evidenced a cAMP response element (CRE) located 14 bp upstream of the putative transcription start site and required for basal and fsk-induced promoter activity [27,57]. This CRE is conserved in the rat and human AC8 promoters (FindM software, Eukaryotic Promoter Database). *In silico* analyses also brought out two highly conserved binding sites for AP-1 transcription factors and one E-box possibly interacting with HES7 and SNAI2 in the rat, mouse and human AC8 promoters. These motifs are located 3464 bp, 2244 bp and 1634 bp upstream of the rat translation start site, respectively. AP-1 dimers are transcriptional activators induced by inflammation while HES7 is a transcriptional repressor activated by the Notch signaling pathway. Consistently, we showed that AC8 induction in IL-1β-tdVSMCs partly depends on Notch signaling inhibition [8]. SNAI2 can act as a repressor or an activator of transcription and participates in epithelial–mesenchymal transition (EMT) [58]. Its implication in AC8E-H expression, although attractive since EMT and VSMC transdifferentiation may involve comparable mechanisms, remains to be explored.

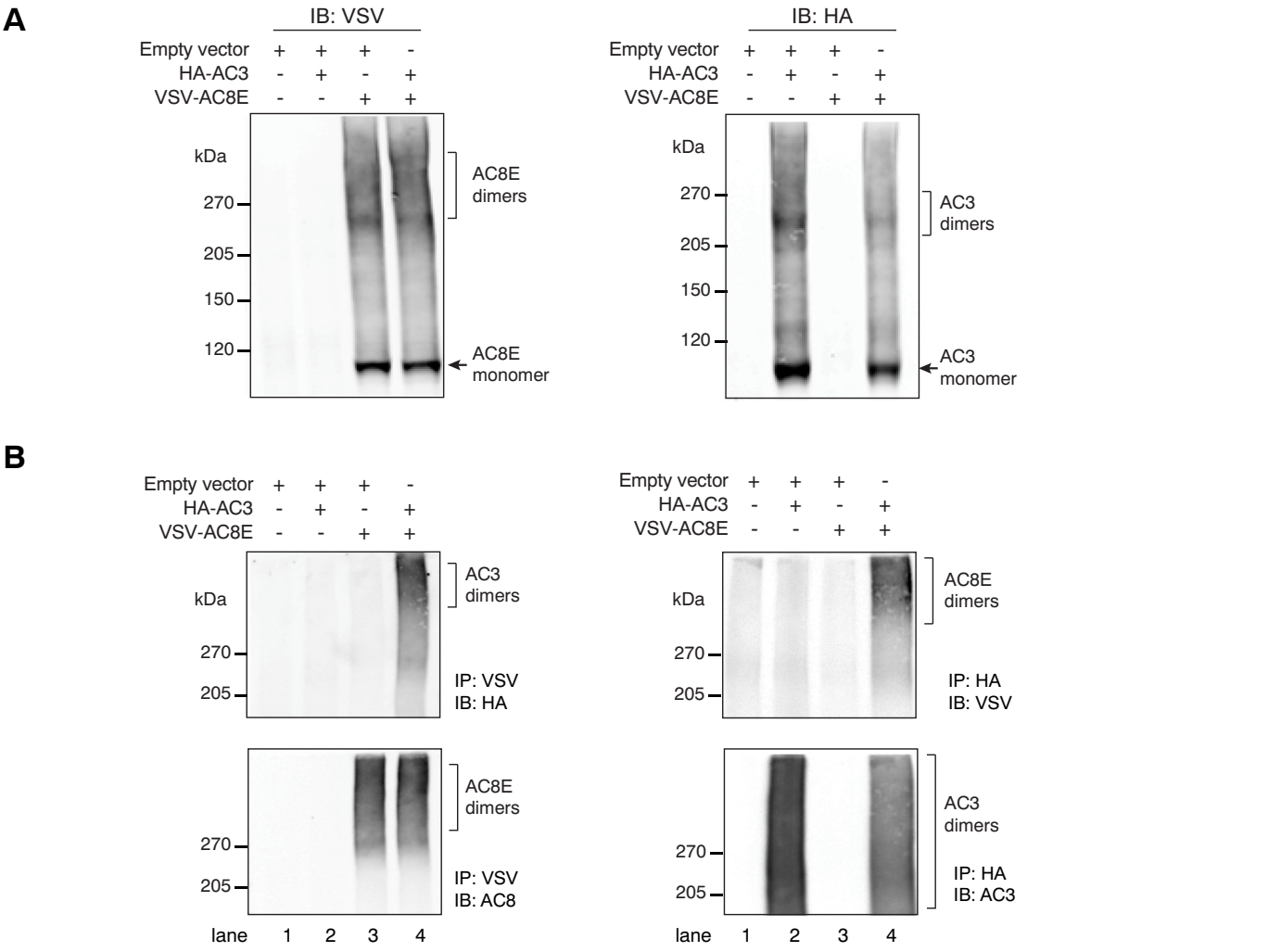
The rat AC8 pre-mRNA is spliced into AC8E-H *via* an alternative 5′ donor splice site (E5SS) that is conserved in humans (bp 547 to 555 in exon 1; Human Splicing Finder 3.1 software). The analysis of the exon 1 in both species revealed potential exonic splicing enhancer (ESE) motifs for serine/arginine-rich (SR) splicing factors in close proximity to the E5SS. In particular, we observed several putative binding sites for the serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1), which is known to participate in pressure-overload cardiac hypertrophy [59]. Whether SFRF1 and other splicing factors involved in the phenotypic modulation of VSMCs such as Quaking and ADAR1 [60,61] participate in AC8 pre-mRNA processing is currently under investigation.

Our discovery of novel AC splice variants specifically expressed in the pathological context of vascular remodeling is relevant to various diseases related to splicing defects, including cancers and neurological diseases [62]. The generation of AC alternative splice variants may therefore be part of a more general strategy of adaptation to the cell's environment, the scope of which was previously unknown. Consistent with this, Katsushika and collaborators have described an AC5-alpha subvariant in dog heart encoding only the first half of the enzyme [63]. This variant is of particular interest because the heterodimerization motifs of the AC6 isoform, which belongs to the same family as AC5, appeared to be located in the M1 cassette [33]. There is growing evidence in favor of a functional impact of splice variants [64,65] but the causal contribution of disease-associated splice variants to the disease remains unclear in most cases. The functional assessment of AC5 and 8 splice variants in the heart and vessels could pave the way for further studies of the splice variants specifically expressed in a pathological context.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.012.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.



(caption on next page)

Fig. 6. AC8E heterodimerizes with AC3 and inhibits AC activity.
A: Western blots showing AC8E (left panel) and AC3 (right panel) levels in HEK-293 cells transiently expressing VSV-AC8E and/or HA-AC3, probed with anti-VSV and anti-HA antibodies.
B: Western blots showing co-immunoprecipitation results. Immunoprecipitations (IPs) were performed with anti-VSV (left panel) and anti-HA (right panel) antibodies. Immunoblots (IBs) were performed with anti-AC8 (sc-1967) or anti-VSV antibodies to detect AC8E, and with anti-AC3 (sc-588) or anti-HA antibodies to detect AC3.
C: cAMP accumulation assays on HEK cells transfected with empty vector and/or AC8E-encoding vector and/or AC3-encoding vector, after 60 min of treatment with fsk (10 μM) plus IBMX (500 μM). Results are expressed in μM and represent the means ± SEM of 5 independent experiments. Values were as follows: for empty vector-transfected HEK: 224.4 ± 41.3 μM; for AC8E-expressing HEK: 88.9 ± 23.2 μM, $P = 0.0159$; for AC3-expressing HEK: 648.4 ± 42.7 μM, $P = 0.0079$; for AC8E/AC3-expressing HEK: 334.5 ± 47.5 μM, $P = 0.0952$ when compared to control cells and $P = 0.0079$ when compared to AC3-expressing cells. Side-by-side comparisons were performed with the nonparametric Mann-Whitney test for unpaired data. **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, ns: not significant.
D: Immunostaining of HEK-293 cells transfected with plasmids encoding HA-tagged AC3 and VSV-tagged AC8A or AC8E. Detections were performed with anti-HA and anti-VSV antibodies. Confocal images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (63×). Scale bar = 25 μm.
Data information: In (A), (B) and (D), the western blot and immunofluorescence images shown are representative of at least 3 independent experiments.

Acknowledgments

We would like to thank S. Bolte and JF. Gilles from the imaging facility of the Paris-Seine Biological Institute (IBPS), C. Dessauer for providing the AC3 construct, JB. Klarenbeek for providing the $^{T}Epac^{VV}$ expression plasmid, M. Babiak and E. Saylam for technical assistance in western blot and PCR experiments of the revised manuscript.

This work was supported by ANR grant 11BSV103401, the Lefoulon-Delalande Foundation, the French Federation of Cardiology (FFC), the *Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose* (NSFA), the *Société Française de Cardiologie* (SFC) and the *Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire* (GRRC).

Author contributions

R.B and I.L came up with the initial concept for this study. B.V, Y.L-C and R.B performed the key experiments. N.C constructed the $^{T}Epac^{VV}$-encoding adenovirus. M.G performed some of the PCR experiments. B.V, P.V, I.L and R.B designed the study and the experiments and B.V, L.D, P.V, R.B and I.L interpreted the data. B.V, R.B, P.V and I.L wrote the manuscript. Experiments were performed in the laboratories of P.V and I.L.

Conflict of interest

None declared.

References

[1] N. Defer, M. Best-Belpomme, J. Hanoune, Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase, Am. J. Physiol. Ren. Physiol. 279 (2000) F400–F416.
[2] R.K. Sunahara, C.W. Dessauer, A.G. Gilman, Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36 (1996) 461–480, http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.002333.
[3] A. Marjamaki, M. Sato, R. Bouet-Alard, Q. Yang, I. Limon-Boulez, C. Legrand, S.M. Lanier, Factors determining the specificity of signal transduction by guanine nucleotide-binding protein-coupled receptors. Integration of stimulatory and inhibitory input to the effector adenylyl cyclase, J. Biol. Chem. 272 (1997) 16466–16473.
[4] J.G. Webb, P.W. Yates, Q. Yang, Y.V. Mukhin, S.M. Lanier, Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 281 (2001) H1545–H1552.
[5] R. Gros, Q. Ding, J. Chorazyczewski, J.G. Pickering, L.E. Limbird, R.D. Feldman, Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization, Circ. Res. 99 (2006) 845–852, http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000245189.21703.c0.
[6] U. Yokoyama, S. Minamisawa, A. Katayama, T. Tang, S. Suzuki, K. Iwatsubo, S. Iwasaki, R. Kurotani, S. Okumura, M. Sato, S. Yokota, H.K. Hammond, Y. Ishikawa, Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus, Circ. Res. 106 (2010) 1882–1892, http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214924.
[7] N. Clément, M. Glorian, M. Raymondjean, M. Andréani, I. Limon, PGE2 amplifies the effects of IL-1beta 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 (2006) 495–505, http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20673.
[8] Z. Keuylian, J.H.F. de Baaij, M. Gueguen, M. Glorian, C. Rouxel, E. Merlet, L. Lipskaia, R. Blaise, V. Mateo, I. Limon, The Notch pathway attenuates interleukin 1β (IL1β)-mediated induction of adenylyl cyclase 8 (AC8) expression during vascular smooth muscle cell (VSMC) trans-differentiation, J. Biol. Chem. 287 (2012) 24978–24989, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.292516.
[9] R.S. Ostrom, X. Liu, B.P. Head, C. Gregorian, T.M. Seasholtz, P.A. Insel, 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 (2002) 983–992.
[10] M. Gueguen, Z. Keuylian, V. Mateo, N. Mougenot, A.-M. Lompré, J.-B. Michel, O. Meilhac, L. Lipskaia, I. Limon, Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling, J. Pathol. 221 (2010) 331–342, http://dx.doi.org/10.1002/path.2716.
[11] M. Gueguen, B. Vallin, M. Glorian, R. Blaise, I. Limon, Adénylyl cyclases et transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires: rôle dans le remodelage vasculaire pathologique, Biol. Aujourdhui 210 (2016) 153–166, http://dx.doi.org/10.1051/jbio/2016020.
[12] J.S. McKean, F. Murray, G. Gibson, D.A. Shewan, S.J. Tucker, G.F. Nixon, The cAMP-producing agonist beraprost inhibits human vascular smooth muscle cell migration via exchange protein directly activated by cAMP, Cardiovasc. Res. 107 (2015) 546–555, http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvv176.
[13] R.C. Hewer, G.B. Sala-Newby, Y.-J. Wu, A.C. Newby, M. Bond, PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation, J. Mol. Cell. Cardiol. 50 (2011) 87–98, http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.010.
[14] P.K. Vadiveloo, E.L. Filonzi, H.R. Stanton, J.A. Hamilton, G1 phase arrest of human smooth muscle cells by heparin, IL-4 and cAMP is linked to repression of cyclin D1 and cdk2, Atherosclerosis 133 (1997) 61–69.
[15] N. Begum, S. Hockman, V.C. Manganiello, 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 (2011) 26238–26249, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.214155.
[16] S. Hayashi, R. Morishita, H. Matsushita, H. Nakagami, Y. Taniyama, T. Nakamura, M. Aoki, K. Yamamoto, J. Higaki, T. Ogihara, Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21, Hypertension 35 (2000) 237–243 Dallas Tex. 1979.
[17] D. Palmer, K. Tsoi, D.H. Maurice, Synergistic inhibition of vascular smooth muscle cell migration by phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 inhibitors, Circ. Res. 82 (1998) 852–861.
[18] S.J. Netherton, S.L. Jimmo, D. Palmer, D.G. Tilley, H.A. Dunkerley, D.R. Raymond, J.C. Russell, P.M. Absher, E.H. Sage, R.B. Vernon, D.H. Maurice, Altered phosphodiesterase 3-mediated cAMP hydrolysis contributes to a hypermotile phenotype in obese JCR:LA-cp rat aortic vascular smooth muscle cells: implications for diabetes-associated cardiovascular disease, Diabetes 51 (2002) 1194–1200.
[19] A. Chatterjee, A. Sharma, M. Chen, R. Toy, G. Mottola, M.S. Conte, The pro-resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways in vascular smooth muscle and endothelial cells, PLoS One 9 (2014) e113480, , http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113480.
[20] Y. Cai, D.J. Nagel, Q. Zhou, K.D. Cygnar, H. Zhao, F. Li, X. Pi, P.A. Knight, C. Yan, Role of cAMP-phosphodiesterase 1C signaling in regulating growth factor receptor stability, vascular smooth muscle cell growth, migration, and neointimal hyperplasia, Circ. Res. 116 (2015) 1120–1132, http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304408.
[21] C. Indolfi, E. Di Lorenzo, A. Rapacciuolo, A.M. Stingone, E. Stabile, A. Leccia, D. Torella, R. Caputo, F. Ciardiello, G. Tortora, M. Chiariello, 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo, J. Am. Coll. Cardiol. 36 (2000) 288–293.
[22] Y. Inoue, K. Toga, T. Sudo, K. Tachibana, S. Tochizawa, Y. Kimura, Y. Yoshida, H. Hidaka, Suppression of arterial intimal hyperplasia by cilostamide, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 inhibitor, in a rat balloon double-injury model, Br. J. Pharmacol. 130 (2000) 231–241, http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0703287.
[23] Y. Sassi, L. Lipskaia, G. Vandecasteele, V.O. Nikolaev, S.N. Hatem, F. Cohen Aubart, F.G. Russel, N. Mougenot, C. Vrignaud, P. Lechat, A.-M. Lompré, J.-S. Hulot, Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation, J. Clin. Invest. 118 (2008) 2747–2757, http://dx.doi.org/10.1172/JCI35067.
[24] J.J. Cali, R.S. Parekh, J. Krupinski, Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca2+/calmodulin, J. Biol. Chem.

271 (1996) 1089–1095.
[25] N. Defer, O. Marinx, D. Stengel, A. Danisova, V. Iourgenko, I. Matsuoka, D. Caput, J. Hanoune, Molecular cloning of the human type VIII adenylyl cyclase, FEBS Lett. 351 (1994) 109–113.
[26] D. Delmeire, D. Flamez, S.A. Hinke, J.J. Cali, D. Pipeleers, F. Schuit, Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1, Diabetologia 46 (2003) 1383–1393, http://dx.doi.org/10.1007/s00125-003-1203-8.
[27] L.M. Muglia, M.L. Schaefer, S.K. Vogt, G. Gurtner, A. Imamura, L.J. Muglia, The 5′-flanking region of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene imparts tissue-specific expression in transgenic mice, J. Neurosci. 19 (1999) 2051–2058.
[28] K. Blirando, R. Blaise, N. Gorodnaya, C. Rouxel, O. Meilhac, P. Vincent, I. Limon, The stellate vascular smooth muscle cell phenotype is induced by IL-1β via the secretion of PGE2 and subsequent cAMP-dependent protein kinase A activation, Biochim. Biophys. Acta 1853 (2015) 3235–3247, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.019.
[29] A.C. Conti, J.W. Maas, L.M. Muglia, B.A. Dave, S.K. Vogt, T.T. Tran, E.J. Rayhel, L.J. Muglia, Distinct regional and subcellular localization of adenylyl cyclases type 1 and 8 in mouse brain, Neuroscience 146 (2007) 713–729, http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.045.
[30] M. Pagano, M.A. Clynes, N. Masada, A. Ciruela, L.-J. Ayling, S. Wachten, D.M.F. Cooper, Insights into the residence in lipid rafts of adenylyl cyclase AC8 and its regulation by capacitative calcium entry, Am. J. Phys. Cell Phys. 296 (2009) C607–C619, http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00488.2008.
[31] J.B. Klarenbeek, J. Goedhart, M.A. Hink, T.W.J. Gadella, K. Jalink, A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range, PLoS One 6 (2011) e19170, , http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019170.
[32] A.C.L. Martin, D. Willoughby, A. Ciruela, L.-J. Ayling, M. Pagano, S. Wachten, A. Tengholm, D.M.F. Cooper, Capacitative Ca2+ entry via Orai1 and stromal interacting molecule 1 (STIM1) regulates adenylyl cyclase type 8, Mol. Pharmacol. 75 (2009) 830–842, http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.051748.
[33] Q. Ding, R. Gros, J. Chorazyczewski, S.S.G. Ferguson, R.D. Feldman, Isoform-specific regulation of adenylyl cyclase function by disruption of membrane trafficking, Mol. Pharmacol. 67 (2005) 564–571, http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.006817.
[34] C. Gu, J.J. Cali, D.M.F. Cooper, Dimerization of mammalian adenylate cyclases, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 413–421.
[35] L.S. Shankman, D. Gomez, O.A. Cherepanova, M. Salmon, G.F. Alencar, R.M. Haskins, P. Swiatlowska, A.A.C. Newman, E.S. Greene, A.C. Straub, B. Isakson, G.J. Randolph, G.K. Owens, KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis, Nat. Med. 21 (2015) 628–637, http://dx.doi.org/10.1038/nm.3866.
[36] S.D. Rybalkin, K.E. Bornfeldt, W.K. Sonnenburg, I.G. Rybalkina, K.S. Kwak, K. Hanson, E.G. Krebs, J.A. Beavo, Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2611–2621, http://dx.doi.org/10.1172/JCI119805.
[37] S.D. Rybalkin, I. Rybalkina, J.A. Beavo, K.E. Bornfeldt, Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation, Circ. Res. 90 (2002) 151–157.
[38] D.G. Tilley, D.H. Maurice, Vascular smooth muscle cell phenotype-dependent phosphodiesterase 4D short form expression: role of differential histone acetylation on cAMP-regulated function, Mol. Pharmacol. 68 (2005) 596–605, http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.014126.
[39] M.D. Houslay, The long and short of vascular smooth muscle phosphodiesterase-4 as a putative therapeutic target, Mol. Pharmacol. 68 (2005) 563–567, http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.015719.
[40] J.S. Douglas, D.R. Holmes, D.J. Kereiakes, C.L. Grines, E. Block, Z.M.B. Ghazzal, D.C. Morris, H. Liberman, K. Parker, C. Jurkovitz, N. Murrah, J. Foster, P. Hyde, G.B.J. Mancini, W.S. Weintraub, Cilostazol for Restenosis Trial (CREST) Investigators, Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol, Circulation 112 (2005) 2826–2832, http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.530097.
[41] N. Katakami, Y.-S. Kim, R. Kawamori, Y. Yamasaki, 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 (2010) 2584–2591, http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.892414.
[42] C. Gu, A. Sorkin, D.M. Cooper, Persistent interactions between the two transmembrane clusters dictate the targeting and functional assembly of adenylyl cyclase, Curr. Biol. 11 (2001) 185–190.
[43] T. Seebacher, J.U. Linder, J.E. Schultz, An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity, Eur. J. Biochem. 268 (2001) 105–110.
[44] A. Baragli, M.-L. Grieco, P. Trieu, L.R. Villeneuve, T.E. Hébert, Heterodimers of adenylyl cyclases 2 and 5 show enhanced functional responses in the presence of Galpha s, Cell. Signal. 20 (2008) 480–492, http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.033.
[45] A. Senes, M. Gerstein, D.M. Engelman, Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions, J. Mol. Biol. 296 (2000) 921–936, http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.3488.
[46] D. Willoughby, N. Masada, S. Wachten, M. Pagano, M.L. Halls, K.L. Everett, A. Ciruela, D.M.F. Cooper, AKAP79/150 interacts with AC8 and regulates Ca2+-dependent cAMP synthesis in pancreatic and neuronal systems, J. Biol. Chem. 285 (2010) 20328–20342, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.120725.
[47] R.E. Simpson, A. Ciruela, D.M.F. Cooper, The role of calmodulin recruitment in Ca2+ stimulation of adenylyl cyclase type 8, J. Biol. Chem. 281 (2006) 17379–17389, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M510992200.
[48] D. Willoughby, K.L. Everett, M.L. Halls, J. Pacheco, P. Skroblin, L. Vaca, E. Klussmann, D.M.F. Cooper, Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca2+ and cAMP signaling, Sci. Signal. 5 (2012) ra29, http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2002299.
[49] A.J. Crossthwaite, A. Ciruela, T.F. Rayner, D.M.F. Cooper, A direct interaction between the N terminus of adenylyl cyclase AC8 and the catalytic subunit of protein phosphatase 2A, Mol. Pharmacol. 69 (2006) 608–617, http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.018275.
[50] L.J. Ayling, S.J. Briddon, M.L. Halls, G.R.V. Hammond, L. Vaca, J. Pacheco, S.J. Hill, D.M.F. Cooper, Adenylyl cyclase AC8 directly controls its micro-environment by recruiting the actin cytoskeleton in a cholesterol-rich milieu, J. Cell Sci. 125 (2012) 869–886, http://dx.doi.org/10.1242/jcs.091090.
[51] G. Zhang, Y. Liu, A.E. Ruoho, J.H. Hurley, Structure of the adenylyl cyclase catalytic core, Nature 386 (1997) 247–253, http://dx.doi.org/10.1038/386247a0.
[52] Y.L. Guo, T. Seebacher, U. Kurz, J.U. Linder, J.E. Schultz, Adenylyl cyclase Rv1625c of Mycobacterium tuberculosis: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases, EMBO J. 20 (2001) 3667–3675, http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.14.3667.
[53] M. Tanowitz, J.N. Hislop, M. von Zastrow, Alternative splicing determines the post-endocytic sorting fate of G-protein-coupled receptors, J. Biol. Chem. 283 (2008) 35614–35621, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M806588200.
[54] E. Hartmann, T.A. Rapoport, H.F. Lodish, Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989) 5786–5790.
[55] M. Sato, R. Hresko, M. Mueckler, Testing the charge difference hypothesis for the assembly of a eucaryotic multispanning membrane protein, J. Biol. Chem. 273 (1998) 25203–25208.
[56] M. Bogdanov, W. Dowhan, H. Vitrac, Lipids and topological rules governing membrane protein assembly, Biochim. Biophys. Acta 1843 (2014) 1475–1488, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.007.
[57] J.R. Chao, Y.G. Ni, C.A. Bolaños, Z. Rahman, R.J. DiLeone, E.J. Nestler, Characterization of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene promoter: regulation by cAMP and CREB, Eur. J. Neurosci. 16 (2002) 1284–1294.
[58] M.A. Nieto, The snail superfamily of zinc-finger transcription factors, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3 (2002) 155–166, http://dx.doi.org/10.1038/nrm757.
[59] T. Kim, J.O. Kim, J.G. Oh, S.-E. Hong, D.H. Kim, Pressure-overload cardiac hypertrophy is associated with distinct alternative splicing due to altered expression of splicing factors, Mol. Cell 37 (2014) 81–87, http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2014.2337.
[60] E.P. van der Veer, R.G. de Bruin, A.O. Kraaijeveld, M.R. de Vries, I. Bot, T. Pera, F.M. Segers, S. Trompet, J.M. van Gils, M.K. Roeten, C.M. Beckers, P.J. van Santbrink, A. Janssen, C. van Solingen, J. Swildens, H.C. de Boer, E.A. Peters, R. Bijkerk, M. Rousch, M. Doop, J. Kuiper, M.J. Schalij, A.C. van der Wal, S. Richard, T.J.C. van Berkel, J.G. Pickering, P.S. Hiemstra, M.J. Goumans, T.J. Rabelink, A.A.F. de Vries, P.H.A. Quax, J.W. Jukema, E.A.L. Biessen, A.J. van Zonneveld, Quaking, an RNA-binding protein, is a critical regulator of vascular smooth muscle cell phenotype, Circ. Res. 113 (2013) 1065–1075, http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301302.
[61] J. Fei, X.-B. Cui, J.-N. Wang, K. Dong, S.-Y. Chen, ADAR1-Mediated RNA Editing, A Novel Mechanism Controlling Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells, Circ. Res. 119 (2016) 463–469, http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309003.
[62] B. Chabot, L. Shkreta, Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease, J. Cell Biol. 212 (2016) 13–27, http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201510032.
[63] S. Katsushika, J. Kawabe, C.J. Homcy, Y. Ishikawa, In vivo generation of an adenylylcyclase isoform with a half-molecule motif, J. Biol. Chem. 268 (1993) 2273–2276.
[64] O. Kelemen, P. Convertini, Z. Zhang, Y. Wen, M. Shen, M. Falaleeva, S. Stamm, Function of alternative splicing, Gene 514 (2013) 1–30, http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.083.
[65] V. Pagliarini, C. Naro, C. Sette, Splicing Regulation: A Molecular Device to Enhance Cancer Cell Adaptation, Biomed. Res. Int. 2015 (2015) 543067, , http://dx.doi.org/10.1155/2015/543067.

Figures supplémentaires (non présentées dans la version initiale envoyée aux rapporteurs)

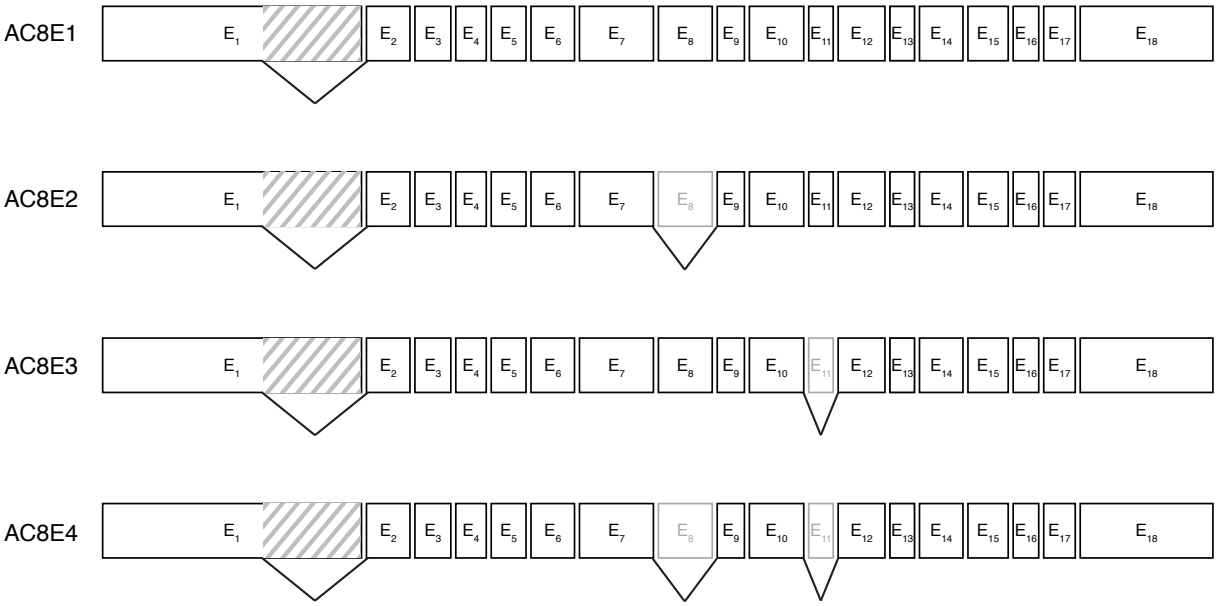


Figure S1 - Exon organization of AC8E variants

AC8E-H mRNAs all share a 414 bp deletion at the end of exon 1, corresponding to the light gray hatched box. Deletions of exon 8, exon 11 or both are represented by light gray boxes.

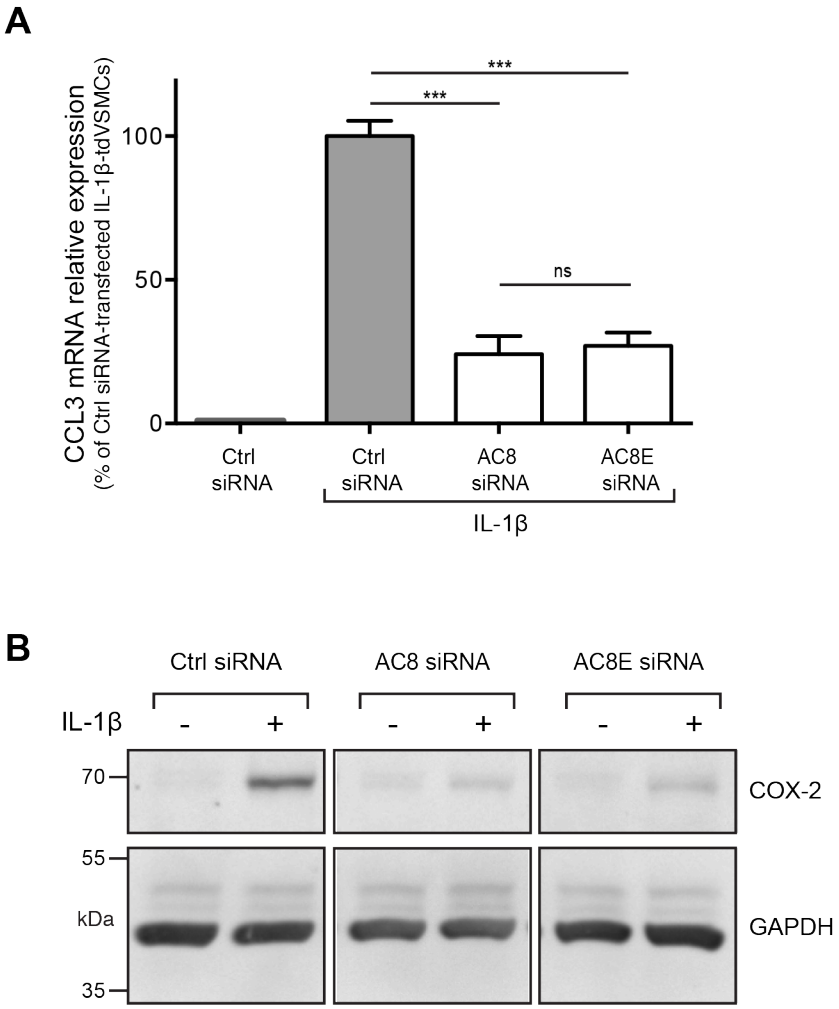


Figure S2 – AC8E-H silencing inhibits the expression of pro-inflammatory markers in IL-1β-transdifferentiated VSMCs

A Relative quantification of CCL3 mRNA expression by real-time PCR in contractile VSMCs and IL-1β-tdVSMCs transfected with control siRNA, AC8 siRNA, or AC8E siRNA. Results are expressed as percentages relative to IL-1β-tdVSMCs transfected with control siRNA and are normalized relative to cyclophilin A (cycloA) mRNA levels. Bars represent the means ± SEM of 4 independent experiments. Side-by-side comparisons were performed with the nonparametric Mann-Whitney test for unpaired data. ***: $P < 0.001$.

B Western blots showing COX-2 and GAPDH expression in contractile VSMCs and IL-1β-tdVSMCs transfected with control siRNA, AC8 siRNA, or AC8E siRNA. The western blot images shown are representative of 3 independent experiments performed on 20 µg of total protein extracts.

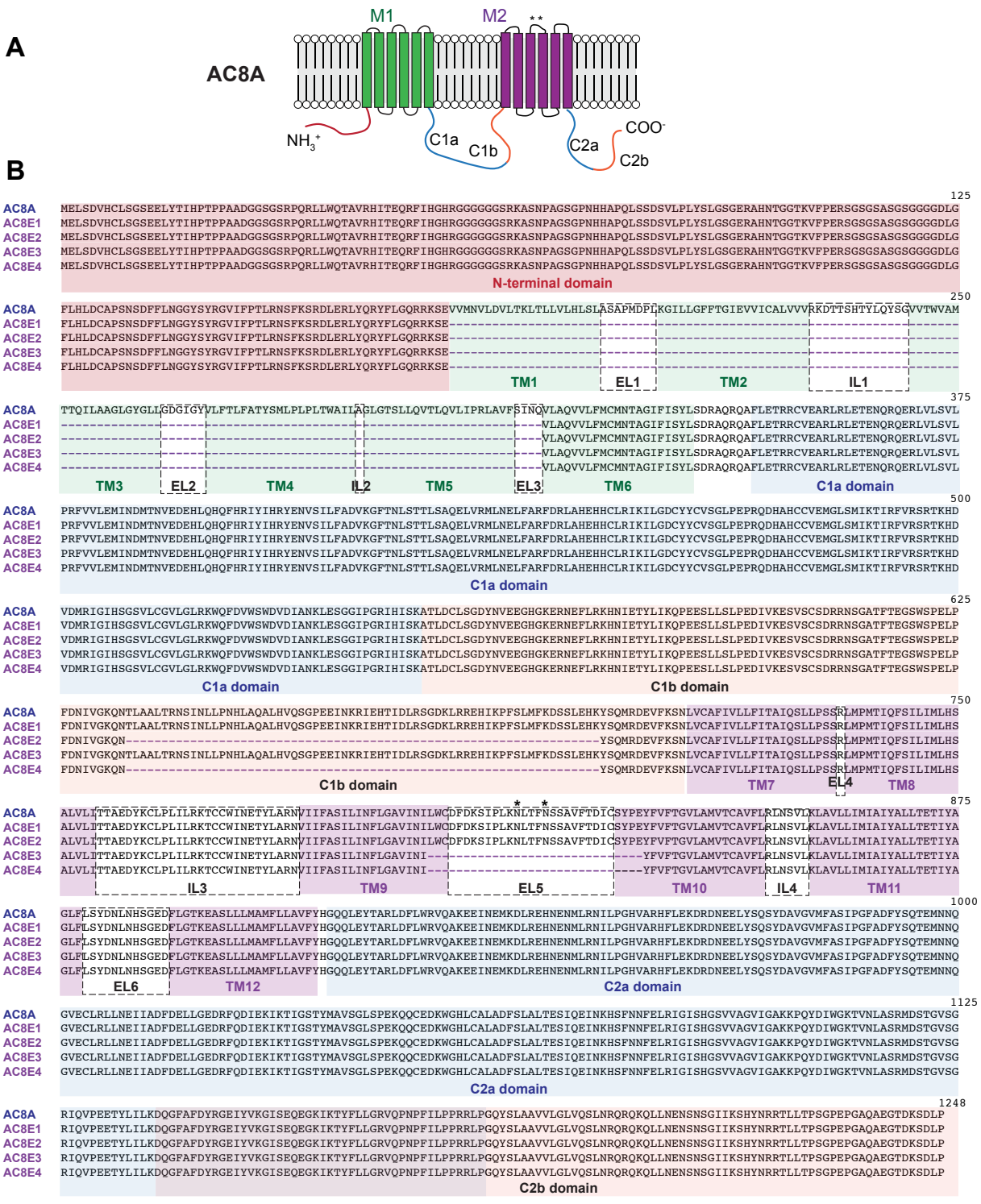


Figure S3 - Multiple amino acid sequence alignment and structural domains of the AC8A and AC8E-H proteins

A Schematic representation of AC8A.

B Amino acid sequence alignment of *Rattus norvegicus* AC8A, AC8E, AC8F, AC8G and AC8H. Structural domains are indicated beneath the sequences. The missing amino acids in AC8E-H isoforms are represented by dotted lines.

In (**A**) and (**B**), the N-terminal domain is shown in red. M1 and M2 are the two transmembrane clusters composed of the membrane-spanning domains TM1-6 (green) and TM7-12 (purple), respectively. Membrane-spanning domains are linked by intracellular (IL) or extracellular (EL) loops. The C1 domain is subdivided into C1a (blue) and C1b (orange) domains. The C2 region is also subdivided in two regions, C2a (blue) and C2b (orange). The C1a and C2a regions (blue) form the catalytic core. M2 presents two N-glycosylation sites in extracellular loop 5, indicated by *.

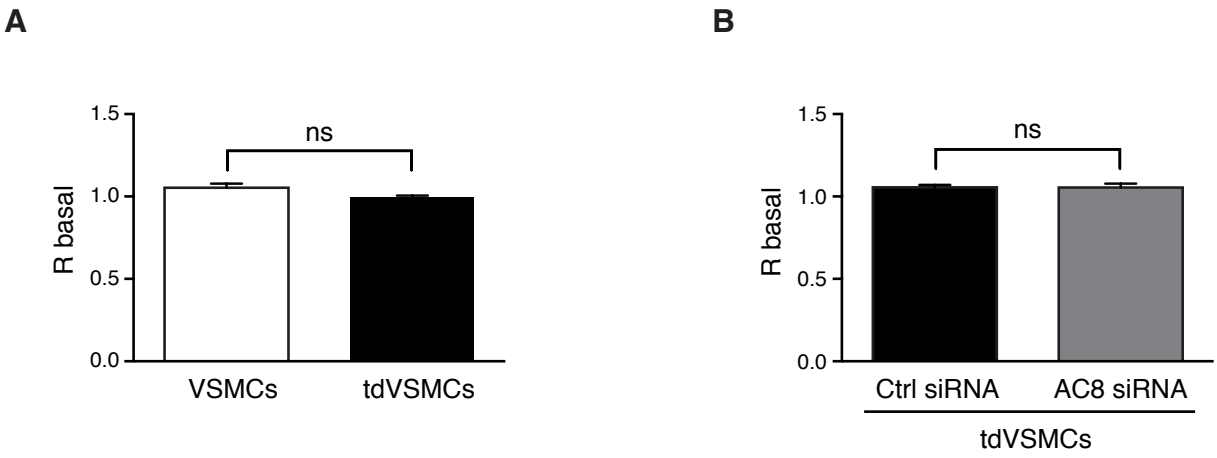


Figure S4 – Baseline ratios reflecting basal $[cAMP]_i$ in VSMCs

A, **B** Comparison of baseline emission ratios (R basal) recorded with $^{T}Epac^{VV}$ in contractile VSMCs and IL-1β-tdVSMCs (**A**) and in IL-1β-tdVSMCs transfected with control (Ctrl) or AC8 siRNA (**B**). Bars indicate the mean R basal ± SEM of at least $N = 4$ independent experiments performed on $n = 10$ to 20 individual cells. In (**A**), R basal values were as follows: for contractile VSMCs: 1.05 ± 0.02, $N = 5$; for IL-1β-tdVSMCs: 1.00 ± 0.01, $N = 4$, $P = 0.1905$. In (**B**), R basal values were as follows: for Ctrl siRNA-transfected IL-1β-tdVSMCs: 1.06 ± 0.01, $N = 10$; for AC8 siRNA-transfected IL-1β-tdVSMCs: 1.05 ± 0.02, $N = 10$, $P = 0.5191$. Side-by-side comparisons were performed with the nonparametric Mann-Whitney test for unpaired data. ns: not significant.

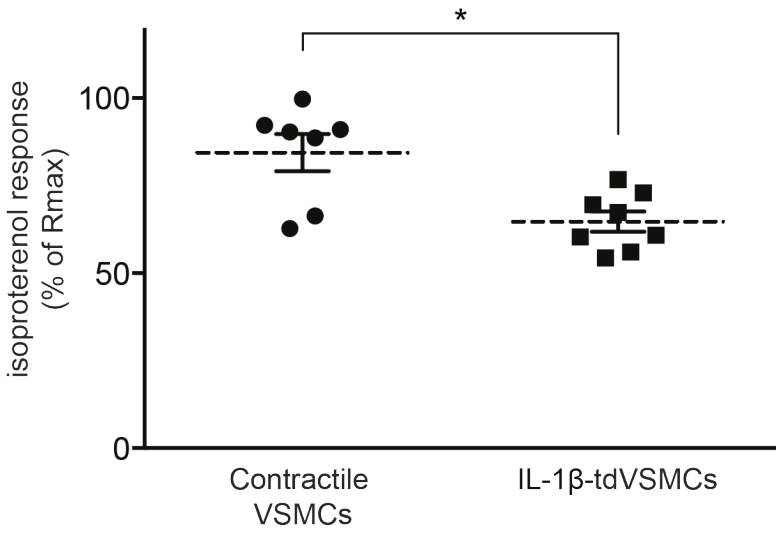


Figure S5 – Isoproterenol-induced cAMP responses in contractile and IL-1β-transdifferentiated VSMCs

Relative changes in $[cAMP]_i$ were monitored with $^{T}Epac^{VV}$ in contractile VSMCs and IL-1β-tdVSMCs following treatment with the β agonist isoproterenol (25 mM). The final application of fsk (10 µM) together with IBMX (200 µM) determined the maximal ratio change. The dot plot represents the mean values for isoproterenol responses expressed as a percentage of the maximal ratio change (% of Rmax). Data shown are the means ± SEM of at least *N* = 7 independent experiments performed on *n* = 10 to 20 individual cells. Isoproterenol responses were as follows: for contractile VSMCs: 84.4 ± 5.3%, *N* = 7; for IL-1β-tdVSMCs: 64.8 ± 2.9%, *N* = 8, *P* = 0.0205. Side-by-side comparisons were performed with the Mann-Whitney test for unpaired data. *: $P < 0.05$.

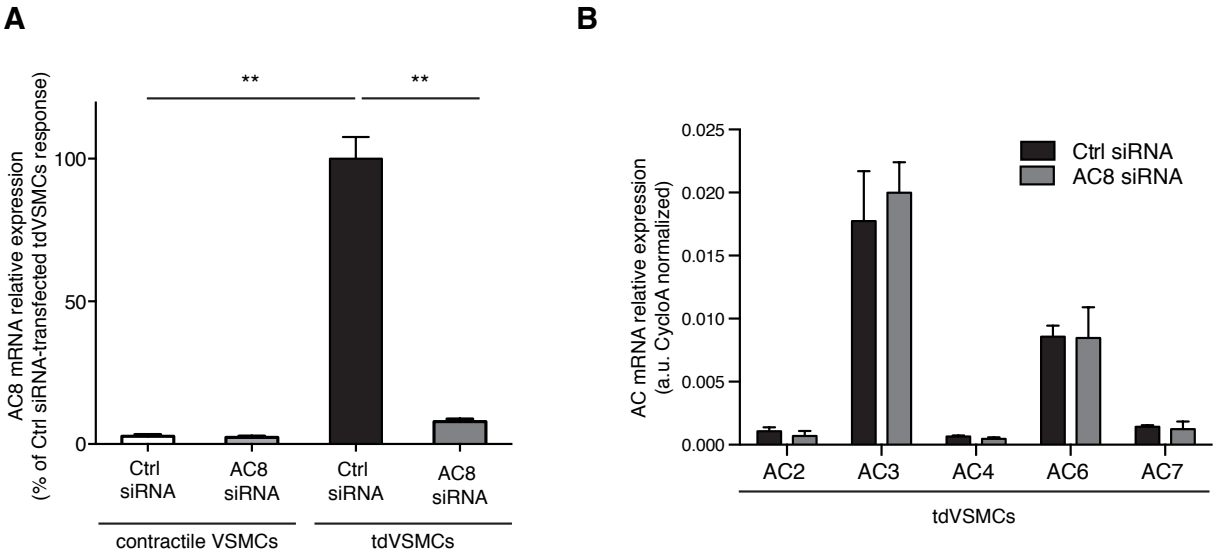


Figure S6 - Efficiency and specificity of AC8 siRNA

A Relative quantification of AC8 mRNA expression by real-time PCR in contractile or IL-1β-tdVSMCs transfected with control or AC8 siRNA. Results are expressed as percentages relative to IL-1β-tdVSMCs transfected with control siRNA and are normalized relative to cyclophilin A (cycloA) mRNA levels. Bars represent the means ± SEM of 4 independent experiments. Side-by-side comparisons were performed with the nonparametric Mann-Whitney test for unpaired data. **: $P < 0.01$.

B ACs mRNA expression in IL-1β-tdVSMCs transfected with control (Ctrl) or AC8 siRNA. Results are expressed in arbitrary units (a.u.), normalized relative to cyclophilin A (cycloA) mRNA expression. Bars represent the means ± SEM of 3 independent experiments.

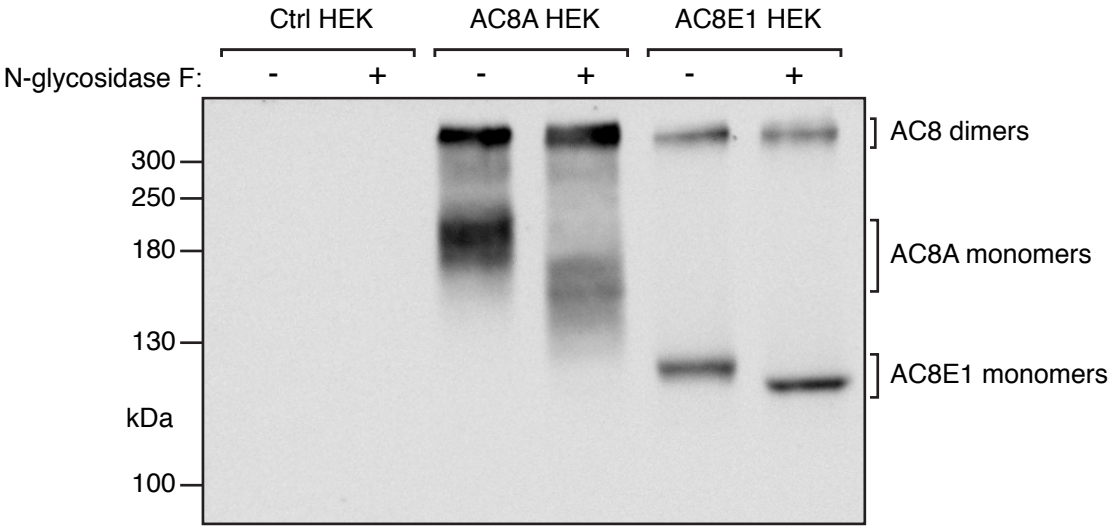


Figure S7 - AC8E exists as N-glycosylated species

Western blot of total extracts issued from HEK-293 cells stably expressing AC8A or AC8E, treated with (+) or without (-) N-glycosidase F (500 units). The western blot shown is representative of 3 independent experiments.

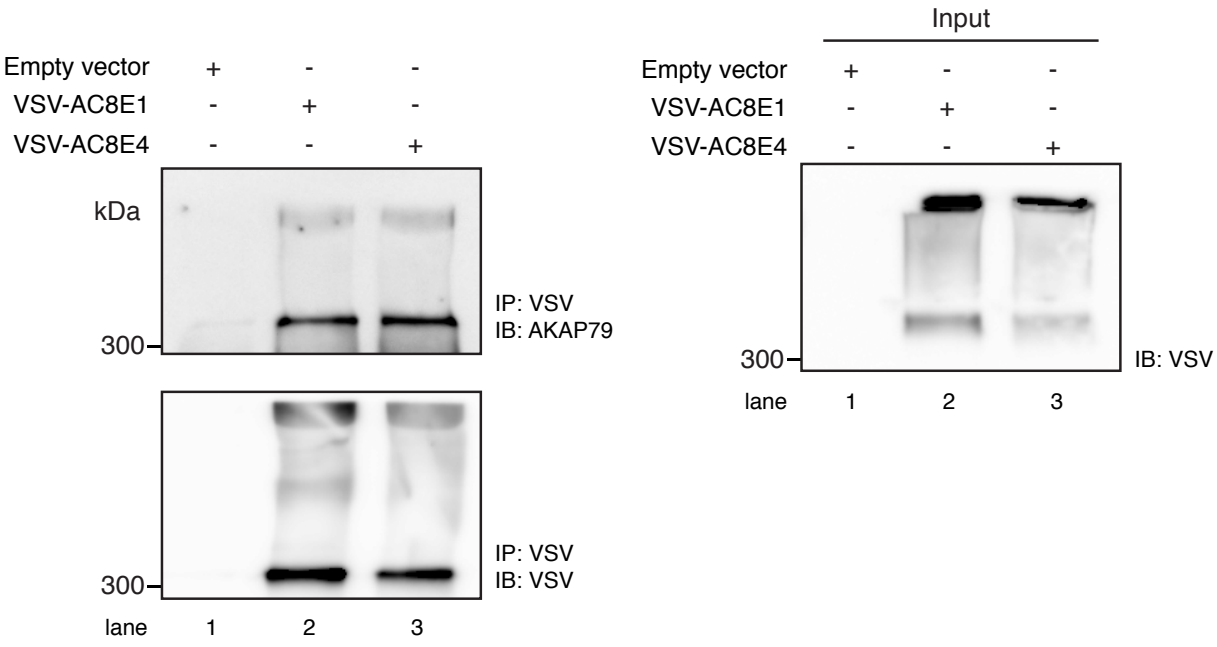


Figure S8 - AC8E and AC8H interact with AKAP79

HEK-293 cells were transiently transfected with empty vector (pcDNA3-VSV) or plasmid encoding VSV-AC8E or VSV-AC8H. Left panel: western blots showing co-immunoprecipitation of AKAP79 with AC8E and AC8H. Immunoprecipitation (IP) was performed with anti-VSV antibody and immunoblots (IBs) with anti-AKAP79 or anti-VSV antibodies. Right panel: western blot showing AC8E and AC8H levels in crude cell lysates performed with anti-VSV antibody. The western blots shown are representative of 3 independent experiments.

Supplementary tables

Table S1 - List of primers and adaptators used for real-time PCR, classic PCR and cloning

	Gene family	Target genes	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Accession numbers
Real-time PCR	Adenylyl cyclases	AC2	tcttcatcacgctgctggt	ttcttccacagaagtctaacctaca	NM_031007.1
		AC3	tgatcctgacatctgttctg	gccacggagcttctaggaaat	NM_130779.2
		AC4	gaggaggaggagaggaggaaaaca	tgtcaccaggcatttggatt	NM_019285.2
		AC6	gccacctacgacagctcaat	cacactcccgacaaagtactca	NM_001270785.1 / NM_012821.4
		AC7	tccgtacctactggtgattga	caggtggtgctgggttag	NM_053396.1
		AC8	tacatacatggctgtctcaggac	cccattatcttcacatgc	NM_017142.1 / XM_006241703.3 / XM_006241704.3
	Housekeeping gene	Cyclophilin A	tgctggaccaaacacaaatg	cttcccaaagaccacatgct	NM_017101.1

	Target genes	Target exons	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')
PCR	AC8	E1-E2	gaccaaaccaccacgccgc	gcggtctgaaaggtaactgatgaa
	AC8	E7-E12	cattcgacaacatcgtggcc	tccactgtggttcaggttgt

		Adaptors	Sequences (5'-3')	Compatible end	Cloned into	Construct
Cloning	VSV tag		agctgccaccatgtacctgatatcgaatgaaccgcctggtaagggtac	5'-HindIII	pcDNA3 HindIII-KpnI	pcDNA3-VSV
			ctttaccctaggcggttcattttgatatcagtgtacatggtggc	3'-KpnI		
	HA tag		aattccacatgtacccatacgatgttccagattacgctccgaggaaccagggcctctcg	5'-EcoRI	pcDNA3-rAC3 EcoRI-BamHI	pcDNA3-HA-rAC3
			aattccacatgtacccatacgatgttccagattacgctccgaggaaccagggcctctcg	3'-BamHI		
		Primers	Sequences (5'-3')	Compatible end	Cloned into	Constructs
		AC8 – F 672-692	ctaggaaagaggggatcgctg	blunt	pcDNA3 EcoRV	pcDNA3-AC8E1-4
		AC8 – R 4530-09	aatgctttatggcaaatcgga	blunt		
		AC8-F	agggtaccgaactctcggatgtgcactg	5'-KpnI	pcDNA3-VSV KpnI-XbaI	pcDNA3-VSV-AC8A/E1/E4
		AC8-R	cctctagattatggcaaatcggatttgtc	3'-XbaI		

Target proteins	Sources	Applications	Manufacturers	Catalog numbers
AC8 (C-terminus)	goat polyclonal	IB, IF	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-1967
AC3 (C-terminus)	rabbit polyclonal	IB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-588
GAPDH	rabbit monoclonal	IB	Abcam	Ab181602
β-actin	mouse monoclonal [AC-15]	IB	Sigma-Aldrich	A5441
β1-integrin	rabbit monoclonal [EP1041Y]	IB	Millipore	50-171-223
Calnexin	rabbit polyclonal	IB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-11397
COX IV	goat polyclonal	IB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-69359
AKAP79	mouse monoclonal	IB	BD Biosciences	610314
VSV tag	mouse monoclonal [P5D4]	IB	Abcam	ab50549
	goat polyclonal	IP, IF	Abcam	ab3861
HA tag	mouse monoclonal [16B12]	IP, IF	Abcam	ab130275

Table S2 - List of antibodies used in immunoblots, immunoprecipitation and immunofluorescence experiments

II. AC8E : rôle, sélectivité et régions clés

Pour cette étude mécanistique, nous avons centré nos efforts sur le variant AC8E, porteur de la délétion commune à toute cette famille de variants d'épissage de l'AC8.

A. Sélectivité de l'AC8E vis à vis des AC fonctionnelles

L'AC8E exerce un effet dominant-négatif sur l'AC3 *via* sa capacité à s'hétérodimériser avec cette isoforme et à la retenir dans le réticulum endoplasmique des cellules (***Article*** Vallin *et al.*, 2018 et **Figure R.4**). Ces résultats, obtenus en sur-exprimant l'AC8E et l'AC3 dans des cellules HEK, soulèvent la question d'un mécanisme plus général de régulation de l'activité des AC. Pour y répondre, nous avons recherché si l'AC8E pouvait se dimériser avec d'autres AC : l'AC2, du groupe 2, et, l'AC6, du groupe 3. L'AC6 est une des deux AC majoritaire des CMLV, l'autre étant l'AC3 (Webb *et al.*, 2001 ; Ostrom *et al.*, 2002). Les expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) ont été réalisées sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E étiquetée VSV-G (AC8E-VSV-G) et/ou l'AC2, l'AC3 ou l'AC6 étiquetée HA (AC2-HA ; AC3-HA ; AC6-HA).

L'expression des AC étiquetées dans le lysat des cellules a été confirmée par western-blot (**Figure R.5, panel supérieur**). Après immunoprécipitation de l'AC8E-VSV-G, on détecte une bande immunoréactive avec l'anticorps anti-HA à la masse moléculaire apparente de ≈300 kDa dans les cellules HEK293 co-exprimant AC8E-VSV-G et AC2-HA ou AC3-HA ou AC6-HA ; cette bande correspond à la masse moléculaire attendue pour les dimères formés AC8E/AC2, AC8E/AC3 ou AC8E/AC6 (**Figure R.5, panel inférieur gauche, pistes 6, 7 et 8**). Aucune bande n'est présente dans les immunoprécipitats issus de cellules n'exprimant pas l'AC8E-VSV-G (**Figure R.5, panel inférieur gauche, pistes 3, 4 et 5 *vs* 6, 7 et 8**). Ces résultats démontrent que l'AC8E s'hétérodimérise avec les AC2, AC3 et AC6 et suggère un effet **dominant négatif potentiellement plus délétère**.

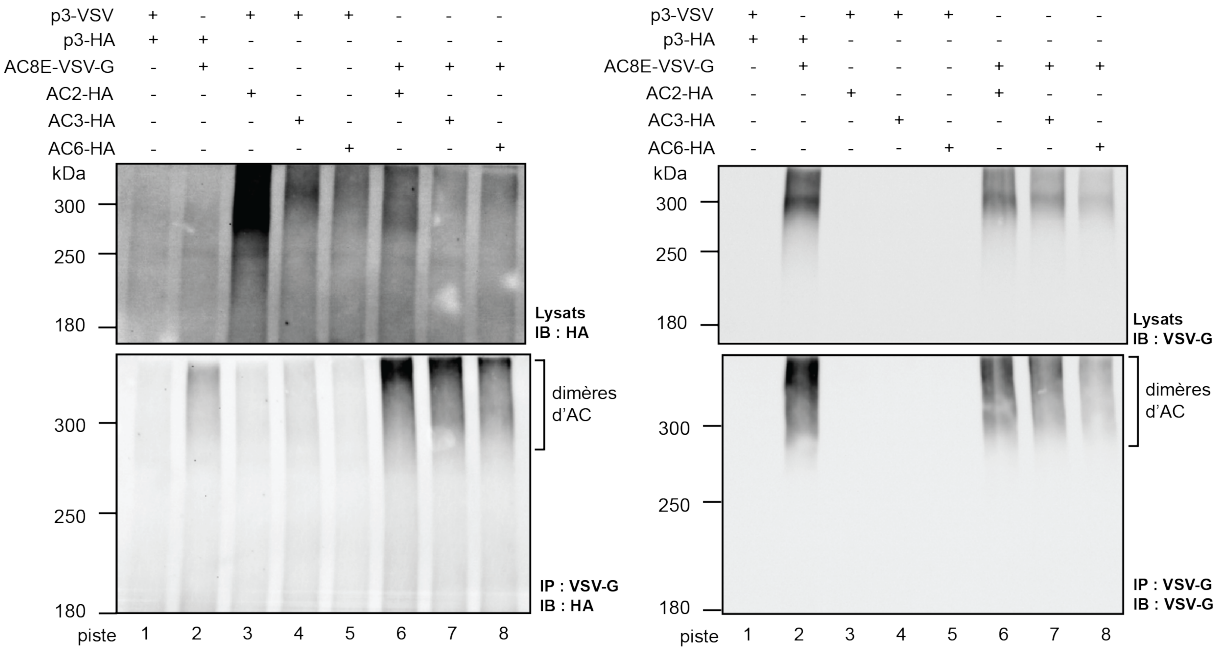


Figure R.5 : L'AC8E interagit avec différentes isoformes d'AC

Les protéines des lysats et immunoprécipitats (IP) ont été séparées sur SDS-PAGE 6% en condition dénaturante/non-réductrice. Les Western blots montrent l'expression des dimères d'AC dans des cellules HEK293 exprimant transitoirement AC8E-VSV-G et/ou AC2-HA, AC3-HA ou AC6-HA. Les lysats et immunoprécipitats obtenus à l'aide de l'anti-VSV (IP : VSV-G) ont été analysés à l'aide d'anticorps anti-HA (panel de gauche IB : HA) ou d'anti VSV-G (panel de droite, IB : VSV-G). IB : immunoblot.

Cette conclusion est étayée par les résultats du dosage immunologique réalisé sur les cellules HEK 293 exprimant l'AC8E ou co-exprimant l'AC8E et l'AC2, l'AC3 ou l'AC6. En effet, nous constatons que l'AC8E diminue significativement l'accumulation d'AMPc induite par la forskoline par rapport à celle des cellules contrôles (**Figure R.6, piste 4 *vs* 3, 6 *vs* 5 et 8 *vs* 7**).

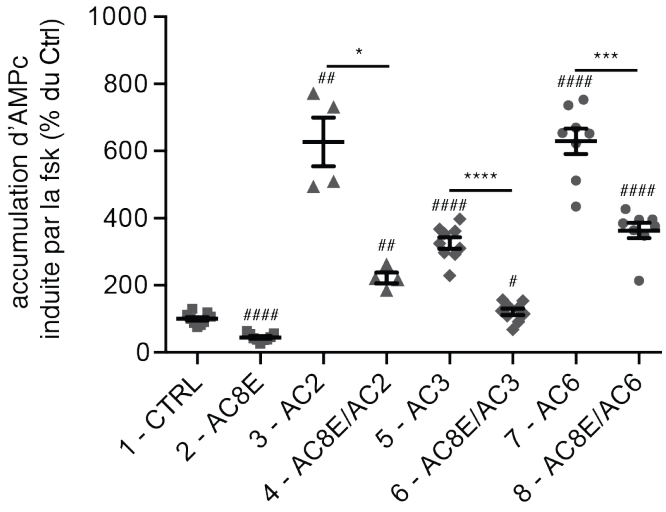


Figure R.6 : L'AC8E inhibe l'activité des AC2, AC3 et AC6 induite par la forskoline.
Dosage immunologique d'accumulation d'AMPc effectué sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E et/ou l'AC2, l'AC3 ou l'AC6, après un traitement de 60 min à la forskoline (10µM) en présence d'IBMX (500µM). Les résultats sont exprimés en % des cellules contrôles et sont représentés en moyennes ± SEM de 4-9 expériences indépendantes. Contrôle (Ctrl): 100,0 ± 6,72 % ; AC8E : 44,90 ± 3,96 % ; AC2 : 627,0 ± 72,65 % ; AC8E/AC2 : 221,7 ± 15,98 % ; AC3 : 326,0 ± 16,91 % ; AC8E/AC3 : 121,0 ± 9,66 % ; AC6 : 629,3 ± 38,04 % ; AC8E/AC6 : 363,1 ± 22,96 %. L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Mann-Whitney. **** P<0,0001 ; ***P<0,001 ; ** P < 0,01 ; * P < 0,05 ; # différence par rapport aux cellules contrôles.

Dans les CMLV, les AC8E-F interagirait préférentiellement avec l'AC6, l'isoforme d'AC majoritaire dans les CMLV (Ostrom *et al.*, 2002), et la rétention du dimère dans le réticulum endoplasmique des cellules induirait sa dégradation. En effet, une diminution significative (de plus de 50%) du niveau d'expression de l'AC6 est observée dans les CMLV traitées à l'IL-1β, et l'extinction de l'AC8E-H par transfection d'ARN interférents restaure le niveau d'expression de l'AC6 à un niveau similaire à celui observé dans les CMLV contrôles (**Annexe 2**).

B. Implication du domaine N-terminal de l'AC8E dans son effet dominant négatif

La loi de la balance des charges formulée par Hartmann et ses collaborateurs stipule que la différence de charge entre les 15aa entourant une région transmembranaire détermine l'orientation du domaine transmembranaire dans la bicouche lipidique. Ainsi, la région présentant la charge la plus élevée sera préférentiellement orientée vers le compartiment cytoplasmique (Hartmann, Rapoport and Lodish, 1989). L'analyse des charges portées par les domaines N-terminal, C1 et C2 (aux abords des domaines transmembranaires) de l'AC8A révèle que l'ancrage de cette AC dans la bicouche lipidique respecte rigoureusement la loi de la balance des charges (**Annexe 3, Figure A.3**). L'AC8E est efficacement N-glycosylée au niveau de sa boucle extracellulaire entre les TM9 et -10 et présente la capacité d'interagir avec l'AKAP79 au niveau de son extrémité N-terminal, indiquant que la cassette transmembranaire M2 de l'AC8E est ancrée dans la bicouche lipidique selon la même orientation que l'AC8A, et que l'extrémité N-terminale est cytosolique. **Ces résultats indiquent que la topologie membranaire de l'AC8E la plus probable est la suivante : un domaine N-terminal cytosolique, un TM6 relocalisé dans le cytosol suivi par le domaine C1 connectant une portion M2-C2 ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique granuleux selon la même orientation que l'AC8A** (**Annexe 3**, **Figure A.4**). On peut supposer que la délétion des 5 premiers domaines transmembranaires de l'AC8 altère la conformation du domaine N-terminal qui se traduirait par un effet inhibiteur des variants AC8E-F sur l'activité des AC fonctionnelle.

Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé le rôle du domaine N-terminal de l'AC8E. Pour ce faire, l'AC8E amputée des acides aminés 2 à 179, correspondant à la totalité du domaine N-terminal, a été générée (AC8EΔNt). Les changements relatifs de la concentration cytosolique d'AMPc en réponse à la forskoline (5 µM) ont été mesurés en fonction du temps en calculant le ratio R de l'intensité de fluorescence du donneur (F480nm) sur l'accepteur (F535). Les niveaux cytosoliques d'AMPc sont présentés en facteur du ratio maximum (Rmax) correspondant à la saturation du biosenseur. Le Rmax est déterminé à la fin de chaque expérience par l'addition de IBMX (200µM) en présence de forskoline (12,5µM). En effet, la forskoline augmente le ratio R de fluorescence à quasiment à la réponse maximale dans les cellules exprimant l'AC8EΔNt, soit une réponse équivalente à celle des cellules contrôles, alors qu'une diminution, non significative mais reproductible, de la production d'AMPc en réponse à la forskoline est constatée dans les cellules exprimant l'AC8E (**Figure R.7**).

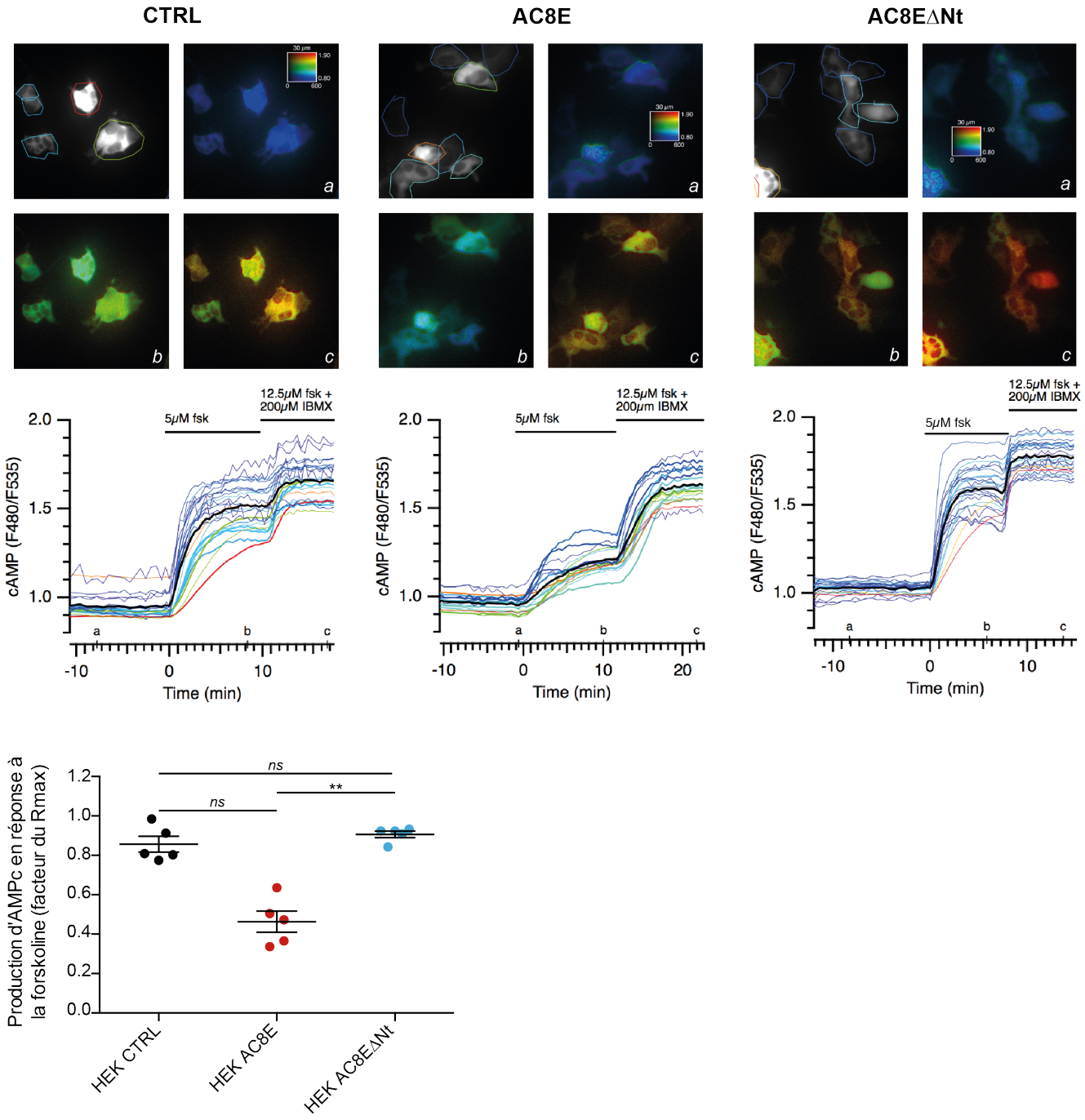


Figure R.7 : La délétion du domaine N-terminal de l'AC8E restaure la réponse des cellules à la forskoline

Les variations de la concentration intracellulaire en AMPc dans des cellules HEK contrôle ou exprimant de façon stable l'AC8E ou l'AC8EΔNt sont suivies par imagerie de biosenseur optique FRET $^{T}Epac^{VV}$. Panel supérieur : champs microscopiques en échelle de gris (en haut à gauche) montrant la fluorescence du biosenseur à 535nm. Le ratio F480/F535 a été déterminé pour chaque cellule individuelle, au sein des régions d'intérêt délimitées par un contour coloré (ROIs). Le carré de calibration indique horizontalement la gamme d'intensité pour chaque pixel, et le ratio F480/F535 verticalement. Les images en pseudocouleurs représentent le ratio F480/F535 indiquant la concentration intracellulaire en AMPc (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement avec 12,5µM de forskoline, et (c) pendant l'application de forskoline (12,5µM) + IBMX (200µM). Panel central : traces indiquant le ratio d'émission F480/F535 au cours du temps dans les ROIs délimitant chaque cellule. La trace noire épaisse représente la moyenne de toutes les traces. La moyenne des réponses obtenues à partir de 5 expériences indépendantes, exprimée en facteur de la réponse maximale du biosenseur, est montrée dans le panel inférieur. CTRL : 0,856 ± 0,040 ; AC8E : 0,463 ± 0,053 ; AC8EΔNt : 0,906 ± 0,016. L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Kruskal-Wallis. ** $P < 0,01$; *ns* : non significatif.

Des résultats similaires ont été obtenus en mesurant l'activité cyclase induite par la forskoline (1µM) en inhibant les phosphodiesterases (IBMX, 200µM) en suivant l'évolution de la concentration d'AMPc au cours du temps, la pente de l'augmentation étant proportionnelle à l'activité cyclase (**Figure R.8**).

Cette pente étant fonction de la concentration en biosenseur (visualisée par l'intensité de fluorescence de chaque cellule), nous avons exprimé la pente correspondant à l'augmentation intracellulaire d'AMPc en fonction de la concentration de biosenseur pour chaque cellule. En effet, l'effet tampon du biosenseur peut limiter le changement de ratio observé. Pour une même concentration de biosenseur, les valeurs de pente des cellules contrôles (**Figure R.8C, croix noires**) et des cellules exprimant l'AC8EΔNt (**Figure R.8C, croix vertes**) sont similaires, tandis que les valeurs de pente des cellules exprimant l'AC8E sont globalement inférieures (**Figure R.8C, croix rouges**).

En accord avec ces résultats, l'accumulation d'AMPc est significativement réduite dans les cellules exprimant l'AC8E et aucune différence significative n'est observée dans les cellules exprimant l'AC8EΔNt par rapport aux cellules contrôles (**Figure R.8D**).

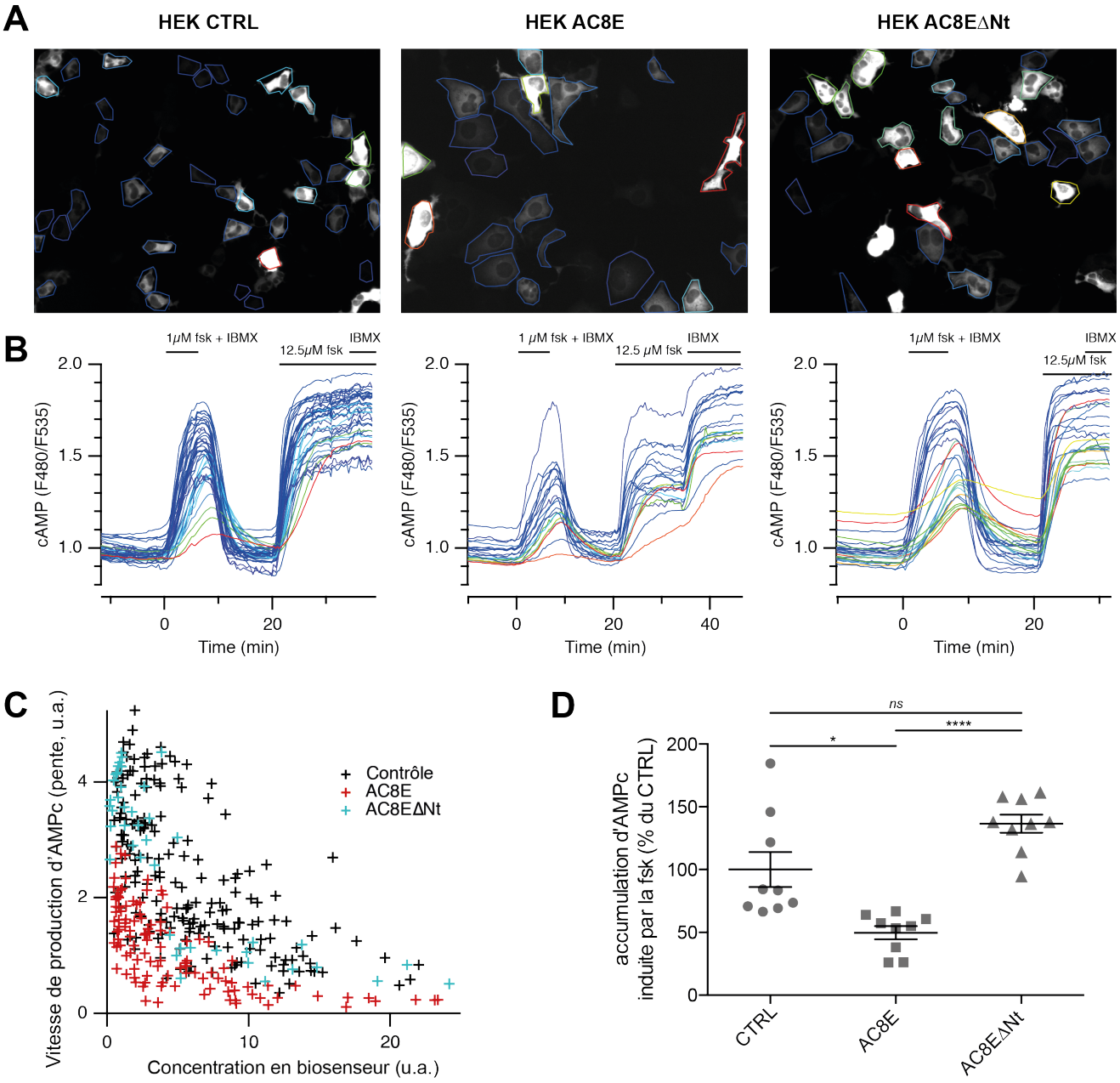


Figure R.8 : Le domaine N-terminal de l'AC8E joue un rôle primordial dans son effet dominant négatif.
Les variations de la concentration intracellulaire en AMPc dans des cellules HEK contrôle ou exprimant stablement l'AC8E ou l'AC8EΔNt ont été suivies par imagerie de biosenseur optique FRET ^{T}Epac^{VV}. Un système de perfusion rapide est utilisé pour délivrer une faible concentration de forskoline (1µM) afin d'activer modérément les AC, en présence d'IBMX (200µM) pour bloquer la dégradation d'AMPc par les PDE. Après retour à la concentration basale d'AMPc, une application finale de forskoline (12,5µM) et d'IBMX (200µM) est effectuée afin de déterminer la modification maximum de changement de ratio (Rmax). **A.** Pour chaque cellule, la concentration de biosenseur est estimée en mesurant l'intensité de fluorescence dans les régions d'intérêt établies (ROIs). Le code couleur de chaque ROI reflète la concentration de biosenseur : du bleu (faible) au rouge (élevée). **B.** Traces représentatives indiquant le ratio d'émission F480/F535nm au cours du temps dans les ROI délimitant chaque cellule. **C.** Valeur de la pente par rapport à l'intensité de fluorescence, reflet de la concentration du biosenseur, pour chaque cellule analysée. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. **D.** Dosages immunologiques d'accumulation d'AMPc effectués sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E ou l'AC8EΔNt après 60 min de traitement forskoline (10µM) plus IBMX (500µM). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles et sont représentés en moyennes ± SEM de 9 expériences indépendantes. Les valeurs sont les suivantes : CTRL : 100,0 ± 13,89 % ; AC8E : 49,65 ± 5,235 % ; AC8EΔNt : 136,6 ± 7,233 % L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Kruskal-Wallis. **** $P < 0.0001$, * $P < 0.05$, ns : non significatif.

Dans les cellules HEK 293 co-exprimant l'AC3 et l'AC8EΔNt, on observe également une accumulation d'AMPc comparable à celle des cellules exprimant l'AC3 seule, alors qu'elle diminue significativement dans les cellules co-exprimant l'AC3 et l'AC8E, comme attendu (**Figure R.9, pistes 6 *vs* 5 *vs* 4**).

L'ensemble de ces résultats démontre que le domaine N-terminal de l'AC8E est nécessaire à son effet dominant négatif.

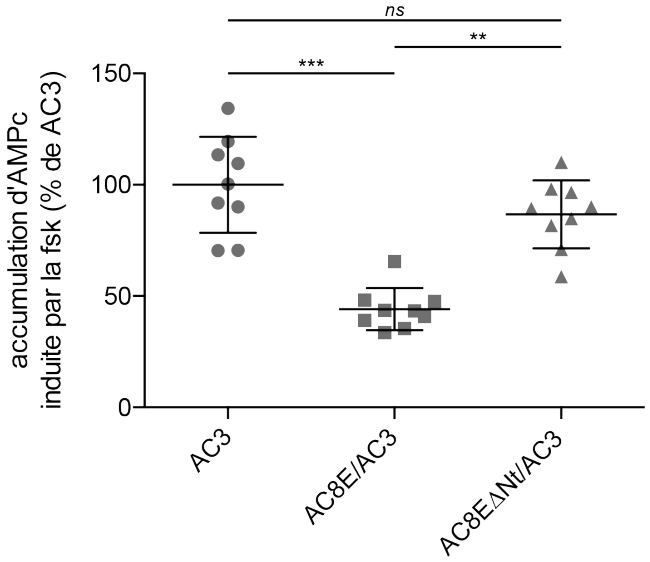


Figure R.9 : Le domaine N-terminal de l'AC8E joue un rôle primordial dans son effet dominant négatif.
Dosages immunologiques d'accumulation d'AMPc effectués sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E ou l'AC8EΔNt et/ou l'AC3 après 60 min de traitement forskoline (10µM) plus IBMX (500µM). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles et sont les moyennes ± SEM de 9 expériences indépendantes. Les valeurs sont les suivantes : AC3 : 100,0 ± 7,19 % ; AC8E/AC3 : 44,11 ± 3,14 % ; AC8EΔNt/AC3 : 86,68 ± 5,07 %. L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Kruskal-Wallis. *** $P < 0{,}001$; ** $P < 0.01$, ns : non significatif.

L'AC8E amputée de domaine N-terminal reste capable de s'hétérodimériser avec l'AC3 comme le démontrent les expériences de co-immunoprécipitation réalisées dans des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E ou l'AC8EΔNt et/ou l'AC3 étiquetée HA (AC3-HA). En effet, on détecte bien une bande immunoréactive à l'anticorps anti-AC8 à la masse molaire apparente d'environ 300 kDa dans les cellules HEK293 co-exprimant l'AC3-HA et l'AC8E ou AC8EΔNt après immunoprécipitation de l'AC3-HA (**Figure R.10, panel inférieur, pistes 5 et 6**). Aucune bande n'est présente dans les cellules qui n'expriment pas l'AC3-HA. (**Figure R.10, panel inférieur, pistes 2 et 3 *vs* 5 et 6**). L'expression des AC dans le lysat total des cellules a été confirmée par western blot (**Figure R.10, panel supérieur**).

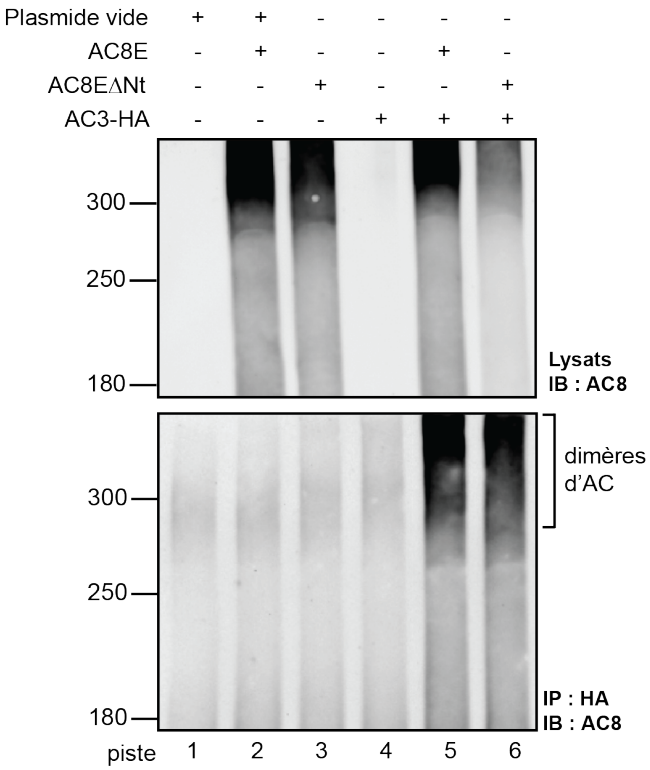


Figure R.10 : L'AC8EΔNt s'hétérodimérise avec l'AC3.

Les protéines des lysats et immunoprécipitats (IP) ont été séparées sur SDS-PAGE 5% en condition dénaturante/non-réductrice. Les Western blots montrent l'expression des dimères d'AC dans des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E ou l'AC8EΔNt et/ou AC3-HA. Les lysats et immunoprécipitats obtenus à l'aide de l'anti-HA (IP : HA) ont été analysés par western blot à l'aide d'anti-AC8. IB : immunoblot.

La forskoline active les AC en pénétrant les cellules. Cet outil moléculaire sert donc à mesurer la fonctionnalité des adenylyl cyclases. Pour autant, cet outil ne nous permet pas d'évaluer la réponse AMPc à un agoniste de GPCR utilisant le système AC/AMPc pour transmettre son message à l'intérieur de la cellule. Nous avons donc mesuré la production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol (3nM), un activateur sélectif des récepteurs β-adrénergiques, dans des lignées monoclonales de cellules HEK293 contrôles et exprimant de façon stable l'AC8E ou l'AC8EΔNt. Comme le montre la **Figure R.11**, la production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol, analysée par imagerie de biosenseur, est diminuée dans les mêmes proportions dans les cellules HEK293 exprimant l'AC8E ou l'AC8EΔNt par rapport aux cellules contrôles (**Figure R.11**). La capacité de dimérisation de l'AC8EΔNt avec ces partenaires d'AC n'est pas altérée (**Figure R.10**) et l'absence des cinq premiers domaines transmembranaires et des boucles intra- et extra-cellulaires les reliant empêche l'export des dimères AC8E-AC vers la membrane plasmique (Vallin *et al.*, 2018). Au vu de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que c'est **la rétention intracellulaire des AC fonctionnelles par l'AC8E qui constitue l'étape importante de l'effet dominant-négatif dans l'intégration des signaux externes par la cellule**.

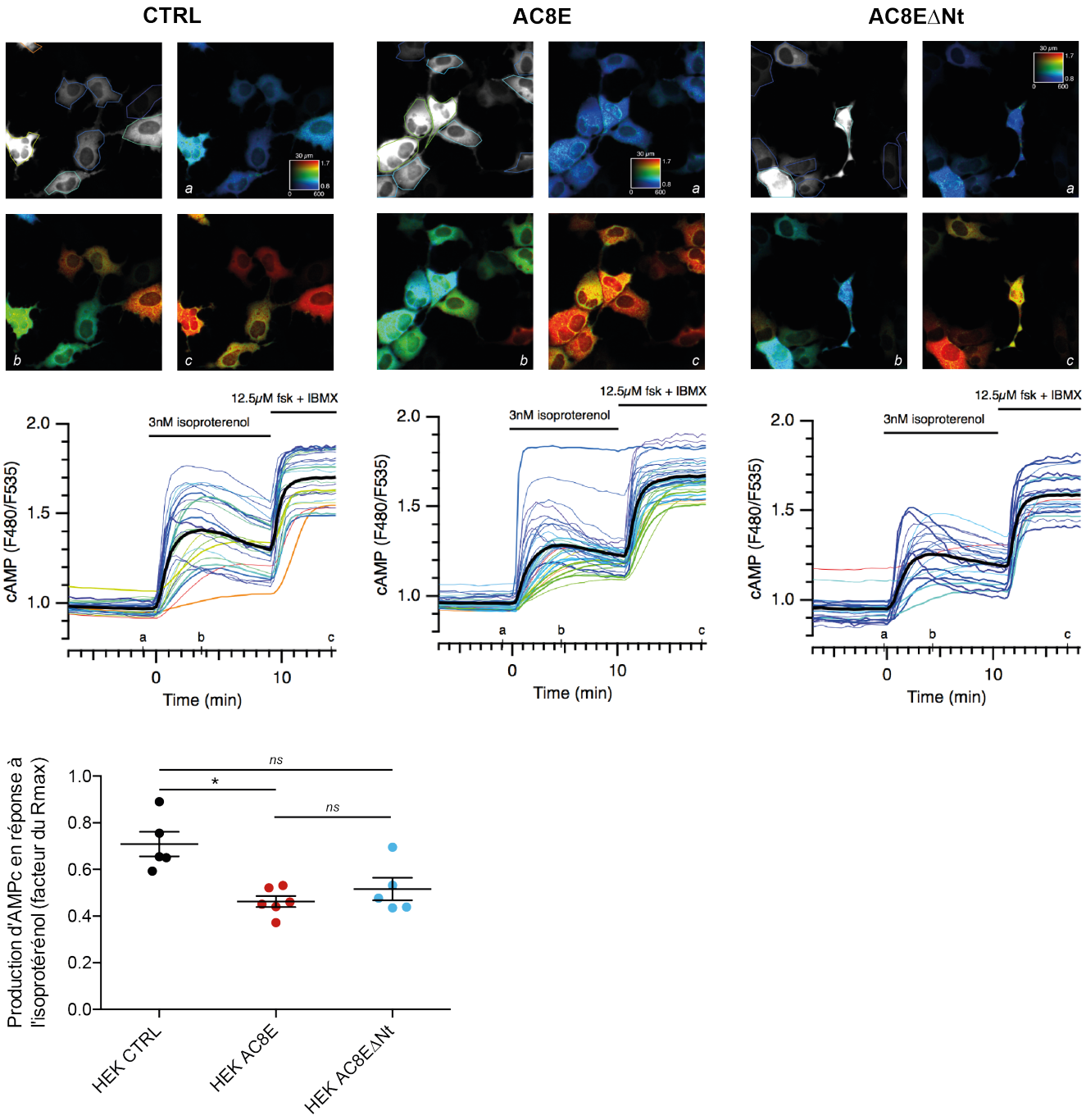


Figure R.11 : L'AC8E et l'AC8EΔNt inhibent la réponse des cellules à l'isoprotérénol.

Les variations de la concentration intracellulaire en AMPc dans des cellules HEK contrôle ou exprimant stablement l'AC8E ou l'AC8EΔNt sont suivies par imagerie de biosenseur optique FRET ^{T}Epac^{VV}. Panel supérieur : champs microscopiques en échelle de gris (en haut à gauche) montrant la fluorescence du biosenseur à 535nm. Le ratio F480/F535 a été déterminé pour chaque cellule individuelle, au sein des régions d'intérêt délimitées par un contour coloré (ROIs). Le carré de calibration indique horizontalement la gamme d'intensité pour chaque pixel, et le ratio F480/F535 verticalement. Les images en pseudocouleurs représentent le ratio F480/F535 indiquant la concentration intracellulaire en AMPc (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement avec 3nM d'isoprotérénol, un activateur sélectif des récepteurs β-adrénergiques, et (c) pendant l'application de forskoline (12,5μM) + IBMX (200μM). Panel central : traces indiquant le ratio d'émission F480/F535 au cours du temps dans les ROIs délimitant chaque cellule. La trace noire épaisse représente la moyenne de toutes les traces. La moyenne des réponses obtenues à partir de 5-6 expériences indépendantes, exprimée en facteur de la réponse maximale du biosenseur, est montrée dans le panel inférieur. CTRL : 0,709 ± 0,052 ; AC8E : 0,463 ± 0,024 ; AC8EΔNt : 0,516 ± 0,048. L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Kruskal-Wallis. * $P < 0,05$; *ns* : non significatif.

C. Identification des séquences impliquées dans l'interaction entre l'AC8E et l'AC3 ou l'AC6

L'AC8E exerce son effet dominant-négatif sur les AC endogènes fonctionnelles *via* sa capacité à interagir physiquement avec celles-ci. Empêcher cet effet consisterait à bloquer sa capacité à s'hétérodimériser. Les peptides interférents semblent avoir des caractéristiques physico-chimiques plus appropriées que les petites molécules pour interférer avec les interactions protéine-protéine (**voir *Introduction. Partie 2. II.D. Les peptides interférents***). Nous avons donc cherché à identifier les motifs peptidiques impliqués dans l'hétérodimérisation de l'AC8E avec l'AC6 et l'AC3.

Il avait été montré que les AC s'hétérodimérisaient *via* leurs régions transmembranaires (Gu, Cali and Cooper, 2002 ; Baragli *et al.*, 2008 ; Seebacher, Linder and Schultz, 2001). Concernant l'AC8, celle-ci s'hétérodimériserait préférentiellement *via* sa cassette transmembranaire M2 (Gu, Sorkin and Cooper, 2001 ; Gu, Cali and Cooper, 2002). En accord avec cela, l'introduction d'un codon stop à la jonction C1a-C1b, induisant la délétion du domaine M2, supprime la capacité de l'AC8E à s'hétérodimériser avec l'AC3 (**Annexe 1**). Ces données nous ont permis de cibler la cassette M2 pour l'identification des motifs peptidiques impliqués dans l'hétérodimérisation de l'AC8E.

Pour réaliser un criblage haut débit des motifs potentiellement impliqués dans l'interaction protéine-protéine nous avons utilisé une approche de PEPscan (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018). Comme mentionné dans la section **Matériel et Méthodes. III. PEPscan**, la séquence peptidique de la cassette transmembranaire M2 de l'AC8E est décomposée en dodécapeptides chevauchants, décalés de 2 acides aminés par rapport au peptide précédent. Les peptides sont déposés sous forme de taches sur une membrane de nitrocellulose puis hybridés avec la protéine partenaire purifiée, ici l'AC3-HA ou l'AC6-HA. La formation de complexes peptide(s)-AC-HA est détectée en incubant la membrane de nitrocellulose avec un anticorps anti-HA. Ainsi, les taches immunoréactives correspondent aux séquences peptidiques de l'AC8E susceptibles d'interagir avec l'AC3 ou l'AC6 (**voir *Matériel et Méthodes. III. PEPscan*, Figure M.1**). L'expérience inverse a également été réalisée. Elle consiste à déposer les dodécapeptides chevauchants représentant les séquences peptidiques des cassettes transmembranaires de l'AC3 ou de l'AC6 sur une membrane de nitrocellulose et à les hybrider avec l'AC8E purifiée et étiquetée HA. Dans ce cas, les séquences peptidiques d'interaction identifiées sont celles présentes dans les AC3 et AC6.

1. Purification des AC

L'hybridation de la membrane sur laquelle sont déposés les dodécapeptides nécessite une quantité de 10 à 20 µg des protéines pures à 95%.

La purification de protéines est généralement effectuée en système bactérien, *Escherichia coli* étant l'organisme majoritairement utilisé, en raison du rendement élevé et de sa facilité d'utilisation qu'il confère. Cependant, la production de protéines membranaires dans de tels systèmes est généralement délicate, marquée par un rendement faible résultant d'une toxicité de ces protéines pour *E. coli*. La purification de protéines membranaires en système bactérien nécessite par conséquent l'utilisation de souches de bactéries modifiées, pour lesquelles la surexpression de ces protéines présente une toxicité réduite (Wagner *et al.*, 2007 ; Baumgarten *et al.*, 2017 ; Kanonenberg *et al.*, 2019). La procédure de purification de l'AC3, l'AC6 et l'AC8E étiquetées HA est décrite en **Annexe 6**. Une présentation brève de cette procédure et de ses résultats est présentée ici.

Pour obtenir une forte expression des protéines d'intérêt et un niveau de pureté suffisant, nous avons donc testé deux méthodes de production de protéines recombinantes : *i)* la transcription-traduction *in vitro*, effectuée à partir d'un lysat de cellules HeLa et *ii)* l'expression d'un cDNA en système eucaryote : les cellules HEK293.

Le rendement et la pureté protéique obtenus grâce à la première méthode ont été évalués à partir de lysat de cellules HeLa transfectées par un vecteur pT7 dans lequel a été inséré l'ADNc codant l'AC8E et l'étiquette HA. La pureté et la quantité de l'AC8E-HA après immunoprécipitation se sont révélées être très insuffisantes (**Annexe 6 – Figure A.9**).

La production des AC recombinantes a donc été réalisée dans un système de surexpression hétérologue. Pour ce faire, nous avons créé des lignées monoclonales de cellules HEK293 surexprimant ces protéines de façon stable par sélection à l'aide de l'antibiotique G418. La lignée de HEK293 exprimant l'AC3-HA a été utilisée pour mettre au point la chromatographie d'affinité utilisant un anticorps anti-HA couplés à des billes magnétiques. Nos résultats préliminaires révélent que l'utilisation de 30 boites de culture de 100mm de diamètre, combinée à l'utilisation de 500µl de billes magnétiques anti-HA permettent d'obtenir une quantité de 3µg d'AC3-HA (**Annexe 6 – Figure A.10**). Sur la base de ces résultats, nous avons pu récupérer une quantité de protéines de 23.6µg pour l'AC8E-HA, 14.7µg pour l'AC6-HA et 15.3µg pour l'AC3-HA (**Annexe 6 – Figure A.11**).

Les AC-HA présentes dans les immunoprécipitats se sont révélées être sous forme complexées. Il nous a donc été nécessaire de les isoler pour réaliser les expériences de PEPscan. Pour ce faire, nous avons électro-élué la bande protéique de 130 KDa du SDS-PAGE réalisé en conditions dénaturantes et réductrices après avoir concentré par précipitation à l'acétone[30].

[30]La précipitation à l'acétone de la BSA contenue dans le tampon d'élution de l'immunoprécipitation des AC présente un rendement de 70 à 90%.

2. *PEPscan*

Le PEPscan a été réalisé comme décrit dans le schéma présenté en **Figure M.1**. Une séquence d'acides aminés reconnue par la protéine appât est considérée comme un motif d'interaction quand tous les dodécapeptides qui le contiennent sont hybridés par cette protéine.

Deux motifs de 4 acides aminés de l'AC8E susceptibles d'interagir avec l'AC3-HA ont été identifiée (**Figure R.12A**). En revanche, l'hybridation de l'AC6-HA avec la membrane M2AC8E n'a pas révélé de domaine d'interaction (**Figure R.12B**), certainement du fait d'une trop faible quantité d'AC6-HA purifiée pour réaliser le PEPscan.

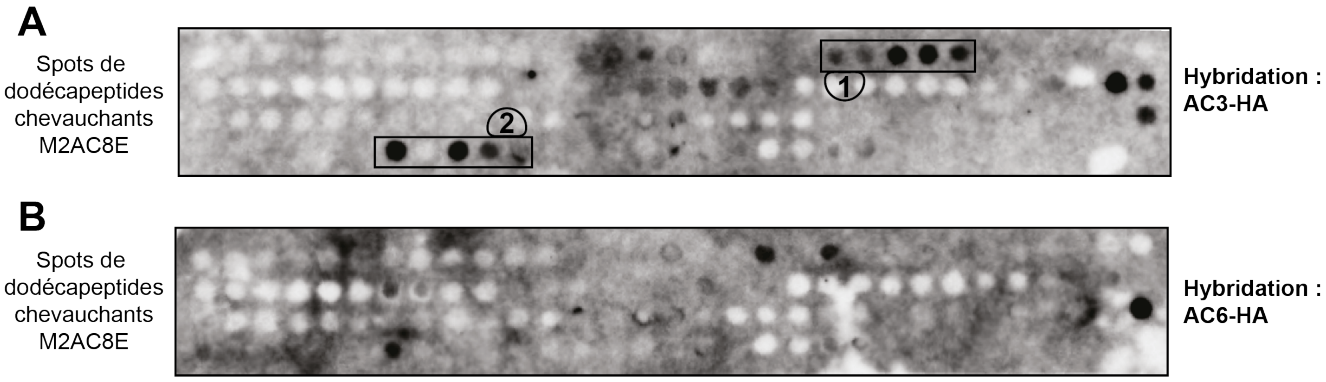


Figure R.12 : Identification des motifs d'acides aminés (en rouge) de l'AC8E impliqués dans l'hétérodimérisation avec l'AC3 et l'AC6.

A. Membrane de nitrocellulose sur laquelle sont déposés des dodécapeptides chevauchants, décalés de 2 acides aminés par rapport au peptide précédent, constitutifs de la séquence de la cassette transmembranaire M2 de l'AC8. Cette membrane est ensuite incubée avec la protéine AC3-HA purifiée et la formation de complexes peptide-protéine est révélée à l'aide d'un anticorps anti-HA. L'ensemble des peptides interagissant avec la protéine purifiée sont encadrés et numérotés. **B.** Identique à **A.** sauf que l'hybridation est effectuée avec la protéine AC6-HA purifiée.

Les expériences réalisées en conditions miroirs (**Figure R.13**) ont permis d'identifier quatre motifs peptidiques de l'AC3 susceptibles d'interagir avec l'AC8E-HA (**Figure R.13A**). Quatre motifs peptidiques de l'AC6 susceptibles d'interagir avec l'AC8E-HA ont également été identifiés (**Figure R.13B**).

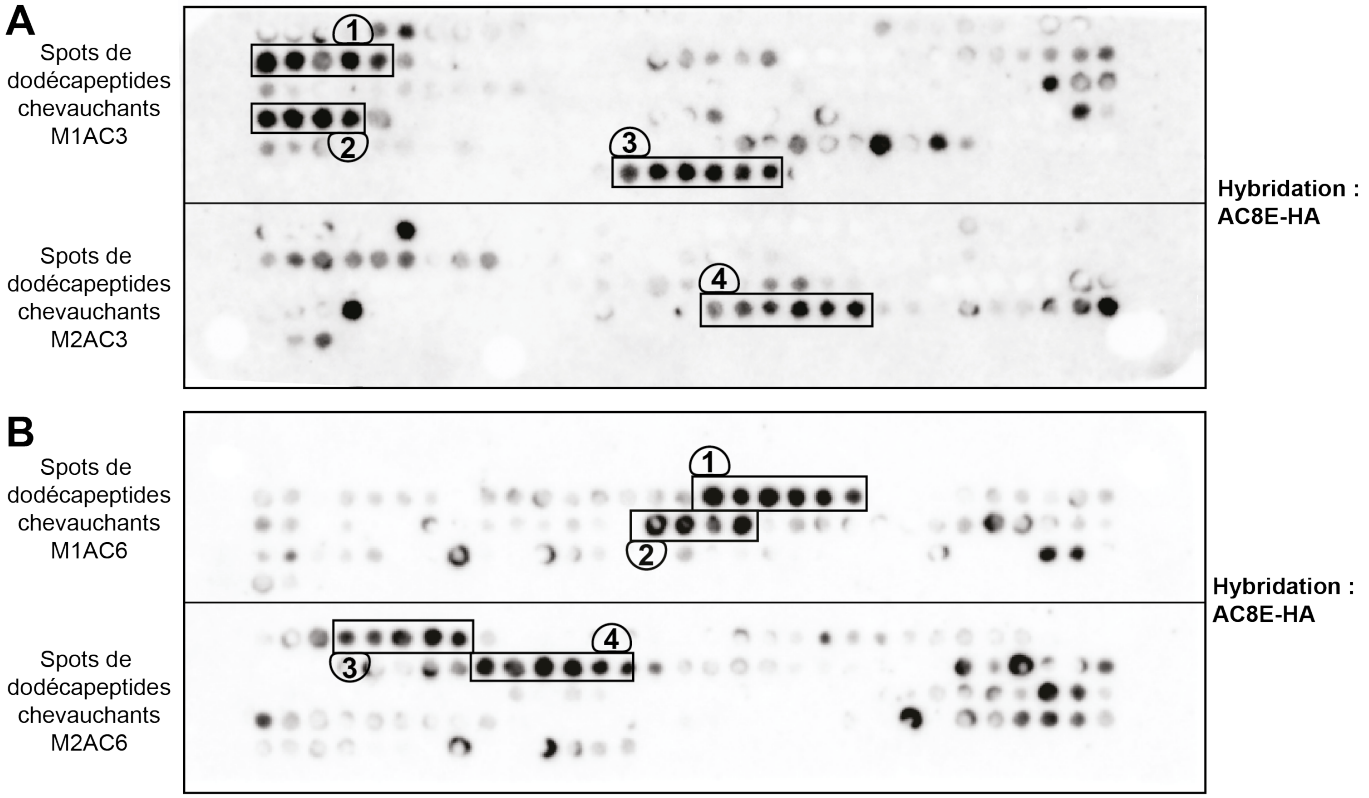


Figure R.13 : Identification des motifs d'acides aminés (en rouge) des AC3 et AC6 impliqués dans l'hétérodimérisation avec l'AC8E.

A. Membrane de nitrocellulose sur laquelle sont déposés des dodécapeptides chevauchants, décalés de 2 acides aminés par rapport au peptide précédent, constitutifs de la séquence de la cassette transmembranaire M2 de l'AC8. Cette membrane est ensuite incubée avec la protéine AC3-HA purifiée, la formation de complexes peptide-protéine est révélée à l'aide d'un anticorps anti-HA. L'ensemble des peptides interagissant avec la protéine purifiée sont encadrés et numérotés. **B.** Identique à **A.** sauf que l'hybridation de HA-AC8E est effectuée sur une membrane représentant la séquence des cassettes transmembranaires de l'AC6.

D. Analyse de peptides candidats

La séquence primaire des peptides interférents est généralement établie sur la base de celle des partenaires d'interaction (Hasbi *et al.*, 2014 ; Dominguez-Berrocal *et al.*, 2019). Sur la base des résultats de PEPscan, 10 peptides candidats ont été synthétisés. Ils sont tous porteurs d'une séquence cargo Mut3, permettant le passage des membranes cellulaires, suivie de la séquence intégrale des motifs identifiés lors des expériences de PEPscan (**Tableau R.1**).

Nom du peptide	Séquence
Mut3DPT-P1AC3	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P2AC3	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P3AC3	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P4AC3	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P1AC6	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P2AC6	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P3AC6	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P4AC6	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P1AC8	VKKKKIKAEIKI-Séquence
Mut3DPT-P2AC8	VKKKKIKAEIKI-Séquence

Tableau R.1 : Peptides candidats générés sur la base des résultats de PEPscan.

Ces peptides ont été analysés pour leur capacité à augmenter la dynamique de production d'AMPc dans les CMLV trans-différenciées à l'IL-1β, par imagerie de biosenseur optique FRET. L'effet des peptides sur la dynamique de production d'AMPc a également été analysé dans les CMLV contrôles en parallèle afin de mettre à jour tout effet nocif. Dans l'étude préliminaire, les peptides ont été introduits dans le milieu de culture à une concentration de 500nM, concentration maximale pour laquelle aucune mortalité cellulaire n'est observée.

Comme le montre la **Figure R.14**, aucun des 10 peptides candidats analysés, dans nos conditions expérimentales, ne permet de remonter la réponse à la forskoline des CMLV traitées à l'IL-1β à un niveau proche de celui observé dans les CMLV contrôles. On note également que ces peptides n'altèrent pas ou peu la production d'AMPc dans les CMLV contrôles (**Figure R.14**).

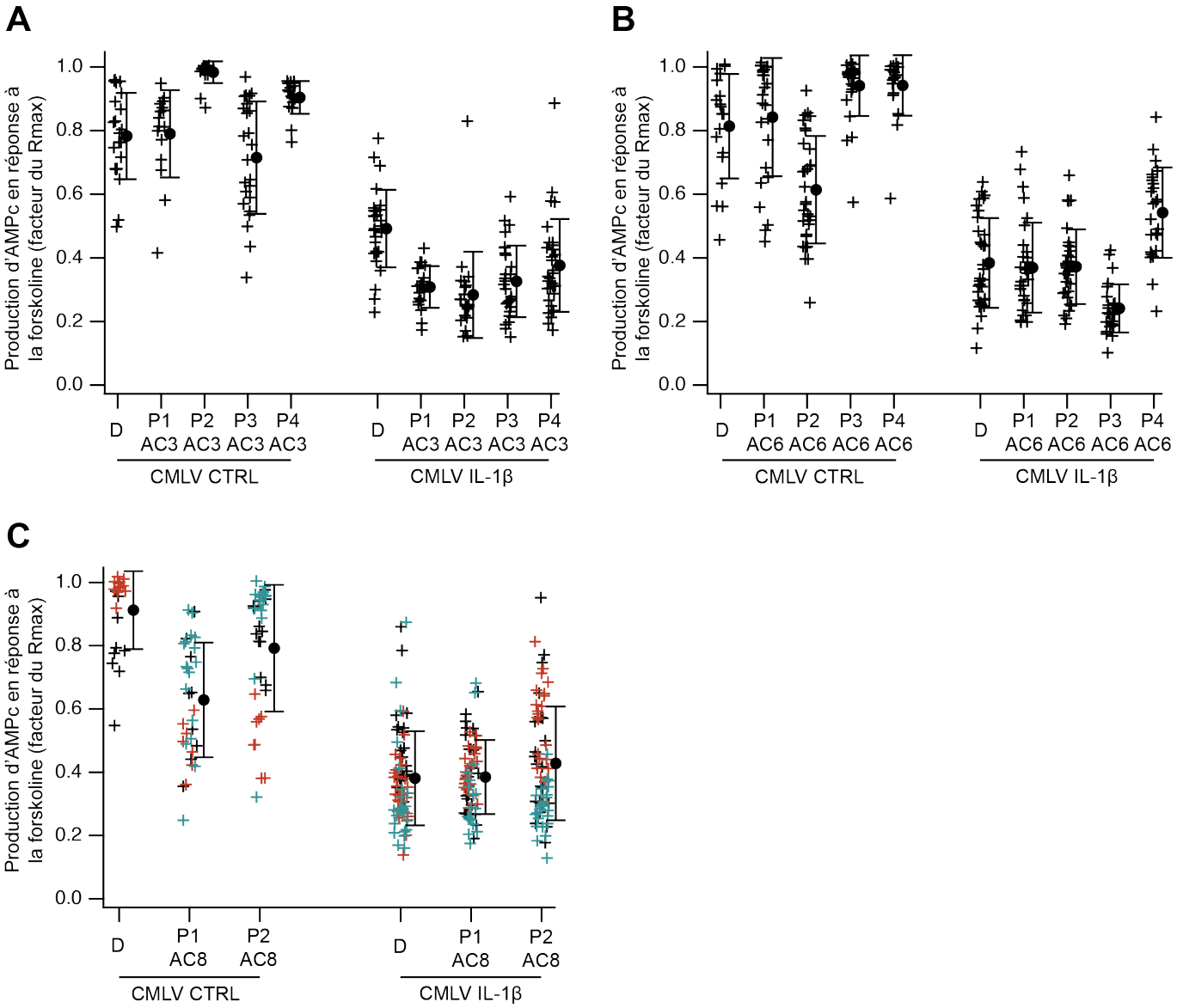


Figure R.14 : Effet des peptides candidats sur la dynamique de production d'AMPc dans les CMLV.
Les variations de la concentration intracellulaire en AMPc dans des cellules CMLV contrôles (CTRL) ou traitées à l'IL-1β et avec des peptides mimétiques de l'AC3 (**A**), de l'AC6 (**B**) ou de l'AC8E (**C**) ont été suivies par imagerie de biosenseur optique FRET ^{T}Epac^{VV}. La ratio F480/F535 a été déterminé pour chaque cellule individuelle. La production d'AMPc est induite par un traitement à la forskoline (12,5µM), une fois qu'un ratio stable est atteint, le biosenseur est saturé par un traitement forskoline (12,5µM) + IBMX (200µM). Les données représentent l'amplitude de réponse à la forskoline (amplitude du changement de ratio en facteur du Rmax) de cellules individuelles de *n* = 1-3 expériences indépendantes. Les couleurs des points représentent une même série d'expériences ; plusieurs couleurs sont présentes quand *n* > 1.

E. Modélisation

Dans le but d'appréhender les domaines potentiellement impliqués dans l'effet dominant-négatif de l'AC8E et/ou la dimérisation avec les autres isoformes d'AC, la structure tridimensionnelle de l'AC8E a été modélisée (collaboration avec l'équipe du Pr. Manuel Dauchez, MEDyC, Vieillissement Matriciel et Remodelage Vasculaire, Laboratoire de Signalisation et Récepteurs Matriciels, Université de Reims Champagne Ardenne). Compte tenu de la difficulté que représentent la purification et la cristallisation de protéines transmembranaires telles que les AC, la modélisation a été initiée par une approche d'analyse structurale par homologie.

Récemment, un modèle 3D partiel de l'AC9 bovine liée à une protéine Gαs a été obtenu par cryo-microscopie électronique (Qi *et al.*, 2019). Ce modèle AC9 a mis en évidence des éléments structuraux importants, tels que les domaines transmembranaires permettant l'assemblage d'une cyclase active, plus précisément les TM6 et TM12 qui créent un lien avec les domaines hélicoïdaux (HD1 et HD2) de l'AC formant une tige, elle-même reliée au site catalytique de l'AC et à la protéine Gαs. Sur la base de cette étude et grâce à plusieurs approches de modélisation *in silico* (SWISS MODEL, ROSETTA, serveurs *Phyre2*), l'équipe du Pr. Dauchez a pu compléter cette structure en y modélisant et intégrant les domaines N-terminal et C1b, absents du modèle initial (**Figure R.15A**). **Ces domaines N-terminal et C1b se positionnent de manière symétrique et opposée autour du domaine HD pour réguler la conformation du site catalytique** (**Figure R.15B**).

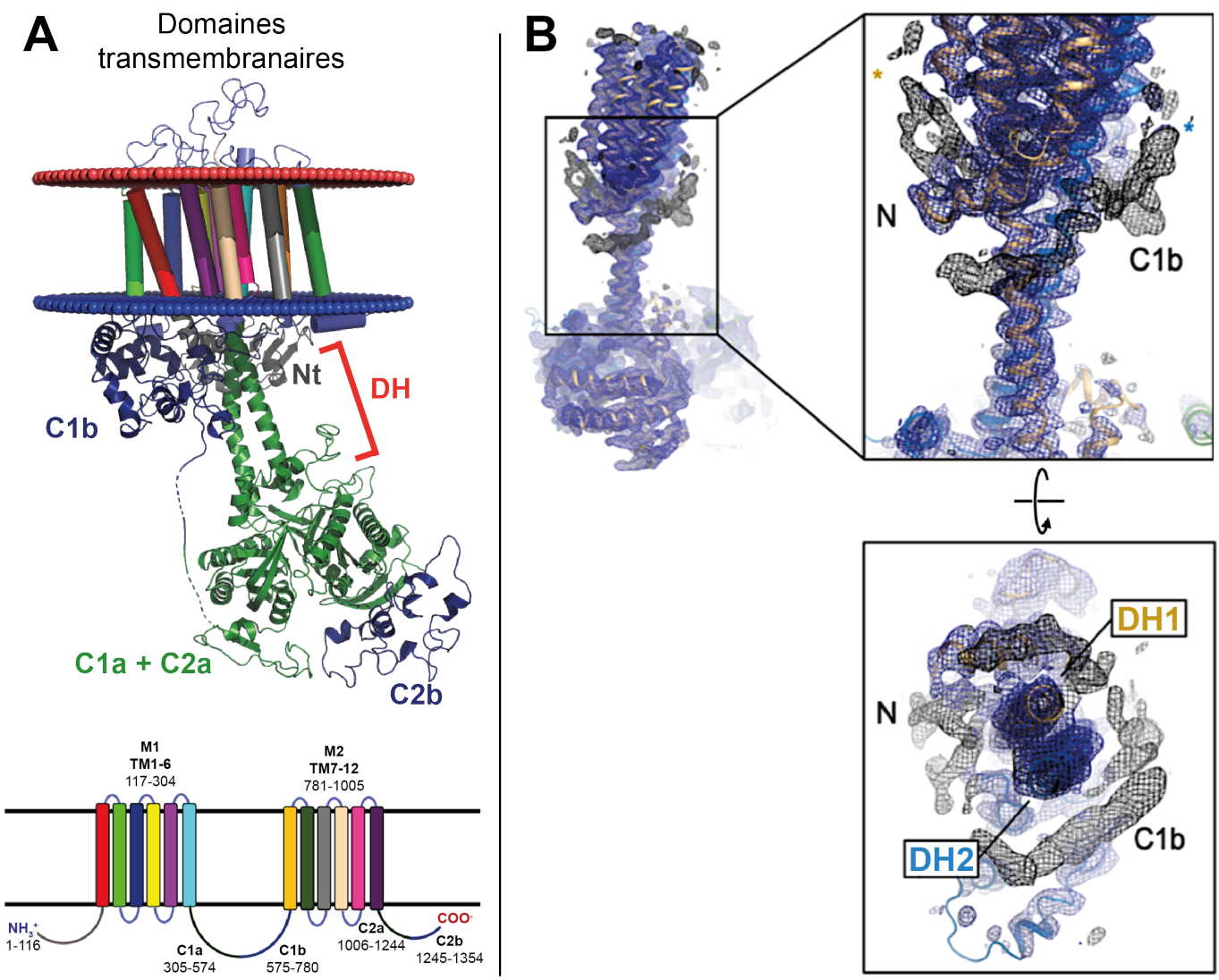


Figure R.15 : Modélisation *in silico* de l'AC9 et localisation des domaines N-terminal et C1b.

A. La structure de l'AC9 a été complétée par modélisation des domaines N-terminal (gris) et C1b (bleu) qui sont localisés de manière symétrique autour du domaine hélicoïdal (DH). La membrane plasmique est représentée par ses faces extracellulaire (rouge) et intracellulaire (bleu). Le panel inférieur représente la structure primaire de l'AC9 et la localisation de chaque domaine dans la séquence peptidique. **B.** Zoom sur la structure de l'AC9 au niveau des domaines N-terminal et C1b.

L'équipe de Manuel Dauchez, incluant le **Dr. Mahesh Velusami**, a simultanément modélisé individuellement l'ensemble des domaines de l'AC8 et l'AC3 (**Annexe 8, Figure A.18**), et a pu proposer, sur la base de la structure complétée de l'AC9, une structure tridimensionnelle pour les AC3 et AC8A, puis pour l'AC8E. Ces deux AC et le variant de l'AC8, comme l'AC9, présentent un positionnement symétrique et opposé des domaines N-terminal et C1b autour de la région hélicoïdale (**Figure R.16**). Ces modèles vont être testés dans un modèle dynamique de membrane plasmique afin d'en établir la solidité et d'en affiner la structure. **Toutefois, l'ensemble de ces résultats suggère, d'ores et déjà, un rôle essentiel des domines N-terminal et C1b dans la régulation de la commutation conformationnelle (active/inactive) du domaine catalytique des AC**. Le modèle de la structure tridimensionnelle de l'AC8E ne permet cependant pas d'identifier de région potentiellement impliquée dans l'effet dominant-négatif, tant cette structure tridimensionnelle, à l'exception de la région transmembranaire, est similaire à celle proposée pour l'AC8A. La seule différence dans la structure tridimensionnelle du variant de l'AC8, par rapport à l'AC8A, est représentée par le changement de position du TM6 qui, au lieu de traverser la bicouche lipidique de part en part, effectue une boucle afin que les deux domaines C1 et N-terminal puisse être localisés dans le cytosol (**Figure R.16B vs C**).

Ces modèles seront ensuite utilisés pour effectuer des analyses d'amarrage moléculaire à l'aide du serveur CLUSPRO afin de modéliser le complexe AC8E-AC3 (Kozakov *et al.*, 2017).

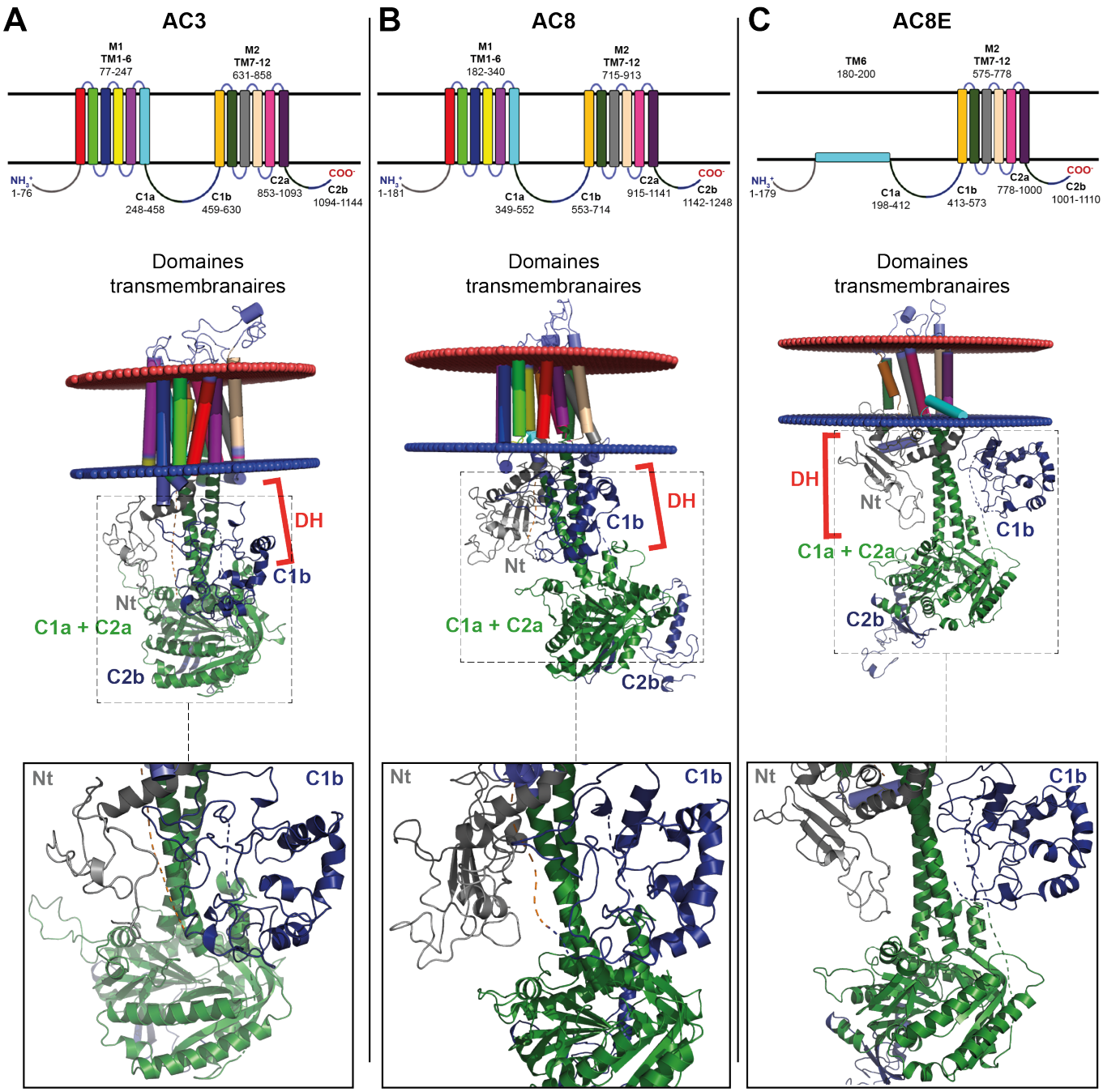


Figure R.16 : Modélisation *in silico* des AC3, AC8 et AC8E.

A. Panel supérieur : structure primaire de l'AC3 et localisation de chaque domaine dans la séquence peptidique. Panel central : modèle de la structure tridimensionnelle de l'AC3. L'encadré en pointillés montre la zone de la structure zoomée dans le panel inférieur, où l'orientation du modèle zoomé permet de visualiser la position symétrique et opposée des domaines N-terminal et C1b. **B.** Idem que **A.** avec l'AC8A. **C.** Idem que **A.** avec l'AC8E.

Article en production pour la publication de ces données :

Ces résultats feront l'objet d'un article qui reste à terminer et dont je serai le co-premier auteur avec Mahesh Velusamy, qui a effectué la modélisation *in silico.* Il s'intitulera ***Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production: functional and structural characterization***. *L'article est actuellement en cours de rédaction et sera ajouté à la version finale du manuscrit de thèse une fois qu'il sera prêt à être soumis.*

Le plan de la section résultats sera le suivant :

- L'AC8E se dimérise avec les AC2, AC3 et AC6 et inhibe leur activité catalytique (**Figure P.1**).
- L'effet inhibiteur de l'AC8E est porté par le domaine N-terminal (**Figure P.2 à Figure P.4**).
- Au niveau cellulaire, la rétention AC8E-dépendante des AC fonctionnelles dans le réticulum endoplasmique est à l'origine de la limitation de la production d'AMPc en réponse à un signal extracellulaire (**Figure P.5**).
- Hétérodimérisation de l'AC8E avec l'AC3 et 6 : identification et caractérisation fonctionnelle des motifs peptidiques impliqués
  - ♦ Criblage à haut débit de la séquence de l'AC8E, l'AC3 et l'AC6 par PEPscan : identification de peptides candidats (**Figure P.6 et Figure P.7**)
  - ♦ Modélisation de la structure tridimensionnelle des AC (**Figure P.8 et Figure P.9**) et sélection des meilleurs peptides candidats par amarrage moléculaire aux structures tridimensionnelles des AC partenaires (***en cours d'analyse***).
  - ♦ Validation des peptides retenus par mesure de la dynamique d'AMPc dans les modèles cellulaires *ad-hoc* (***à générer intégralement***).

Pour compléter le papier en préparation, il reste à :

- Identifier la localisation subcellulaire de l'AC3 co-exprimée avec l'AC8EΔNt, intégration à la **Figure P.5**
- Effectuer de nouveau les mesures de la dynamique d'AMPc dans les modèles cellulaires *ad-hoc*, en introduisant la séquence codante des peptides plutôt que le peptide lui-même. *A noter, les constructions plasmidiques sont déjà effectuées.*

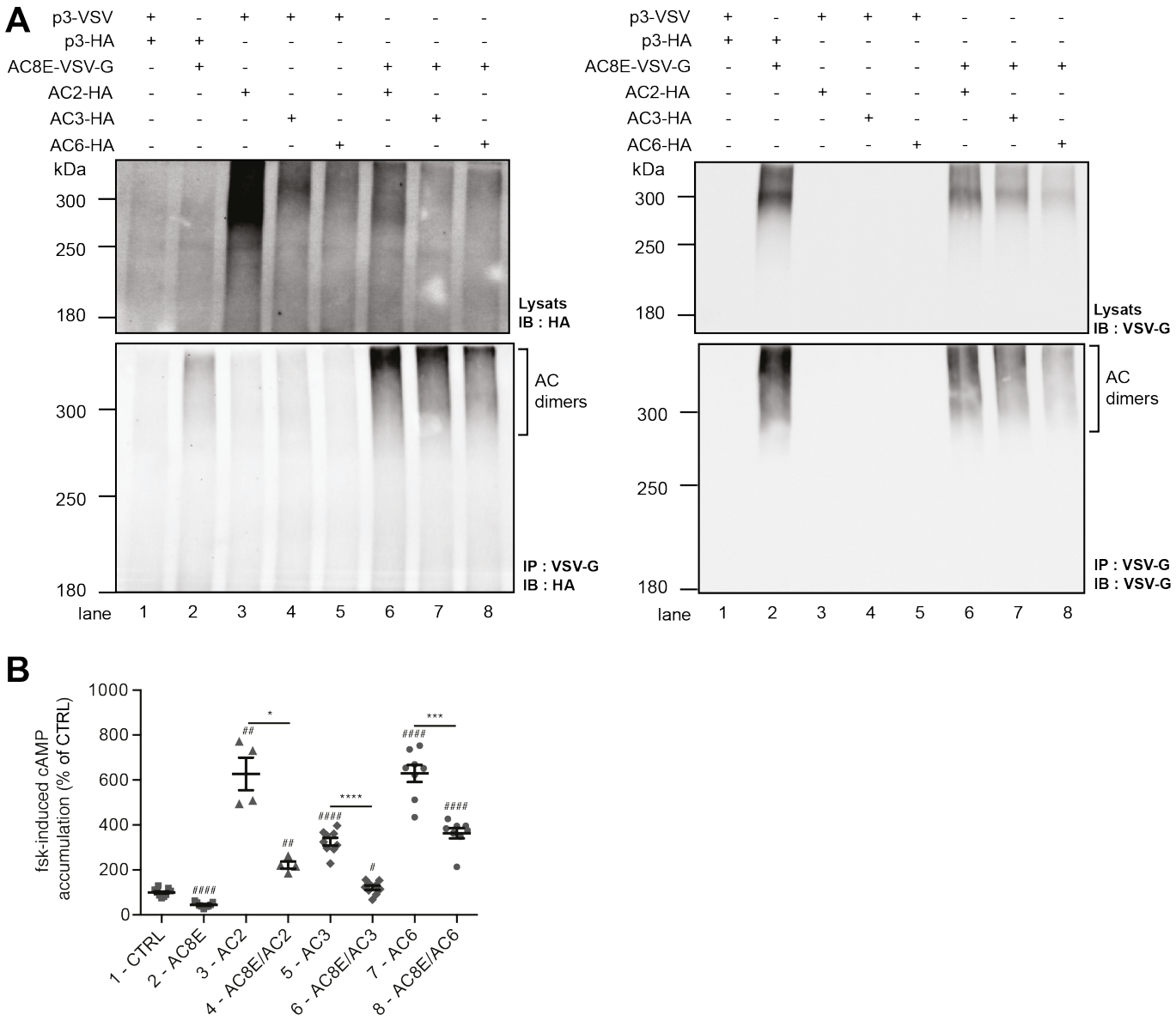


Figure P.1 : AC8E heterodimerizes with AC2, AC3 and AC6 and inhibits AC activity.

A. Western blots showing AC2, -3 and -6 (left panel) and AC8E (right panel) levels in HEK-293 cells transiently expressing VSV-AC8E and/or HA-AC2, HA-AC3, HA-AC6, probed with anti-VSV and anti-HA antibodies. **B.** Western blots showing co-immunoprecipitation results. Immunoprecipitations (IPs) were performed with anti-VSV antibodies. Immunoblots (IBs) were performed with anti-VSV to detect AC8E, and with anti-HA to detect AC2, -3 and -6. **C.** cAMP accumulation assays on HEK cells transfected with empty vector and/or AC8E-encoding vector and/or AC2 or AC3 or AC6-encoding vector, after 60 min of treatment with fsk (10 µM) plus IBMX (500 µM). Results are expressed in % of CTRL and represent the means ± SEM of 4-9 independent experiments. Values were as follows: CTRL: 100.0 ± 6.72 % ; AC8E: 44.90 ± 3.96 % ; AC2: 627.0 ± 72.65 % ; AC8E/AC2: 221.7 ± 15.98 % ; AC3: 326.0 ± 16.91 % ; AC8E/AC3: 121.0 ± 9.66 % ; AC6: 629.3 ± 38.04 % ; AC8E/AC6: 363.1 ± 22.96 %. Side-by-side comparisons were performed with the nonparametric Mann-Whitney test for unpaired data. **** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; # differ from control cells.

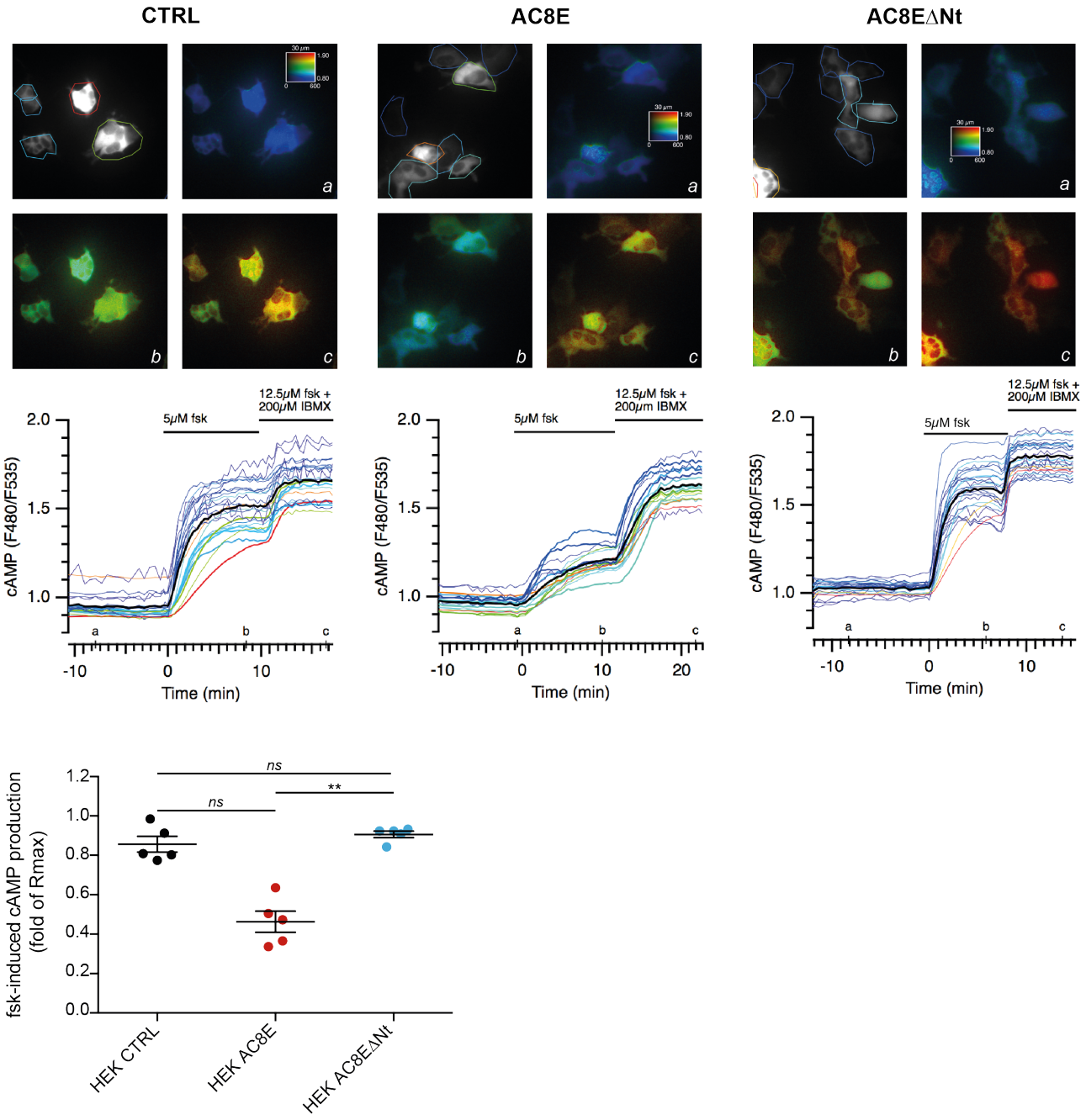


Figure P.2 : N-terminal removal from l'AC8E restores forskolin-induced cAMP production.

Biosensor imaging of relative changes in [cAMP]i following treatment with fsk (5 µM) in control HEK clones and in clones stably expressing AC8E or AC8EΔNt. The final application of fsk (12,5 µM) together with IBMX (200 µM) determined the maximal ratio change. Upper panels: microscopy fields in grayscale (top left) showing biosensor crude fluorescence at 535 nm. The F480/F535 ratio was determined for individual cells, within regions of interest (ROIs) delimited with colored contours. The calibration square indicates the range of intensity (in counts/pixel/s) horizontally and the F480/F535 ratio vertically. Pseudocolored images represent the F480/F535 ratio indicating the [cAMP]i (a) before treatment, (b) during stimulation with fsk (5 µM) and (c) during the application of fsk (12,5 µM) + IBMX (200 µM). Middle panels: each trace indicates the F480/F535 emission ratio over time in individual cells. The black line represents the average of all traces. Lower panel: dot plot and bars representing the mean values for fsk responses. Results are expressed as a fold of the maximal ratio change (fold of Rmax). Data shown are the means ± SEM of N = 5 independent experiments performed on independent clones. For each independent experiment, the calculated value represents the mean of n = 20 to 30 individual cells. Fsk responses were as follows: CTRL : 0.856 ± 0.040 ; AC8E : 0.463 ± 0.053 ; AC8EΔNt : 0.906 ± 0.016. Multiple comparisons to the control condition were performed with the Kruskal-Wallis test. **: $P < 0.01$, *ns*: not significant.

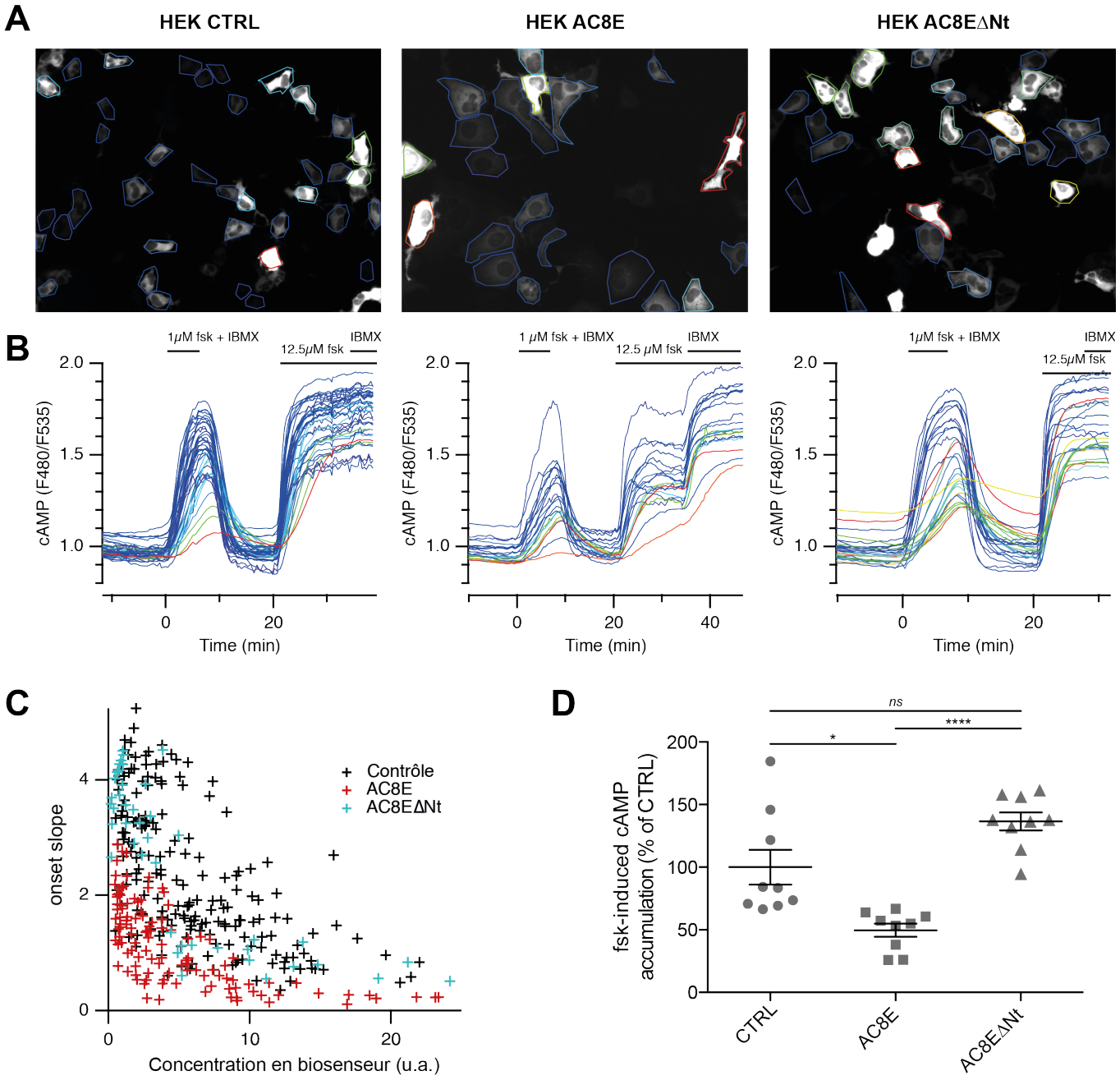


Figure P.3 : N-terminal is necessary to inhibit the activity of endogenous AC.

Changes in [cAMP]i monitored with $^{T}Epac^{VV}$ in control (pcDNA3-transfected) HEK cells (left) or clones stably expressing AC8A (middle) or AC8E (right). A fast perfusion system was used to apply a low concentration of fsk (1 µM) to activate ACs moderately, in the presence of IBMX (200 µM) to block cAMP degradation by PDEs. After recovery, the final application of fsk (12,5 µM) together with IBMX (200 µM) determined the maximal ratio change. **A.** for each cell, biosensor concentration was estimated by measuring the intensity of the brightest 10% of the pixels within the region of interest. The color code of each ROI reflects biosensor concentration: from blue (low) to red (high). **B.** traces indicate the F480/F535 emission ratio over time in the ROIs delimiting each cell. **C.** onset slope of the fluorescence ratio for each cell plotted against fluorescence intensity (cps) reflecting biosensor expression level. Results of 3 independent ex- periments are shown. **D.** cAMP accumulation assays on HEK cells transfected with empty vector (control), AC8E- or AC8EΔNt-encoding vector. Results are expressed in % of control and the means ± SEM of 9 independent experiments are shown. Values were as follows: CTRL : 100.0 ± 13.89 % ; AC8E : 49.65 ± 5.235 % ; AC8EΔNt : 136.6 ± 7.233 %. Side-by-side comparisons were performed with the Kruskal-Wallis test. ****: $P < 0.0001$; *: $P < 0.05$; *ns* : not significant.

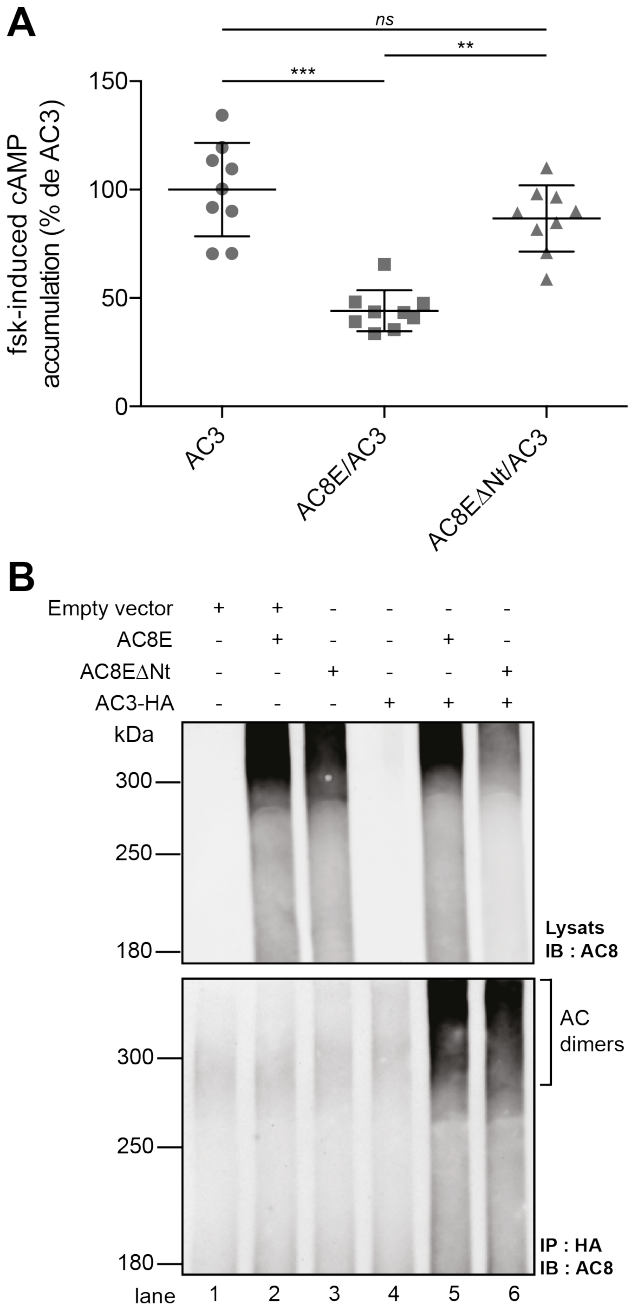


Figure P.4 : N-terminal removal from AC8E suppress the inhibition on AC3 activity, but does not prevent heterodimerization.

A. cAMP accumulation assays on HEK cells transfected with AC3-, AC8E- and/or AC8EΔNt-encoding vector. Results are expressed in % of AC3 and the means ± SEM of 9 independent experiments are shown. Values were as follows: AC3 : 100.0 ± 7.19 % ; AC8E/AC3 : 44.11 ± 3.14 % ; AC8EΔNt/AC3 : 86.68 ± 5.07 %. Side-by-side comparisons were performed with the Kruskal-Wallis test. ***: P < 0.001 ; **: P < 0.01 ; *ns* : not significant. **B.** Upper panel: western blots showing AC8E or AC8EΔNt levels in HEK-293 cells transiently expressing AC8E or AC8EΔNt, and/or HA-AC3. Lower panel: western blots showing co-immunoprecipitation results. Immunoprecipitations (IPs) were performed with anti-HA antibodies. Immunoblots (IBs) were performed with an anti-AC8 antibody to detect AC8E and AC8EΔNt.

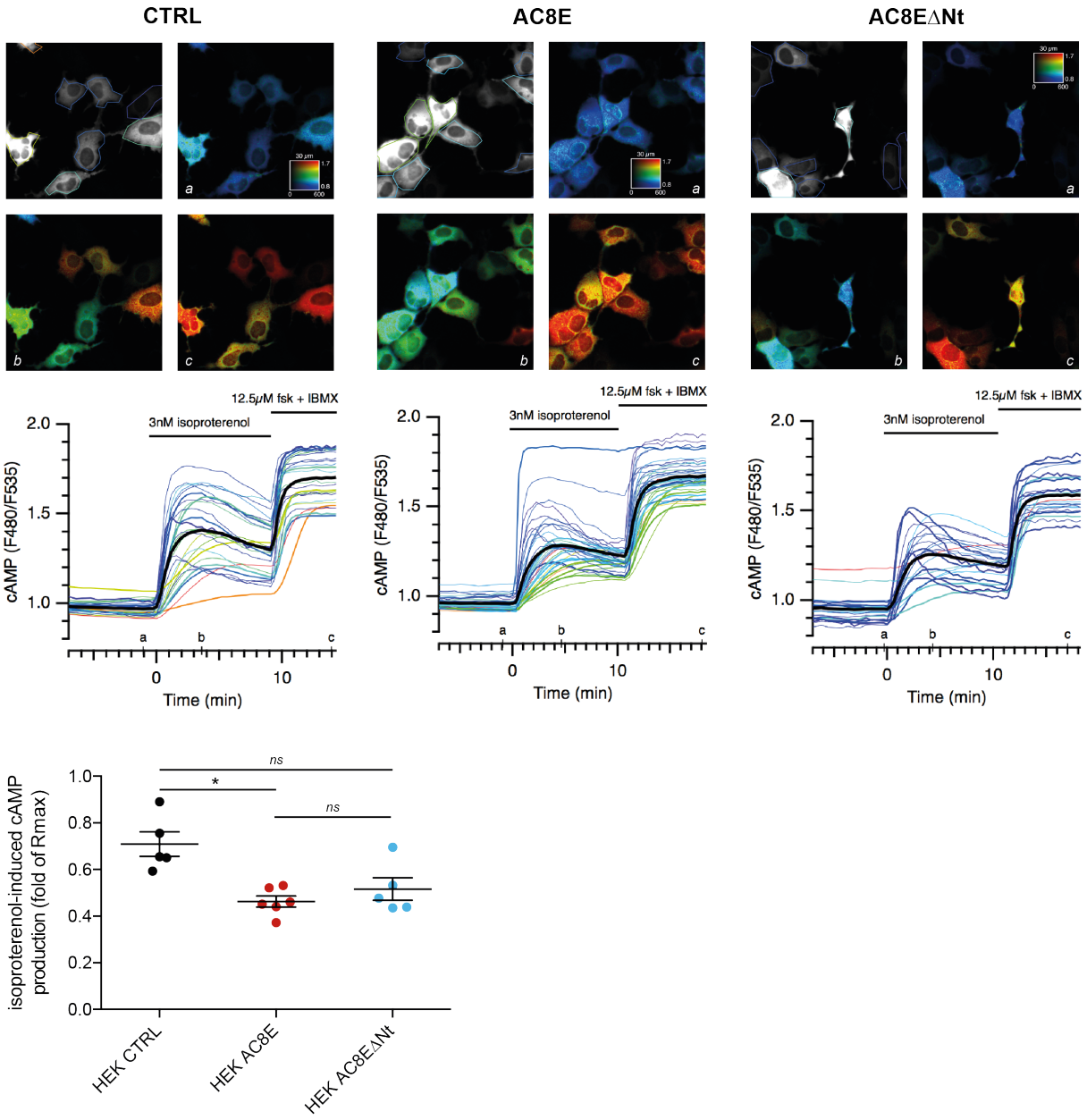


Figure P.5 : Heterodimerization of AC8E and the non-inhibiting mutant AC8EΔNt is sufficient to exert dominant-negative effect.

Biosensor imaging of relative changes in [cAMP]i following treatment with isoproterenol (3 nM) in control HEK clones and in clones stably expressing AC8E or AC8EΔNt. The final application of fsk (12,5 µM) together with IBMX (200 µM) determined the maximal ratio change. Upper panels: microscopy fields in grayscale (top left) showing biosensor crude fluorescence at 535 nm. The F480/F535 ratio was determined for individual cells, within regions of interest (ROIs) delimited with colored contours. The calibration square indicates the range of intensity (in counts/pixel/s) horizontally and the F480/F535 ratio vertically. Pseudocolored images represent the F480/F535 ratio indicating the [cAMP]i (a) before treatment, (b) during stimulation with isoproterenol (3 nM) and (c) during the application of fsk (12,5 µM) + IBMX (200 µM). Middle panels: each trace indicates the F480/F535 emission ratio over time in individual cells. The black line represents the average of all traces. Lower panel: dot plot and bars representing the mean values for fsk responses. Results are expressed as a fold of the maximal ratio change (fold of Rmax). Data shown are the means ± SEM of N = 5-6 independent experiments performed on independent clones. For each independent experiment, the calculated value represents the mean of n = 20 to 30 individual cells. Isoproternol responses were as follows: CTRL : 0.709 ± 0.052 ; AC8E : 0.463 ± 0.024 ; AC8EΔNt : 0.516 ± 0.048. Multiple comparisons to the control condition were performed with the Kruskal-Wallis test. *: $P < 0.05$, *ns*: not significant.

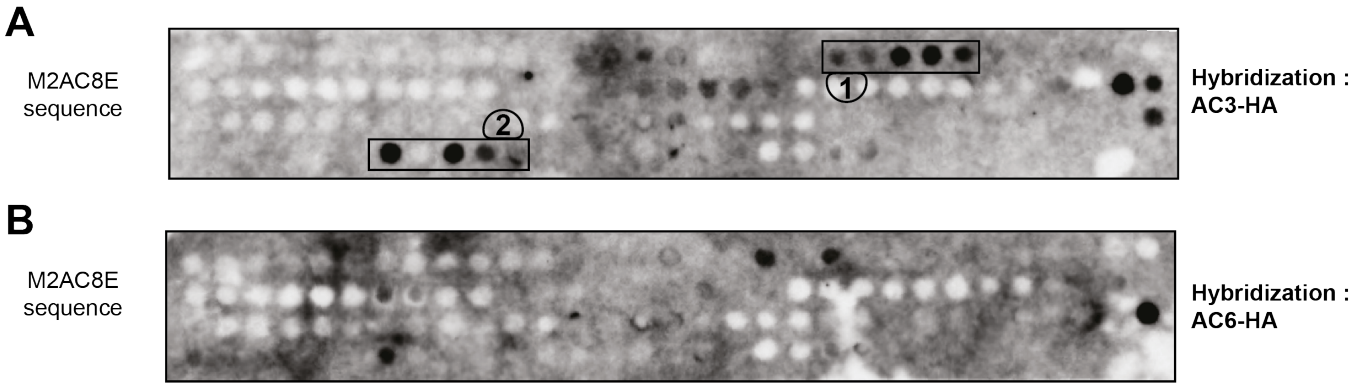


Figure P.6 : Identification of the peptide motifs from AC8E (in red) involved in heterodimerization with AC3 and AC6.

A. Overlaping peptides from AC8E M2 transmembrane cassette, shifted by 2 amino acids from the previous peptide, are spotted onto nitrocellulose membrane. This membrane is incubated with purified AC3-HA, then peptide-protein complexes are detected with an anti-HA antibody. The peptides interacting with AC3-HA are squared and numbered. **B.** Same as **A.** but the hybridization is performed with purified AC6-HA.

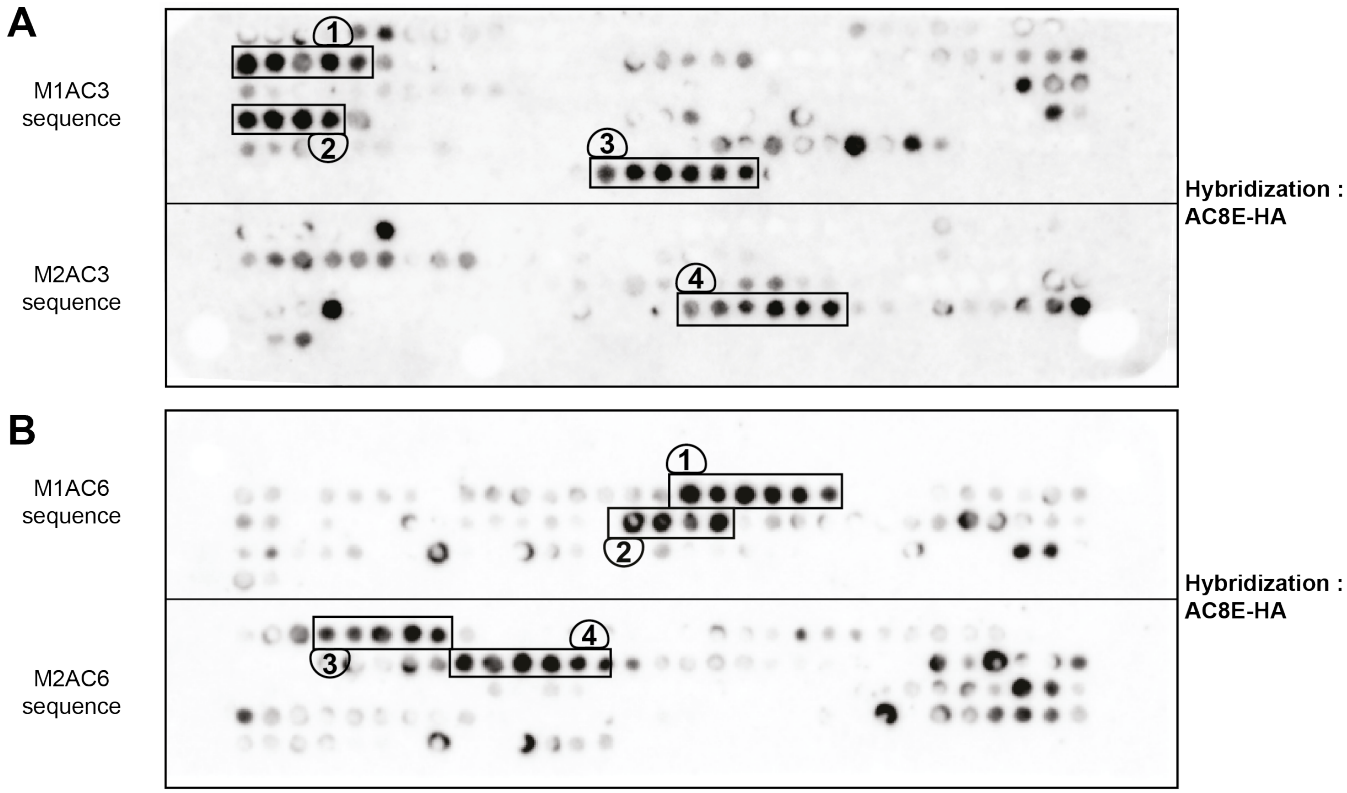


Figure P.7 : Identification of the peptide motifs from AC3 and AC6 (in red) involved in heterodimerization with AC8E.

A. Overlaping peptides from AC3 M1 and M2 transmembrane cassettes, shifted by 2 amino acids from the previous peptide, are spotted onto nitrocellulose membrane. This membrane is incubated with purified AC8E-HA, then peptide-protein complexes are detected with an anti-HA antibody. The peptides interacting with AC8E-HA are squared and numbered. **B.** Same as **A.** but the overlapping peptides are from AC6 M1 and M2 transmembrane cassettes.

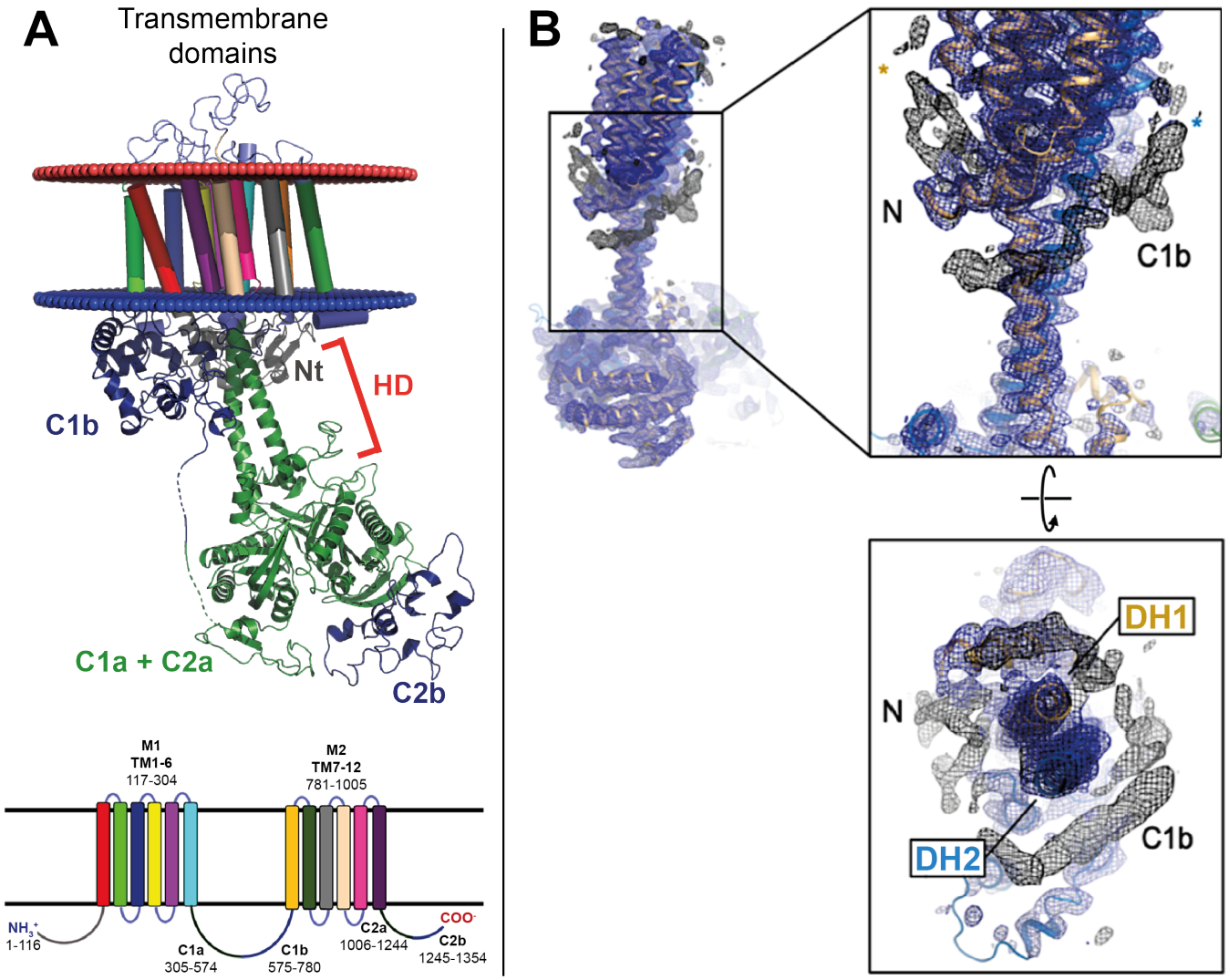


Figure P.8 : *In silico* modeling of AC9 structure and localization of N-terminal et C1b domains.

A. AC9 structure was completed by modeling N-terminal (grey) et C1b (blue) domains, located in a symmetric and opposite way around the helical domains (HD). Plasma membrane is shown with the extracellular (red) and intracellular (blue) faces. Lower panel: AC9 primary structure and localization of each domain in the peptide sequence. **B.** Zoom on N-terminal and C1b domains in AC9 structure.

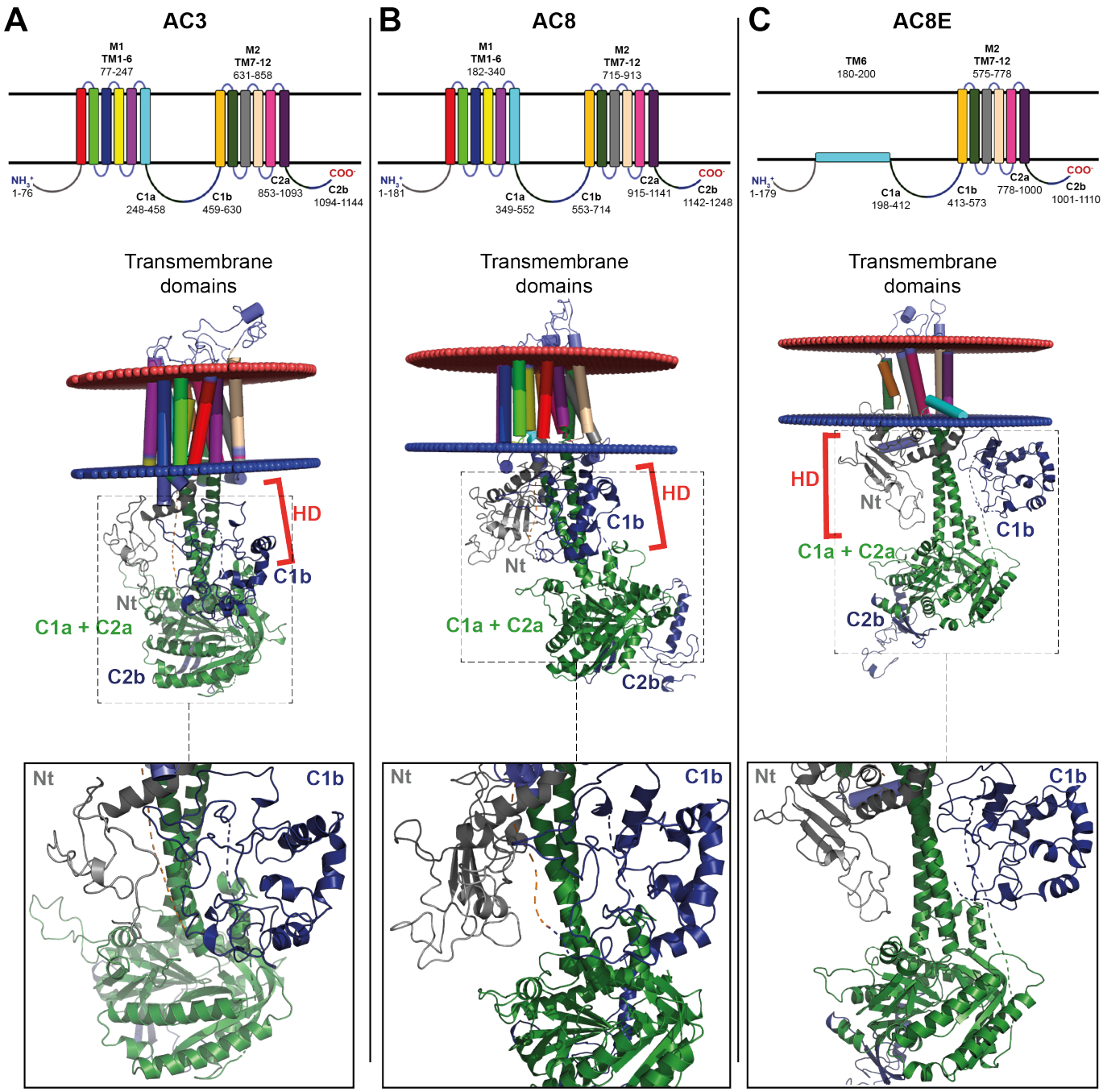


Figure P.9 : *In silico* modeling of AC3, AC8A and AC8E structures.

A. Upper panel: Primary structure of AC3 and localization of each domain in the peptide sequence. Middle panel central: model of the 3D structure of AC3. The squared region is zoomed in the lower panel to show the symmetric and opposite position of N-terminal et C1b domains around the helical domains. **B.** Same as **A.** with AC8A. **C.** Same as **A.** with AC8E.

DISCUSSION

L'expansion des lésions athéromateuses et la re-sténose post-angioplastie résultent principalement d'une modification du phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) médiales (Basatemur *et al.*, 2019). L'AMPc produit par les AC fonctionnelles inhibe les propriétés migratoires (Palmer, Tsoi and Maurice, 1998 ; McKean *et al.*, 2015), prolifératives (Vadiveloo *et al.*, 1997 ; Indolfi *et al.*, 2000 ; Hayashi *et al.*, 2000 ; Begum, Hockman and Manganiello, 2011 ; Hewer *et al.*, 2011) et inflammatoires (Newman *et al.*, 1998, 2003 ; Chatterjee *et al.*, 2014) des CMLV. De plus, de nombreuses études ont montré que l'augmentation de la concentration cytosolique en AMPc dans les CMLV trans-différenciées antagonise les remodelages vasculaires pathologiques (Indolfi *et al.*, 2000 ; Inoue *et al.*, 2000 ; Sassi *et al.*, 2008). Nous avons découvert une nouvelle famille d'adénylyl cyclase, les AC8E-H, dérivée de variants d'épissages alternatifs de l'ARN primaire codant l'AC8 pleine taille, et qui est spécifiquement exprimée dans des CMLV trans-différenciées. En utilisant l'imagerie de biosenseur et des approches biochimiques, nous avons montré que l'AC8E est catalytiquement inactive et agit comme un dominant-négatif en s'hétérodimérisant avec les AC fonctionnelles des CMLV (qui expriment majoritairement l'AC3 et l'AC6), empêchant ainsi le trafic d'unités fonctionnelles vers la membrane plasmique. En démontrant la dualité fonctionnelle de l'AC8, – *avec l'enzyme pleine taille qui produit de l'AMPc, alors que les versions tronquées AC8EE-H l'inhibent en exerçant un effet inhibiteur sur les autres AC* – nous réconcilions l'expression *de novo* d'une AC avec le processus de trans-différenciation des CMLV. L'étude structure/fonction de L'AC8E met en évidence que le domaine N-terminal de l'AC8E est nécessaire à la fonction inhibitrice de l'activité catalytique des AC partenaires, même si l'hétérodimérisation et la rétention intracellulaire des dimères sont les deux mécanismes qui réduisent *de facto* la production d'AMPc cellulaire en réponse à un signal extracellulaire. Enfin, un criblage haut débit de la séquence de l'AC8E et des AC partenaires ont permis d'identifier des motifs d'hétérodimérisation et de proposer des peptides interférents. Parallèlement, la modélisation de la structure tridimensionnelle de l'AC8E et de l'AC3 sur la base de celle de l'AC9 (Qi *et al.*, 2019) a été réalisée par l'équipe du Pr M. Dauchez ; celle du complexe AC8E-AC3 est à venir. Ces structures 3D serviront à caractériser le mode d'interaction entre les peptides correspondants aux motifs d'hétérodimérisation et leur cible (procédure d'amarrage classique) pour déterminer les meilleurs candidats puis les optimiser.

I. Caractérisation d'une nouvelle famille de variants d'épissage alternatif de l'adenylyl cyclase 8

A. Mise en évidence

Nous avons découvert, dans les CMLV de rat trans-différenciées à l'IL-1β, 4 nouveaux variants d'épissage de l 'AC8A, les AC8E à -H, qui sont générés par un mécanisme d'épissage alternatif. Les ARNm matures codant ces variants présentent une délétion commune de 414pb à la fin de l'exon 1, du fait d'un site donneur alternatif dans l'exon 1. Les variants d'épissage AC8F, -G et -H sont également porteurs des délétions caractérisées dans les variants AC8C, -B et -D, respectivement (Cali, Parekh and Krupinski, 1996 ; Delmeire *et al.*, 2003). L'AC8E est donc uniquement amputée des 5 premiers domaines transmembranaires, alors qu'il manque également à l'AC8F une portion du domaine C1b, à l'AC8G la cinquième boucle extracellulaire et, à l'AC8H, les deux domaines susmentionnés (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig. 1*** et ***Fig. S3***). On notera que **le site d'épissage alternatif à l'origine des AC8E-H est conservé dans les gènes *ADCY8* humain et *Adcy8* murin.** L'absence de la cinquième boucle extracellulaire de la cassette transmembranaire M2, qui contient les deux sites de N-Glycosylation, N814 et N818, induit un défaut de N-glycosylation de l'AC8B qui réduit son expression par rapport à celle de l'AC8A (Cali, Parekh and Krupinski, 1996). L'expression des transporteurs ABC tels que la glycoprotéine P, les transporteur ABCG2 et ABCA3, et le canal CFTR, qui présentent une structure primaire comparable aux AC, est diminuée lorsque ce type de modifications post-traductionnelles est altéré (Schinkel *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2008 ; Nakagawa *et al.*, 2009 ; Beers *et al.*, 2013 ; Glozman *et al.*, 2009). Il est donc cohérent que les AC8G et -H, qui partagent la même délétion que l'AC8B, présentent un faible niveau d'expression protéique dans les HEK lorsqu'ils sont exprimés transitoirement ou stablement. (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.3A et B***).

Dans les CMLV trans-différenciées, les AC8E-H inhibent la dynamique de production d'AMPc. En effet, l'amplitude de la production d'AMPc en réponse à la forskoline est significativement diminuée dans les CMLV trans-différenciées à l'IL-1β par rapport aux contrôles, et l'extinction de l'expression de l'AC8 réduit significativement cette inhibition (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig. 2***). Au regard de l'effet d'une augmentation de l'AMPc dans les CMLV trans-différenciées (**voir *Introduction – Partie 2.III.B. Effets de la signalisation AMPc dans les cellules musculaires lisses vasculaires***), **l'expression des AC8E-H constitue un des mécanismes de la CMLV qui favoriserait sa trans-différenciation, à savoir l'acquisition des propriétés migratoires, prolifératives et inflammatoires**.

B. Caractérisation biochimique et fonctionnelle

Les expériences de fractionnement subcellulaire réalisées à partir de cellules HEK293 surexprimant les AC8E à H ou l'AC8A mettent en évidence qu'elles sont totalement absentes de la fraction cytosolique et quasiment indétectables dans les membranes de faible densité du réticulum endoplasmique lisse, de l'appareil de Golgi et des polysomes. En revanche, elles

sont toutes majoritairement localisées dans les membranes de forte densité des mitochondries, du réticulum endoplasmique granuleux (REG), et de la membrane plasmique (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.3B***). L'immunomarquage réalisé sur des cellules surexprimant l'AC8E étiquetée VSV-G précise la localisation sub-cellulaire de cette protéine au REG ; en effet, celui–ci est restreint à la périphérie du noyau comme celui de la calnexine (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig. 3C*** ; Myhill *et al.*, 2008). L'AC8A, quant à elle, est bien présente au niveau de la membrane plasmique, comme attendu (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig. 3C***). La purification des protéines de surface confirme les données d'immunocytochimie puisqu' aucun signal immunoréactif n'est observé dans les cellules exprimant l'AC8E, contrairement à l'AC8A (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.3D***). **L'ensemble de ces résultats démontre que l'enzyme tronquée n'est pas exportée vers la membrane plasmique et reste piégée dans le REG.**

Ces données sont en accord avec les résultats de Gu et collaborateurs, qui rapportent que la dimérisation intramoléculaire entre les deux cassettes transmembranaire intactes M1 et M2 de l'AC8 est nécessaire à l'export de la protéine vers la membrane plasmique. En effet, ils démontrent *i)* qu'amputer l'AC8 de l'une de ses 2 cassettes transmembranaires la relocalise en péri-nucléaire, mais *ii)* que la co-expression des deux moitiés de l'AC8, chacune porteuse d'une seule des deux cassettes transmembranaires, se traduit par un signal à la membrane plasmique. De plus, la délétion du TM6 de la cassette M1, ou d'une moitié de la cassette M2 (délétion des TM7-9 ou des TM10-12), empêchant la dimérisation intramoléculaire bloque l'export vers la membrane plasmique (Gu, Sorkin and Cooper, 2001). Nos données, juxtaposées à ceux de Gu et collaborateurs, nous permettent de suggérer que c'est **l'absence de dimérisation intramoléculaire des AC8E-H qui serait à l'origine de leur rétention intracellulaire**.

L'analyse fonctionnelle de l'AC8E dans des lignées monoclonales de HEK, indique qu'elle est dépourvue d'activité enzymatique. En effet, elle est incapable de produire de l'AMPc en réponse au calcium capacitatif, l'activateur principal de l'AC8A (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.4B*** ; Cali *et al.*, 1994). Là encore, ce résultat est en accord avec les travaux de Gu et collaborateurs, qui rapportent que la dimérisation intramoléculaire des AC est nécessaire pour observer une activité catalytique (Gu, Sorkin and Cooper, 2001). Sur la base de ces données, nous proposons que l'absence **de dimérisation intramoléculaire des AC8E-H empêche la formation d'un site catalytique fonctionnel**.

Cette famille d'AC tronquées exerce un effet dominant-négatif vis à vis des autres AC fonctionnelles. En effet, dans des lignées monoclonales de HEK exprimant de façon stable les AC8E-H, *i)* la dynamique de production d'AMPc en réponse à la forskoline est diminuée par rapport aux cellules contrôles (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.4A*** et ***Fig.5B***) ; *ii)* la vitesse de production de l'AMPc, mesurée après avoir inhibé les PDE, est réduite par rapport aux cellules contrôles (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.5A***). Parallèlement, l'accumulation d'AMPc est significativement réduite dans des cellules HEK exprimant transitoirement l'AC8E, par rapport aux cellules contrôles (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.5B***). **Ces résultats démontrent, non**

seulement l'effet dominant-négatif des AC8E-H, mais réfutent également l'hypothèse selon laquelle cette inhibition de l'élévation de la concentration cytosolique en AMPc résulterait d'une augmentation de l'activité des PDE.

Ce mécanisme viendrait renforcer ceux qui régulent l'expression et/ou l'activité des protéines capables de limiter l'accumulation de l'AMPc dans les CMLV trans-différenciées. Parmi ces protéines, on citera la PDE1C dont l'activité induit la prolifération et la migration des CMLV, tant *in vitro* qu'*in vivo*, et dont l'expression est régulée positivement dans les CML prolifératives d'artères humaines (Rybalkin *et al.*, 1997, 2002 ; Cai *et al.*, 2015). On mentionnera également le transporteur MRP4, dont l'expression augmente au cours de l'hyperplasie néo-intimale chez le rat, et lors de la prolifération de CMLV issues d'artères coronaires humaines (Sassi *et al.*, 2008). En accord avec l'hypothèse de plusieurs mécanismes qui limiteraient l'accumulation de l'AMPc dans les CMLV trans-différenciées, la production d'AMPc n'est pas complétement restaurée dans les cellules où l'expression des AC8E-H a été invalidée (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig. 2***).

L'analyse du profil de migration après SDS-PAGE et immunoblot des variants AC8E-H sur-exprimés dans les cellules HEK met en évidence deux types de signaux correspondants à la forme monomérique (entre 100 et 130kDa) et aux formes dimériques ou oligomériques (> à 250kDa). **Les AC8E-H sont donc capables de s'assembler sous la forme de dimères, voire de multimères. La dimérisation et l'oligomérisation des variants AC8E-H s'effectuent par l'intermédiaire du domaine M2** (**Annexe 1**)**.** Nos observations corroborent celles de Gu et collaborateurs. En effet, ils démontrent que l'homodimérisation de l'AC8A s'effectue *via* la cassette transmembranaire M2 en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation avec des mutants de délétion de l'AC8A, et des expériences de FRET avec des constructions codant les cassettes transmembranaires M1 ou M2 de l'AC8A fusionnées avec un fluorochromes CFP ou YFP (Gu, Cali and Cooper, 2002).

Une première série d'expériences de co-immunoprécipitation, réalisées dans les cellules HEK sur-exprimant l'AC8E et l'AC3, met en évidence une interaction physique entre l'AC8E et AC3 (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.6B***). Cette interaction, qui s'effectue *via* la cassette transmembranaire M2 de l'AC8E (**Annexe 1**), est confirmée par les expériences d'immunocytochimie qui montrent que l'expression de l'AC8E ou l'AC8A détermine la localisation de l'AC3 (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.6D***). Une deuxième série d'expériences démontre que l'AC8E se dimérise avec au moins un membre de deux autres familles d'AC : l'AC2, du groupe 2 ; et l'AC6, du groupe 3 (**Résultats**, **Figure R.5**) et que cela se traduit comme pour l'AC3 par une inhibition de l'activité de l'AC partenaire (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.6C*** **et Résultats**, **Figure R.6**). **Les AC8E-H exercent un effet dominant négatif sur la production de l'AMPc en se dimérisant avec les AC fonctionnelles. Ces variants d'épissage pourraient donc constituer un système de régulation négative de la synthèse d'AMPc dans l'intégration du signal**. Ces résultats sont en accord avec l'idée avancée par Baragli et ses collaborateurs, selon laquelle l'homo- ou l'hétérodimérisation des AC module leur activité (Baragli *et al.*, 2008). Ils corroborent également ceux de Ding et ses collaborateurs, qui ont

montré que la co-expression d'une AC6 pleine-taille avec un mutant tronqué de l'AC6, exprimant uniquement le segment Nt-M1-C1 induit une diminution significative de la production d'AMPc par l'AC6 en réponse à la forskoline, et empêche cette dernière d'atteindre la membrane plasmique (Ding, Gros and Feldman, 2005). Pour autant, on ne pas exclure une certaine spécificité d'inhibition des variants d'épissage d'AC : Ding et collaborateurs montrent que le segment Nt-M1-C1 de l'AC6 inhibe efficacement l'activité des AC5 et -6, mais n'exerce aucun effet inhibiteur sur les AC1 et -2, bien que ces dernières interagissent avec (Ding, Gros and Feldman, 2005).

Il est intéressant de noter la différence entre la masse moléculaire attendue des homodimères d'AC8E-H – entre 228 et 250 kDa selon la masse moléculaire théorique des monomères (calculé sur le logiciel *SerialCloner*) – **et celle des formes multimériques réellement observée sur SDS-PAGE**. Compte tenu des conditions de traitement des échantillons (dénaturantes et non réductrices) et du profil étalé des signaux immunoréactifs, le retard de migration de ces complexes, pourrait résulter de leur linéarisation incomplète. Le profil « multi-bandes » de l'immunoblot observé aux alentours de 300kDa (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.5B*** et **Résultats**, **Figure R.5**) serait en accord avec la capacité du domaine N-terminal de l'AC8 à interagir avec de nombreux partenaires comme la calmoduline (Simpson, Ciruela and Cooper, 2006), l'AKAP79 (Willoughby *et al.*, 2010), Orai1 (Willoughby, Everett, *et al.*, 2012) ou encore le cytosquelette d'actine (Ayling *et al.*, 2012). **Les signaux immunoréactifs pourraient donc correspondre à des complexes protéiques impliquant deux ou plus de deux AC et des partenaires d'interaction**. En outre, la capacité des variants AC8E-H à s'oligomériser pourrait expliquer leur effet inhibiteur significatif alors qu'ils sont exprimés en faible quantité dans les CMLV trans-différenciées à l'IL-1β[31].

C. Le domaine N-terminal est nécessaire à l'effet dominant-négatif des AC8E-H

La loi de la balance des charges formulée par Hartmann et ses collaborateurs met en évidence que la charge portée par les 15aa flanquant un domaine transmembranaire conditionne son orientation dans la bicouche lipidique. L'analyse des charges portées par les motifs peptidiques flanquant chaque domaine transmembranaire de l'AC8A démontre que son orientation dans la bicouche lipidique respecte parfaitement la loi de la balance des charges (**Annexe 3**, **Figure A.3**). En accord avec les résultats expérimentaux démontrant la N-glycosylation de l'AC8E et sa capacité à interagir physiquement avec l'AKAP79 (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.S7 et S9***), l'orientation de l'AC8E dans la bicouche lipidique est similaire à celle de l'AC8A. La cassette transmembranaire M2 de l'AC8E est insérée dans la bicouche lipidique comme l'est celle de l'AC8A et **l'absence des 5 premiers domaines induit une relocalisation du TM6 dans le cytosol.** En effet, il est incapable de franchir la bicouche lipidique en raison des contraintes de charges exercées sur lui par ses régions flanquantes

[31] Les AC8E-H sont peu exprimées dans les CMLV trans-différenciées à l'IL-1β par rapport aux AC3 et -6, sur la base des résultats de quantification absolue par PCR (résultats non publiés).

(**Annexe 3**, **Figure A.4**). **L'absence des 5 premiers domaines transmembranaires de l'AC8 altère très probablement la conformation du domaine N-terminal, voire celle de la région C1. Si tel était le cas, cela suggèrerait que le domaine N-terminal soit impliqué dans l'effet inhibiteur des variants AC8E-H.**

Cette hypothèse a été évaluée en générant un mutant de l'AC8E présentant une délétion totale du domaine N-terminal : l'AC8EΔNt. L'analyse de la vitesse de production d'AMPc en réponse à la forskoline par imagerie de biosenseur optique FRET dans des lignées monoclonales exprimant stablement l'AC8E ou l'AC8EΔNt révèle **que la délétion du domaine N-terminal de l'AC8E supprime totalement son effet dominant-négatif** (**Résultats**, **Figure R.10**). Ces résultats sont confirmés par les expériences de dosages d'accumulation d'AMPc (**Résultats**, **Figure R.10D**). De plus, les résultats de **Figure R.11** montre que l'AC8EΔNt n'exerce aucune inhibition sur l'activité de l'AC3 dans des cellules les co-exprimant même si cette délétion n'altère pas la capacité de l'AC8EΔNt à interagir avec l'AC3 (**Résultats**, **Figure R.12**). **L'ensemble de ces résultats confirmait l'importance du domaine N-terminal dans l'effet dominant-négatif de l'AC8E.**

Pour préciser le ou les motif(s) du domaine N-terminal impliqué(s) dans cet effet, quatre mutants de délétion partielle ont été générés : AC8EΔ2-44, AC8EΔ45-89, AC8EΔ90-134, AC8EΔ135-179. Comme le montre la **Figure A.6** de l'**Annexe 4**, **aucune de ces délétions ne mime l'effet de la délétion complète du domaine N-terminal**. Nous émettons donc l'hypothèse selon laquelle **la délétion du domaine N-terminal induit un changement conformationnel tel qu'il annulerait le pouvoir inhibiteur de l'AC8E. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que la suppression de la contrainte de charge que représente le domaine N-terminal pourrait permettre au TM6 de s'insérer à nouveau dans la bicouche lipidique**.

D. L'hétérodimérisation des ACE-H/AC, retenant les AC fonctionnelles dans le REG, est suffisante pour l'effet dominant-négatif

La forskoline permet d'appréhender l'activité cyclase des AC, à l'exception de l'AC9 (Buck *et al.*, 1999), qu'elles soient ancrées à la membrane plasmique ou confinées aux membranes du REG. En effet la forskoline est un diterpène qui est capable de franchir les membranes cellulaires. Aussi, la question de savoir comment l'AC8E modifie l'intégration du signal restait entière. Nous avons donc analysé la production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs β-adrénergiques. Comme le montre la **Figure R.11**, la production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol diminue significativement dans les cellules exprimant l'AC8E par rapport aux cellules contrôles. De façon intéressante, il en est de même pour les cellules exprimant l'AC8EΔNt. *Pour rappel, ce mutant n'exerce aucun effet inhibiteur sur ses AC partenaires mais, supposément, il continue de les piéger dans le REG*. **Empêcher l'export des AC vers la membrane plasmique constitue un mécanisme cellulaire suffisant pour que l'AC8E exerce son effet dominant-négatif**.

En outre, il est possible que les AC8E-H, piégeant les AC fonctionnelles dans le REG, induisent leur dégradation[32]. En effet, L'expression des AC8E-H est responsable d'une diminution significative de l'expression de l'AC6 dans les CMLV trans-différenciées ; à l'inverse, leur extinction la restaure à un niveau comparable à celui observé dans les CMLV contrôles (**Annexe 2**). Ce résultat est en accord avec ceux de Ding et collaborateurs, qui montrent que la co-expression de l'AC6 avec l'AC6 tronqué de l'AC6 (Nt-M1-C1), induit une diminution significative du niveau d'expression protéique de l'AC6 (Ding, Gros and Feldman, 2005).

L'expression de protéines tronquées issues de d'épissage alternatif qui agissent en dominant-négatif en retenant leur homologue fonctionnel dans le RE constitue un mécanisme de régulation connu pour d'autres protéines transmembranaires. On citera des travaux concernant des GPCR comme le récepteur à la GnRH (*gonadotropin-releasing hormone* ; Grosse *et al.*, 1997), le récepteur à la vasopressine de type V2 (Zhu and Wess, 1998), le récepteur à la dopamine D3 (Karpa *et al.*, 2000) et le récepteur des chémokines CCR5 (Benkirane *et al.*, 1997). Un mécanisme similaire a été identifié pour l'aquaporine 4 humaine avec un variant d'épissage alternatif, qui diffère de la protéine sauvage par la délétion de l'exon 4. Ce variant d'épissage alternatif, exprimé dans le muscle squelettique humain, est retenu dans les membranes du réticulum endoplasmique et ne présente aucune activité de transport d'eau. Co-exprimée avec l'aquaporine 4 sauvage, ce variant tronqué exerce un effet dominant-négatif en raison d'une interaction physique directe entre les deux protéines. De façon intéressante, cette hétérodimérisation empêche l'export de la protéine sauvage vers la membrane plasmique et induit sa dégradation de par le protéasome (De Bellis *et al.*, 2014). Enfin, les transporteurs ABC, dont la structure primaire est très similaire à celle des AC, s'expriment également sous la forme de protéines tronquées issues de mécanismes d'épissage alternatif (Srinivasan, Bingham and Johnson, 2009). La version tronquée du transporteur ABCA1 inhibe l'activité de la forme sauvage pleine taille, induisant une diminution du LDL-cholestérol circulant chez ce patient (Wellington *et al.*, 2002 ; Rhyne *et al.*, 2009).

[32] Pour rappel, c'est dans le réticulum endoplasmique que prend place le repliement et le contrôle qualité des protéines destinées à être secrétée ou exportées vers la membrane plasmique. Mal conformées, les protéines se voient dégradées par la voie ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation, Ellgaard and Helenius, 2003)

II. Identification des motifs peptidiques impliqués dans l'hétérodimérisation

Empêcher l'effet dominant-négatif des AC8E-H nécessite d'altérer leur capacité à s'hétérodimériser avec leurs AC partenaires fonctionnelles.

La technique du PEPscan permet d'identifier des motifs peptidiques d'interaction protéine-protéine, mais elle nécessite des quantités importantes de protéines pures. La purification de protéine en grande quantité se fait généralement en système bactérien en raison du rendement élevé de cette méthode de production. Cependant, la production de protéines transmembranaire en système bactérien est souvent de faible rendement du fait de la toxicité des protéines membranaires eucaryotes lorsque celles-ci sont surexprimées chez *E. coli* (Wagner *et al.*, 2007). Nous avons donc purifié les protéines de fusion AC8E, -3 et -6 étiquetées HA à partir de lignées monoclonales de HEK les surexprimant. Cette purification, effectuée par chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps anti-HA couplés à des billes magnétiques et SDS-PAGE suivie d'une électroélution, a permis de récupérer une quantité suffisante estimée à environ 10µg de chaque protéine de fusion (**Annexe 6**). **Les résultats du PEPscan mettent en évidence que l'interaction entre les AC implique de plusieurs motifs peptidiques localisés dans les cassettes transmembranaires et dans la région C1 à proximité des domaines transmembranaires** (**Résultats**, **Figure R.12 et Figure R.13**).

Sur la base des résultats de PEPscan, nous avons fait synthétiser **10 peptides candidats** (**Tableau R.1**) : les peptides P1AC3 à P4AC3, ainsi que les peptides P1AC8 et P2AC8, susceptibles d'interférer avec l'assemblage du complexe AC8E-AC3, ainsi que les peptides P1AC6 à P4AC6, susceptibles d'interférer avec l'assemblage du complexe AC8E-AC6. Pour qu'ils pénètrent dans la cellule, tous les peptides sont flanqués d'une séquence cargo Mut3-DPT. Cette séquence cargo, caractérisée par Dominguez-Berrocal et ses collaborateurs (Dominguez-Berrocal *et al.*, 2019), a été choisie car elle confère une meilleure stabilité aux peptides dans le sérum, une resistance aux peptidases n'étant pas observée avec d'autres cargos comme Mut1-DPT et Mut2-DPT (Fominaya *et al.*, 2015).

Dans nos expériences préliminaires, aucun des 10 peptides candidats n'a permis de restaurer, même partiellement la production d'AMPc en réponse à la forskoline des CMLV trans-différenciées à l'IL-1β au niveau de celui observé dans les CMLV contrôle (**Figure R.14**). Bien qu'il soit nécessaire d'augmenter le *n* de ces expériences, plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence d'efficacité des peptides testés :

- Malgré l'addition d'une séquence cargo, la pénétration cellulaire pourrait être insuffisante. En effet, celle-ci dépend du type cellulaire adressé et peut être augmentée par la cyclisation des peptides (Ramaker *et al.*, 2018 ; Patel *et al.*, 2019). Un contrôle, en couplant le cargo à une protéine fluorescente, devra être réalisé avant de continuer plus avant les tests avec ces peptides. Si la pénétrance s'avérait insuffisante, les peptides candidats seront délivrés par transfection d'un plasmide contenant le cDNA les codant (Hasbi *et al.*, 2014).

- La cible des peptides étant insérée dans les membranes du réticulum endoplasmique, l'addition d'une séquence `KDEL` à l'extrémité C-terminale du peptide permettrait peut-être un meilleur routage du peptide (Cerrato, Künnapuu and Langel, 2017).
- Comme plusieurs régions d'interaction ont été identifiées pour chaque AC constitutives des hétérodimères (**Figure R.12Figure R.13**), il est probable qu'un mélange de plusieurs peptides soit nécessaire à dissocier le complexe.

Enfin, il n'est pas exclu que l'interaction soit trop forte pour que les peptides puissent dissocier efficacement ces complexes. En effet, les dimères d'AC résistent aux détergents, tels que le NP-40 ou le LDS, à la sonication et aux conditions dénaturantes du SDS-PAGE. Cependant, il est à noter que cette hypothèse est peu probable : des peptides ont déjà été utilisés pour bloquer la dimérisation du récepteur β2-adrénergique, bien que le dimère soit résistant au SDS (Hebert *et al.*, 1996).

III. Modélisation de la structure tridimensionnelle des adenylyl cyclases

Jusqu'à présent, aucune structure tridimensionnelle intégrale d'AC transmembranaire n'a été résolue. Qi et ses collaborateurs ont proposé, en 2019, une structure tridimensionnelle de l'AC9 quasi intégrale résolue par cryo-microscopie électronique. Cependant, celle-ci ne permet pas de localiser les domaines N-terminal et C1b (Qi *et al.*, 2019).

En premier lieu, nos collaborateurs de l'équipe du Pr. Manuel Dauchez ont complété la structure tridimensionnelle partielle de l'AC9 en modélisant les domaines manquant à cette structure, à savoir les domaines N-terminal et C1b. Ils ont ainsi pu proposer, pour la première fois, un modèle de la structure tridimensionnelle complète d'une AC (**Figure R.15**). **Ce modèle de l'AC9 révèle un positionnement symétrique des domaines N-terminal et C1b autour de la région hélicoïdale de l'AC, localisé entre les régions transmembranaire et catalytique. Sur cette base, la structure tridimensionnelle intégrale des AC8 et -3 a été modélisée, révélant que leurs domaines N-terminal et C1b se positionnent de façon similaire à l'AC9** (**Figure R.16**). De façon intéressante, Vercellino et ses collaborateurs, premiers à avoir révélé l'existence de la région hélicoïdale des AC, proposaient que les régulations de leur activité catalytique puissent s'effectuer *via* leurs domaines hélicoïdaux qui modifieraient la conformation du site catalytique (Vercellino *et al.*, 2017). **Le positionnement des domaines N-terminal et C1b[33] supporte cette hypothèse, et laisse supposer que les modifications post-traductionnelles qui y opèrent modifient la conformation du site catalytique en agissant directement sur les domaines hélicoïdaux**.

Le modèle de la structure tridimensionnelle de l'AC8E suppose que l'unique différence structurale entre l'AC8E et l'AC8A repose sur la délétion des TM1-5. Cette délétion conduit le TM6 à ne pas traverser la bicouche lipidique de part en part, mais à faire une boucle au sein de la membrane afin que le domaine N-terminal reste cytosolique (**Figure R.16**). **Ce modèle**

[33] Les domaines N-terminal et C1b sont les régions les moins homologues entre les différentes isoformes d'AC. Elles sont impliquées dans leurs propriétés de régulations uniques

de structure ne permet donc pas d'expliquer l'absence d'activité catalytique de l'AC8E et son effet dominant-négatif.

Cependant, l'approche de modélisation repose sur la proposition d'une architecture protéique en se basant sur l'homologie de séquence peptidique avec des protéines dont la structure tridimensionnelle est élucidée et/ou modélisée (Szilagyi and Zhang, 2014). **Or, la séquence peptidique de l'AC8E est identique à celle de l'AC8A, à l'exception des 5 premiers domaines transmembranaires délétés**. Cette méthodologie de modélisation implique donc de proposer un modèle structural de l'AC8E hautement similaire à celui de l'AC8A. **Dès lors, il apparaît que seule une analyse de dynamique moléculaire de ce modèle permettra de mettre en évidence s'il existe une altération de la stabilité de la structure tridimensionnelle proposée** (Geng *et al.*, 2019).

Le modèle de structure tridimensionnelle de l'AC8E sera utilisé pour modéliser l'interaction de l'AC8E avec l'AC3 par une technique d'amarrage moléculaire. En effet, l'AC8E conserve les mêmes propriétés d'interaction que l'AC8A, et s'hétérodimérise donc par le biais de sa cassette transmembranaire M2 (**Annexe 1**, Gu, Cali and Cooper, 2002), qui doit donc avoir une structure similaire à celle modélisée dans l'AC8A. Ainsi, **des expériences d'amarrage moléculaire vont être réalisées à l'aide du serveur *CLUSPRO*** (Kozakov *et al.*, 2017) **afin de modéliser le complexe AC8E-AC3**.

IV. Les variants d'épissage des AC exerçant un effet dominant-négatif : un nouveau mode de régulation de la voie de signalisation AMPc jusqu'alors inconnu ?

De nombreux mutants et variants d'épissage des différentes isoformes d'AC ont été identifiés, dont certains sont inactifs. On citera :

- Le variant d'épissage de l'AC4 identifié dans le myomètre du rat qui présente une insertion de 8aa à la fin de la région C2a de l'enzyme. Malheureusement, les auteurs n'ont pas analysé l'impact fonctionnel de cette insertion sur la signalisation AMPc (Emala *et al.*, 1998).
- Ceux de l'AC5, identifiés chez le rat, le chien et le lapin dont la longueur du domaine N-terminal serait différente de celle de l'AC5 sauvage. Cette différence ne modifie pas les propriétés biochimiques de cette AC qui reste capable de synthétiser de l'AMPc (Iwami, Akanuma, *et al.*, 1995 ; Wallach *et al.*, 1994). Katsushika et ses collaborateurs ont également identifié un variant d'épissage de l'AC5 dans le cœur de chien. Celui-ci est caractérisé par un raccourcissement du messager avec introduction d'un codon stop en phase dans la CDS, qui encode une protéine de 596aa correspondant à la première moitié de l'AC5 (Nt-M1-C1). Ce variant est catalytiquement inactif, cependant aucune inhibition de production d'AMPc par rapport aux cellules contrôle n'a été observée. Les auteurs n'ayant pas analysé l'effet de ce variant sur l'activité de l'AC5 pleine-taille, il est impossible de statuer sur un potentiel effet inhibiteur sur cette isoforme (Katsushika *et al.*, 1993).

- Un mutant de l'AC6 identifié chez l'homme qui se caractérise par une mutation A674S localisée dans le TM7 de l'enzyme et responsable d'une diminution de l'activité catalytique de l'enzyme (Gros *et al.*, 2005).
- Un variant de l'AC9 présentant une délétion dans le domaine C2b qui a été identifié dans le cœur de la souris et de l'Homme. La délétion de l'extrémité C2b supprime un mécanisme d'auto-inhibition, résultant en une augmentation de la production d'AMPc en réponse à l'activation d'un RCPG couplé Gαs (Pálvölgyi *et al.*, 2018).
- Enfin Ludwig et Seuwen rapportent des variants d'épissage de plusieurs isoformes d'AC chez l'Homme par analyse de banque de données génétiques, mais ceux-ci n'ont jamais été caractérisés biochimiquement (Kingdon *et al.*, 2003) :
  - Pour l'AC6, un transcrit codant une AC6 amputée de sa boucle extracellulaire entre les TM9 et 10 a été identifié (GenBank AB007882), une délétion semblable au variant AC8B (Cali, Parekh and Krupinski, 1996).
  - Pour l'AC8, les variants -B, -C et -D n'ont pas été identifiés chez l'homme, mais l'analyse de banque de données révèle des variants qui seraient délétés d'une part importante du domaine C2 (GenBank AA961399 et AW002651).
  - Pour l'AC1, un variant généré par un épissage alternatif entre l'exon 8 et un exon localisé dans l'intron 8 avec induction d'un codon STOP dans le domaine C1, générant une demie AC1 (GenBank AW969619).
  - Pour l'AC9, un variant non épissé après l'exon 2, dont le transcrit s'achève dans l'intron 2 avec induction d'un codon STOP dans le domaine C1, générant une demie AC9 (GenBank AI807304), soit une AC avec une délétion semblable à celle de l'AC1 ci-avant.
  - Pour l'AC5, un variant similaire à la demie-AC5 caractérisée dans le cœur de chien a également été identifié dans une banque de données de gènes humains (GenBank BE466682), un second variant présentant un épissage alternatif générant un codon STOP dans la cassette M2 a également été identifié (GenBank AV723967).

Parmi les variants d'épissage d'AC, les AC8E-H sont les premiers à avoir été caractérisé comme dominant-négatif.

Certains arguments de la littérature, ainsi que des résultats expérimentaux présentés en **Annexe 7**, confortent l'idée que des variants d'épissage d'AC aux effets dominants-négatifs puisse exister sans avoir encore été débusqués :

- Une délétion de quelques acides aminés, quasiment indétectable à l'échelle de ARNm mature de la CDS d'une AC, peut totalement remodeler la dynamique de production d'AMPc au sein d'une cellule. En effet, un mutant de l'AC8 rendu inactif par délétion du domaine C1 (AC8Δ582-594) exerce un effet dominant-négatif sur l'activité des AC8A, AC5 et AC6 ; un mutant catalytiquement inactif de l'AC6 (AC6Δ553-666) exerce un effet similaire sur l'activité de l'AC8A (Gu, Cali and Cooper, 2002).
- L'expression de ces variants pourrait se produire transitoirement, compliquant leur identification. C'est le cas de l'AC8 exprimée uniquement au cours de la formation de l'hyperplasie néo-intimale chez le rat blessé par angioplastie au ballonnet et non lorsque

l'endothélium est reconstitué et que les CMLV ne migrent et ne prolifèrent plus (Gueguen *et al.*, 2010).

- Le clonage de l'AC6 dans les CMLV a permis une découverte surprenante : un variant d'épissage alternatif de l'AC6 présentant une délétion des premières 54pb de l'exon 7, se traduisant à l'échelle protéique par une délétion de 18aa dans le domaine C1a. De façon intéressante, la surexpression de ce variant de l'AC6 dans des cellules HEK induit une diminution significative de l'accumulation d'AMPc par rapport aux cellules contrôles (**Annexe 7**). De façon curieuse, ce variant se révèle être indétectable par rapport à l'AC6 pleine-taille dans les analyses de transcrits issus de CMLV.

Comme décrit en introduction (**voir *introduction – Partie 1.II.D.1. Régulation de l'activité cyclase***), la voie de signalisation AMPc présente de nombreux modes de régulation, pouvant notamment être spécifiques d'isoformes d'AC et du type cellulaire où prend place le signal AMPc. Ces régulations y sont effectuées de manière opportune, au gré des besoins cellulaire, et en fonction de l'environnement direct dans lequel opèrent les acteurs de la voie AMPc. **Aussi, un mécanisme de régulation « par le bas », impliquant l'expression de variants d'épissage alternatif aux effets dominants négatifs, se voudrait probablement plus durable. En effet, un tel mode de régulation impacterait la composition des signalosomes sur une échelle de temps bien plus importante que les modifications post-traductionnelles réversibles. La durée d'inhibition dépendrait notamment de la stabilité/demi-vie du variant d'épissage exprimé, et du maintien, ou non, des mécanismes impliqués dans la synthèse et l'épissage alternatif des transcrits codant ces variants aux effets dominant-négatifs**.

REFERENCES

Abdel-Majid, R. M. *et al.* (1998) 'Loss of adenylyl cyclase I activity disrupts patterning of mouse somatosensory cortex', *Nature Genetics*, 19(3), pp. 289–291. doi: 10.1038/980.

Adams, H. P. *et al.* (2007) 'Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists', *Circulation*, 115(20), pp. e478-534. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.181486.

Adams, S. R. *et al.* (1991) 'Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells', *Nature*, 349(6311), pp. 694–697. doi: 10.1038/349694a0.

Alousi, A. A. *et al.* (1991) 'Stoichiometry of receptor-Gs-adenylate cyclase interactions', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(9), pp. 2300–2303. doi: 10.1096/fasebj.5.9.1650314.

Antoni, F. A. *et al.* (1995) 'Calcineurin feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(47), pp. 28055–28061. doi: 10.1074/jbc.270.47.28055.

Antoni, F. A. *et al.* (1998) 'Ca2+/calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), pp. 9650–9661.

Antonio, V. *et al.* (2002) 'Transcriptional regulation of the rat type IIA phospholipase A2 gene by cAMP and interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells: interplay of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors', *The Biochemical Journal*, 368(Pt 2), pp. 415–424. doi: 10.1042/BJ20020658.

Arkin, M. R. and Wells, J. A. (2004) 'Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(4), pp. 301–317. doi: 10.1038/nrd1343.

Arrouss, I. *et al.* (2013) 'Specific targeting of caspase-9/PP2A interaction as potential new anti-cancer therapy', *PloS One*, 8(4), p. e60816. doi: 10.1371/journal.pone.0060816.

Ayling, L. J. *et al.* (2012) 'Adenylyl cyclase AC8 directly controls its micro-environment by recruiting the actin cytoskeleton in a cholesterol-rich milieu', *Journal of Cell Science*, 125(Pt 4), pp. 869–886. doi: 10.1242/jcs.091090.

Bakalyar, H. A. and Reed, R. R. (1990) 'Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection', *Science (New York, N.Y.)*, 250(4986), pp. 1403–1406. doi: 10.1126/science.2255909.

Banerjee, U. and Cheng, X. (2015) 'Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics', *Gene*, 570(2), pp. 157–167. doi: 10.1016/j.gene.2015.06.063.

Baragli, A. *et al.* (2008) 'Heterodimers of adenylyl cyclases 2 and 5 show enhanced functional responses in the presence of Galpha s', *Cellular Signalling*, 20(3), pp. 480–492. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.10.033.

Barker, A. *et al.* (2011) 'Association of genetic Loci with glucose levels in childhood and adolescence: a meta-analysis of over 6,000 children', *Diabetes*, 60(6), pp. 1805–1812. doi: 10.2337/db10-1575.

Baro Graf, C. *et al.* (2020) 'Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, p. 110992. doi: 10.1016/j.mce.2020.110992.

Basatemur, G. L. *et al.* (2019) 'Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis', *Nature Reviews. Cardiology*, 16(12), pp. 727–744. doi: 10.1038/s41569-019-0227-9.

Bauman, A. L. *et al.* (2006) 'Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes', *Molecular Cell*, 23(6), pp. 925–931. doi: 10.1016/j.molcel.2006.07.025.

Baumgarten, T. *et al.* (2017) 'Isolation and characterization of the E. coli membrane protein production strain Mutant56(DE3)', *Scientific Reports*, 7, p. 45089. doi: 10.1038/srep45089.

Bayewitch, M. L. *et al.* (1998a) 'Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G beta subunits', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(4), pp. 2273–2276. doi: 10.1074/jbc.273.4.2273.

Bayewitch, M. L. *et al.* (1998b) 'Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(11), pp. 1019–1025. doi: 10.1096/fasebj.12.11.1019.

Beazely, M. A. and Watts, V. J. (2006) 'Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report', *European Journal of Pharmacology*, 535(1–3), pp. 1–12. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.01.054.

Beers, M. F. *et al.* (2013) 'Disruption of N-linked glycosylation promotes proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCA3', *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(12), pp. L970-980. doi: 10.1152/ajplung.00184.2013.

Begum, N., Hockman, S. and Manganiello, V. C. (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', *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), pp. 26238–26249. doi: 10.1074/jbc.M110.214155.

Begum, N., Shen, W. and Manganiello, V. (2011) 'Role of PDE3A in regulation of cell cycle progression in mouse vascular smooth muscle cells and oocytes: implications in cardiovascular diseases and infertility', *Current Opinion in Pharmacology*, 11(6), pp. 725–729. doi: 10.1016/j.coph.2011.10.006.

Benkirane, M. *et al.* (1997) 'Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(49), pp. 30603–30606. doi: 10.1074/jbc.272.49.30603.

Bennett, M. R., Sinha, S. and Owens, G. K. (2016) 'Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis', *Circulation Research*, 118(4), pp. 692–702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.

Bentzon, J. F. *et al.* (2014) 'Mechanisms of plaque formation and rupture', *Circulation Research*, 114(12), pp. 1852–1866. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.

Berthet, J., Rall, T. W. and Sutherland, E. W. (1957) 'The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates', *The Journal of Biological Chemistry*, 224(1), pp. 463–475.

Betolngar, D. B. *et al.* (2019) 'Phosphodiesterase 1 Bridges Glutamate Inputs with NO- and Dopamine-Induced Cyclic Nucleotide Signals in the Striatum', *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 29(12), pp. 5022–5036. doi: 10.1093/cercor/bhz041.

Biel, M. and Michalakis, S. (2009) 'Cyclic nucleotide-gated channels', *Handbook of Experimental Pharmacology*, (191), pp. 111–136. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_7.

Bjelakovic, G., Nikolova, D. and Gluud, C. (2013a) 'Antioxidant supplements to prevent mortality', *JAMA*, 310(11), pp. 1178–1179. doi: 10.1001/jama.2013.277028.

Bjelakovic, G., Nikolova, D. and Gluud, C. (2013b) 'Meta-regression analyses, meta-analyses, and trial sequential analyses of the effects of supplementation with beta-carotene, vitamin A, and vitamin E singly or in different combinations on all-cause mortality: do we have evidence for lack of harm?', *PloS One*, 8(9), p. e74558. doi: 10.1371/journal.pone.0074558.

Blirando, K. *et al.* (2015) 'The stellate vascular smooth muscle cell phenotype is induced by IL-1β via the secretion of PGE2 and subsequent cAMP-dependent protein kinase A activation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(12), pp. 3235–3247. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.019.

Bogard, A. S., Adris, P. and Ostrom, R. S. (2012) 'Adenylyl cyclase 2 selectively couples to E prostanoid type 2 receptors, whereas adenylyl cyclase 3 is not receptor-regulated in airway smooth muscle', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(2), pp. 586–595. doi: 10.1124/jpet.112.193425.

Bogard, A. S., Birg, A. V. and Ostrom, R. S. (2014) 'Non-raft adenylyl cyclase 2 defines a cAMP signaling compartment that selectively regulates IL-6 expression in airway smooth muscle cells: differential regulation of gene expression by AC isoforms', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(4), pp. 329–339. doi: 10.1007/s00210-013-0950-4.

Bogdanov, M., Dowhan, W. and Vitrac, H. (2014) 'Lipids and topological rules governing membrane protein assembly', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(8), pp. 1475–1488. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.007.

Bos, J. L. (2006) 'Epac proteins: multi-purpose cAMP targets', *Trends in Biochemical Sciences*, 31(12), pp. 680–686. doi: 10.1016/j.tibs.2006.10.002.

Bouchi, Y. H. and Gogas, B. D. (2015) 'Biocorrodible metals for coronary revascularization: Lessons from PROGRESS-AMS, BIOSOLVE-I, and BIOSOLVE-II', *Global Cardiology Science & Practice*, 2015(5), p. 63. doi: 10.5339/gcsp.2015.63.

Bouvet, M., Blondeau, J.-P. and Lezoualc'h, F. (2019) 'The Epac1 Protein: Pharmacological Modulators, Cardiac Signalosome and Pathophysiology', *Cells*, 8(12). doi: 10.3390/cells8121543.

Bradley, C. K. *et al.* (2019) 'Patient-Reported Reasons for Declining or Discontinuing Statin Therapy: Insights From the PALM Registry', *Journal of the American Heart Association*, 8(7), p. e011765. doi: 10.1161/JAHA.118.011765.

Breckler, M. *et al.* (2011) 'Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications', *Cellular Signalling*, 23(8), pp. 1257–1266. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.03.007.

Brunton, L. L., Hayes, J. S. and Mayer, S. E. (1979) 'Hormonally specific phosphorylation of cardiac troponin I and activation of glycogen phosphorylase', *Nature*, 280(5717), pp. 78–80. doi: 10.1038/280078a0.

Bruzzoni-Giovanelli, H. *et al.* (2018) 'Interfering peptides targeting protein-protein interactions: the next generation of drugs?', *Drug Discovery Today*, 23(2), pp. 272–285. doi: 10.1016/j.drudis.2017.10.016.

Buck, J. *et al.* (1999) 'Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), pp. 79–84. doi: 10.1073/pnas.96.1.79.

Bullock, B. N., Jochim, A. L. and Arora, P. S. (2011) 'Assessing helical protein interfaces for inhibitor design', *Journal of the American Chemical Society*, 133(36), pp. 14220–14223. doi: 10.1021/ja206074j.

Burke, A. P. *et al.* (1997) 'Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly', *The New England Journal of Medicine*, 336(18), pp. 1276–1282. doi: 10.1056/NEJM199705013361802.

Bussolino, F. *et al.* (1990) 'Selected cytokines promote the synthesis of platelet-activating factor in vascular endothelial cells: comparison between tumor necrosis factor alpha and beta and interleukin-1', *Journal of Lipid Mediators*, 2 Suppl, pp. S15-22.

Cai, Y. *et al.* (2015) 'Role of cAMP-phosphodiesterase 1C signaling in regulating growth factor receptor stability, vascular smooth muscle cell growth, migration, and neointimal hyperplasia', *Circulation Research*, 116(7), pp. 1120–1132. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304408.

Cali, J. J. *et al.* (1994) 'Type VIII adenylyl cyclase. A Ca2+/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(16), pp. 12190–12195.

Cali, J. J., Parekh, R. S. and Krupinski, J. (1996) 'Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca2+/calmodulin', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(2), pp. 1089–1095.

Camenzind, E. (2006) 'Treatment of in-stent restenosis--back to the future?', *The New England Journal of Medicine*, 355(20), pp. 2149–2151. doi: 10.1056/NEJMe068215.

Campos, C. M. *et al.* (2013) 'Bioresorbable drug-eluting magnesium-alloy scaffold for treatment of coronary artery disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), pp. 24492–24500. doi: 10.3390/ijms141224492.

Cerrato, C. P., Künnapuu, K. and Langel, Ü. (2017) 'Cell-penetrating peptides with intracellular organelle targeting', *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(2), pp. 245–255. doi: 10.1080/17425247.2016.1213237.

Chappell, J. *et al.* (2016) 'Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models', *Circulation Research*, 119(12), pp. 1313–1323. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309799.

Chatterjee, A. *et al.* (2014) 'The Pro-Resolving Lipid Mediator Maresin 1 (MaR1) Attenuates Inflammatory Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells', *PLoS ONE*. Edited by A. P. Sampson, 9(11), p. e113480. doi: 10.1371/journal.pone.0113480.

Chen, Y. *et al.* (1997) 'Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), pp. 14100–14104. doi: 10.1073/pnas.94.25.14100.

Chen, Y.-Z. *et al.* (2012) 'Autosomal dominant familial dyskinesia and facial myokymia: single exome sequencing identifies a mutation in adenylyl cyclase 5', *Archives of Neurology*, 69(5), pp. 630–635. doi: 10.1001/archneurol.2012.54.

Chen, Y.-Z. *et al.* (2014) 'Gain-of-function ADCY5 mutations in familial dyskinesia with facial myokymia', *Annals of Neurology*, 75(4), pp. 542–549. doi: 10.1002/ana.24119.

Chen, Z. S., Lee, K. and Kruh, G. D. (2001) 'Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36), pp. 33747–33754. doi: 10.1074/jbc.M104833200.

Cheung, R., Erclik, M. S. and Mitchell, J. (2005) '1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated protein kinase C phosphorylation of type VI adenylyl cyclase inhibits parathyroid hormone signal transduction in rat osteoblastic UMR 106-01 cells', *Journal of Cellular Biochemistry*, 94(5), pp. 1017–1027. doi: 10.1002/jcb.20366.

Chi, H. *et al.* (2004) 'Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications', *Circulation*, 110(12), pp. 1678–1685. doi: 10.1161/01.CIR.0000142085.39015.31.

Choi, E. J., Xia, Z. and Storm, D. R. (1992) 'Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin', *Biochemistry*, 31(28), pp. 6492–6498. doi: 10.1021/bi00143a019.

Cintorino, M. *et al.* (1991) 'Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes', *International Journal of Cancer*, 47(6), pp. 843–846. doi: 10.1002/ijc.2910470609.

Cita, K.-C. *et al.* (2016) 'Association of adenylyl cyclase 6 rs3730070 polymorphism and hemolytic level in patients with sickle cell anemia', *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 58, pp. 21–25. doi: 10.1016/j.bcmd.2016.02.006.

Clarke, M. C. H. *et al.* (2006) 'Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis', *Nature Medicine*, 12(9), pp. 1075–1080. doi: 10.1038/nm1459.

Clément, N. *et al.* (2006) 'PGE2 amplifies the effects of IL-1β 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', *Journal of Cellular Physiology*, 208(3), pp. 495–505. doi: 10.1002/jcp.20673.

Cohen, J. C. *et al.* (2006) 'Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease', *The New England Journal of Medicine*, 354(12), pp. 1264–1272. doi: 10.1056/NEJMoa054013.

Collins, R. G. *et al.* (2000) 'P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (Icam)-1 Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice', *Journal of Experimental Medicine*, 191(1), pp. 189–194. doi: 10.1084/jem.191.1.189.

Conti, A. C. *et al.* (2007) 'Distinct regional and subcellular localization of adenylyl cyclases type 1 and 8 in mouse brain', *Neuroscience*, 146(2), pp. 713–729. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.01.045.

Cooper, D. M. F. (2003) 'Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP', *The Biochemical Journal*, 375(Pt 3), pp. 517–529. doi: 10.1042/BJ20031061.

Cooper, D. M. F. and Crossthwaite, A. J. (2006) 'Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases', *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), pp. 426–431. doi: 10.1016/j.tips.2006.06.002.

Crossthwaite, A. J. *et al.* (2005) 'The cytosolic domains of Ca2+-sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(8), pp. 6380–6391. doi: 10.1074/jbc.M411987200.

Cumbay, M. G. and Watts, V. J. (2004) 'Novel regulatory properties of human type 9 adenylate cyclase', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(1), pp. 108–115. doi: 10.1124/jpet.104.065748.

Cushing, S. D. *et al.* (1990) 'Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13), pp. 5134–5138. doi: 10.1073/pnas.87.13.5134.

Cybulsky, M. I. *et al.* (2001) 'A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis', *The Journal of Clinical Investigation*, 107(10), pp. 1255–1262. doi: 10.1172/JCI11871.

Czermack, J. (1852) 'Description and microscopic findings of two Egyptian mummies.', *Meeting of the Academy of Science*, p. 27.

Darby, I., Skalli, O. and Gabbiani, G. (1990) 'Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 63(1), pp. 21–29.

Davies, M. J. *et al.* (1993) 'Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content', *British Heart Journal*, 69(5), pp. 377–381. doi: 10.1136/hrt.69.5.377.

De Bellis, M. *et al.* (2014) 'A novel human aquaporin-4 splice variant exhibits a dominant-negative activity: a new mechanism to regulate water permeability', *Molecular Biology of the Cell*, 25(4), pp. 470–480. doi: 10.1091/mbc.E13-06-0331.

Defer, N. *et al.* (1994) 'Molecular cloning of the human type VIII adenylyl cyclase', *FEBS letters*, 351(1), pp. 109–113. doi: 10.1016/0014-5793(94)00836-1.

Delmeire, D. *et al.* (2003) 'Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1', *Diabetologia*, 46(10), pp. 1383–1393. doi: 10.1007/s00125-003-1203-8.

Dessauer, C. W. *et al.* (2017) 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CI. Structures and Small Molecule Modulators of Mammalian Adenylyl Cyclases', *Pharmacological Reviews*, 69(2), pp. 93–139. doi: 10.1124/pr.116.013078.

Diel, S. *et al.* (2006) 'Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(1), pp. 288–294. doi: 10.1074/jbc.M511045200.

Ding, Q., Gros, R. and Feldman, R. (2005) 'Isoform-Specific Regulation of Adenylyl Cyclase Function by Disruption of Membrane Trafficking', *Molecular Pharmacology*, 67(2), pp. 564–571. doi: 10.1124/mol.104.006817.

DiPilato, L. M., Cheng, X. and Zhang, J. (2004) 'Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47), pp. 16513–16518. doi: 10.1073/pnas.0405973101.

Dominguez-Berrocal, L. *et al.* (2019) 'New Therapeutic Approach for Targeting Hippo Signalling Pathway', *Scientific Reports*, 9(1), p. 4771. doi: 10.1038/s41598-019-41404-w.

Dong, Z. M. *et al.* (1998) 'The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis', *The Journal of Clinical Investigation*, 102(1), pp. 145–152. doi: 10.1172/JCI3001.

Donkor, E. S. (2018) 'Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life', *Stroke Research and Treatment*, 2018, p. 3238165. doi: 10.1155/2018/3238165.

Douglas, J. S. *et al.* (2005) 'Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol', *Circulation*, 112(18), pp. 2826–2832. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.530097.

Dronadula, N. *et al.* (2006) 'Involvement of cAMP-response element binding protein-1 in arachidonic acid-induced vascular smooth muscle cell motility', *Journal of Lipid Research*, 47(4), pp. 767–777. doi: 10.1194/jlr.M500369-JLR200.

Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) 'Quality control in the endoplasmic reticulum', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(3), pp. 181–191. doi: 10.1038/nrm1052.

Emala, C. W. *et al.* (1998) 'Adenylyl cyclase messenger ribonucleic acid in myometrium: splice variant of type IV', *Biology of Reproduction*, 59(1), pp. 169–175. doi: 10.1095/biolreprod59.1.169.

England, J. and Loughna, S. (2013) 'Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(7), pp. 1221–1239. doi: 10.1007/s00018-012-1131-1.

Eyler, C. E. *et al.* (2008) 'beta(2)-Adrenergic receptor and adenylate cyclase gene polymorphisms affect sickle red cell adhesion', *British Journal of Haematology*, 141(1), pp. 105–108. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07008.x.

Fagan, K. A., Mahey, R. and Cooper, D. M. (1996) 'Functional co-localization of transfected Ca(2+)-stimulable adenylyl cyclases with capacitative Ca2+ entry sites', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(21), pp. 12438–12444. doi: 10.1074/jbc.271.21.12438.

Fager, G. *et al.* (1995) 'Binding of platelet-derived growth factor and low density lipoproteins to glycosaminoglycan species produced by human arterial smooth muscle cells', *Journal of Cellular Physiology*, 163(2), pp. 380–392. doi: 10.1002/jcp.1041630218.

Fatigati, V. and Murphy, R. A. (1984) 'Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type', *The Journal of Biological Chemistry*, 259(23), pp. 14383–14388.

Feil, S. *et al.* (2014) 'Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis', *Circulation Research*, 115(7), pp. 662–667. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304634.

Feinstein, P. G. *et al.* (1991) 'Molecular cloning and characterization of a Ca2+/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), pp. 10173–10177. doi: 10.1073/pnas.88.22.10173.

Feldman, L. (2005) 'Prise en charge de l'atherosclerose : traitement ou prevention', *Journal de Radiologie*, 86(10), pp. 1414–1415. doi: 10.1016/S0221-0363(05)75736-X.

Ferns, G. A. and Avades, T. Y. (2000) 'The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models', *International Journal of Experimental Pathology*, 81(2), pp. 63–88. doi: 10.1046/j.1365-2613.2000.00143.x.

Fetalvero, K. M. *et al.* (2006) 'The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(4), pp. H1337-1346. doi: 10.1152/ajpheart.00936.2005.

Finn, A. V. *et al.* (2007) 'Vascular Responses to Drug Eluting Stents: Importance of Delayed Healing', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(7), pp. 1500–1510. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.144220.

Fischman, D. L. *et al.* (1994) 'A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators', *The New England Journal of Medicine*, 331(8), pp. 496–501. doi: 10.1056/NEJM199408253310802.

Fominaya, J. *et al.* (2015) 'Enhanced serum proteolysis resistance of cell-penetrating peptides', *Therapeutic Delivery*, 6(2), pp. 139–147. doi: 10.4155/tde.14.100.

Fosgerau, K. and Hoffmann, T. (2015) 'Peptide therapeutics: current status and future directions', *Drug Discovery Today*, 20(1), pp. 122–128. doi: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.

Francis, S. H., Blount, M. A. and Corbin, J. D. (2011) 'Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions', *Physiological Reviews*, 91(2), pp. 651–690. doi: 10.1152/physrev.00030.2010.

Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988) 'Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus', *Cell*, 55(6), pp. 1189–1193. doi: 10.1016/0092-8674(88)90263-2.

Funakoshi, Y. *et al.* (2002) 'Critical role of cAMP-response element-binding protein for angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), pp. 18710–18717. doi: 10.1074/jbc.M110430200.

Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980) 'The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine', *Nature*, 288(5789), pp. 373–376. doi: 10.1038/288373a0.

Gabet, A. *et al.* (2017) 'Acute coronary syndrome in women: rising hospitalizations in middle-aged French women, 2004-14', *European Heart Journal*, 38(14), pp. 1060–1065. doi: 10.1093/eurheartj/ehx097.

Gao, B. N. and Gilman, A. G. (1991) 'Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), pp. 10178–10182. doi: 10.1073/pnas.88.22.10178.

Garritsen, A. *et al.* (1992) 'Inhibition of cyclic AMP accumulation in intact NCB-20 cells as a direct result of elevation of cytosolic Ca2+', *Journal of Neurochemistry*, 59(5), pp. 1630–1639. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10992.x.

Gautier, E. L. *et al.* (2009) 'Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage', *Circulation*, 119(13), pp. 1795–1804. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.806158.

Gavenonis, J. *et al.* (2014) 'Comprehensive analysis of loops at protein-protein interfaces for macrocycle design', *Nature Chemical Biology*, 10(9), pp. 716–722. doi: 10.1038/nchembio.1580.

Gebuhrer, V. *et al.* (1995) 'Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells', *The Biochemical Journal*, 306 (Pt 1), pp. 293–298. doi: 10.1042/bj3060293.

Geng, H. *et al.* (2019) 'Applications of Molecular Dynamics Simulation in Structure Prediction of Peptides and Proteins', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, pp. 1162–1170. doi: 10.1016/j.csbj.2019.07.010.

Gesquière, L., Loreau, N. and Blache, D. (2000) 'Role of the cyclic AMP-dependent pathway in free radical-induced cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells', *Free Radical Biology & Medicine*, 29(2), pp. 181–190. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00337-3.

Ghosh, D. *et al.* (2017) 'Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle', in *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp. 49–87. doi: 10.1016/bs.apha.2016.08.002.

Gilbert, M. M. *et al.* (2005) 'A novel functional activator of the Drosophila JAK/STAT pathway, unpaired2, is revealed by an in vivo reporter of pathway activation', *Mechanisms of Development*, 122(7–8), pp. 939–948. doi: 10.1016/j.mod.2005.03.004.

Glozman, R. *et al.* (2009) 'N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic', *The Journal of Cell Biology*, 184(6), pp. 847–862. doi: 10.1083/jcb.200808124.

Glukhova, M. A., Frid, M. G. and Koteliansky, V. E. (1990) 'Developmental changes in expression of contractile and cytoskeletal proteins in human aortic smooth muscle', *The Journal of Biological Chemistry*, 265(22), pp. 13042–13046.

Goldstein, J. L. *et al.* (1979) 'Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), pp. 333–337. doi: 10.1073/pnas.76.1.333.

Green, M. and Loewenstein, P. M. (1988) 'Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein', *Cell*, 55(6), pp. 1179–1188. doi: 10.1016/0092-8674(88)90262-0.

Gros, R. *et al.* (2005) 'Identification of a dysfunctional missense single nucleotide variant of human adenylyl cyclase VI', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 77(4), pp. 271–278. doi: 10.1016/j.clpt.2004.11.005.

Gros, R. *et al.* (2006) 'Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization', *Circulation Research*, 99(8), pp. 845–852. doi: 10.1161/01.RES.0000245189.21703.c0.

Gros, R. *et al.* (2007) 'Increased enzyme activity and beta-adrenergic mediated vasodilation in subjects expressing a single-nucleotide variant of human adenylyl cyclase 6', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(12), pp. 2657–2663. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.145557.

Grosse, R. *et al.* (1997) 'Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(9), pp. 1305–1318. doi: 10.1210/mend.11.9.9966.

Grube, E. *et al.* (2003) 'TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions', *Circulation*, 107(1), pp. 38–42. doi: 10.1161/01.cir.0000047700.58683.a1.

Grünberger, C. *et al.* (2006) 'The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6', *Circulation Research*, 99(11), pp. 1197–1206. doi: 10.1161/01.RES.0000251057.35537.d3.

Gu, C., Cali, J. J. and Cooper, D. M. F. (2002) 'Dimerization of mammalian adenylate cyclases', *European Journal of Biochemistry*, 269(2), pp. 413–421.

Gu, C. and Cooper, D. M. (1999) 'Calmodulin-binding sites on adenylyl cyclase type VIII', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12), pp. 8012–8021. doi: 10.1074/jbc.274.12.8012.

Gu, C., Sorkin, A. and Cooper, D. M. F. (2001) 'Persistent interactions between the two transmembrane clusters dictate the targeting and functional assembly of adenylyl cyclase', *Current Biology*, 11(3), pp. 185–190. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00044-6.

Gu, L. *et al.* (1998) 'Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice', *Molecular Cell*, 2(2), pp. 275–281. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80139-2.

Gueguen, M. *et al.* (2010) 'Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling', *The Journal of Pathology*, 221(3), pp. 331–342. doi: 10.1002/path.2716.

Gueguen, M. *et al.* (2016) 'Adénylyl cyclases et transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires : rôle dans le remodelage vasculaire pathologique', *Biologie Aujourd'hui*, 210(3), pp. 153–166. doi: 10.1051/jbio/2016020.

Guillou, J. L., Nakata, H. and Cooper, D. M. (1999) 'Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(50), pp. 35539–35545. doi: 10.1074/jbc.274.50.35539.

Guo, Y. *et al.* (2003) 'MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), pp. 29509–29514. doi: 10.1074/jbc.M304059200.

Halls, M. L. and Cooper, D. M. F. (2011) 'Regulation by Ca2+-signaling pathways of adenylyl cyclases', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), p. a004143. doi: 10.1101/cshperspect.a004143.

Hansson, G. K. and Jonasson, L. (2009) 'The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(11), pp. 1714–1717. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179713.

Hanyu, M. *et al.* (2001) 'VCAM-1 expression precedes macrophage infiltration into subendothelium of vein grafts interposed into carotid arteries in hypercholesterolemic rabbits--a potential role in vein graft atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 158(2), pp. 313–319. doi: 10.1016/s0021-9150(01)00446-4.

Hardin, M. *et al.* (2012) 'CHRNA3/5, IREB2, and ADCY2 are associated with severe chronic obstructive pulmonary disease in Poland', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(2), pp. 203–208. doi: 10.1165/rcmb.2012-0011OC.

Hartmann, E., Rapoport, T. A. and Lodish, H. F. (1989) 'Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), pp. 5786–5790. doi: 10.1073/pnas.86.15.5786.

Hasbi, A. *et al.* (2014) 'A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D1-D2 receptor heteromer to block signaling and function in vitro and in vivo: effective selective antagonism', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(11), pp. 4806–4820. doi: 10.1096/fj.14-254037.

Haude, M. *et al.* (2016) 'Sustained safety and performance of the second-generation drug-eluting absorbable metal scaffold in patients with de novo coronary lesions: 12-month clinical results and angiographic findings of the BIOSOLVE-II first-in-man trial', *European Heart Journal*, 37(35), pp. 2701–2709. doi: 10.1093/eurheartj/ehw196.

Hayashi, S. *et al.* (2000) 'Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21', *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 35(1 Pt 2), pp. 237–243. doi: 10.1161/01.hyp.35.1.237.

Hayes, J. S. *et al.* (1979) 'Hormonally specific expression of cardiac protein kinase activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), pp. 1570–1574. doi: 10.1073/pnas.76.4.1570.

Hebert, T. E. *et al.* (1996) 'A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(27), pp. 16384–16392. doi: 10.1074/jbc.271.27.16384.

Hellevuo, K. *et al.* (1997) 'Human adenylyl cyclase type 7 contains polymorphic repeats in the 3' untranslated region: investigations of association with alcoholism', *American Journal of Medical Genetics*, 74(1), pp. 95–98. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19970221)74:1<95::aid-ajmg19>3.0.co;2-m.

Hempel, C. M. *et al.* (1996) 'Spatio-temporal dynamics of cyclic AMP signals in an intact neural circuitm', *Nature*, 384(6605), pp. 166–169. doi: 10.1038/384166a0.

Hewer, R. C. *et al.* (2011) 'PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(1), pp. 87–98. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.10.010.

Hoffert, J. D. *et al.* (2005) 'Calmodulin is required for vasopressin-stimulated increase in cyclic AMP production in inner medullary collecting duct', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp. 13624–13630. doi: 10.1074/jbc.M500040200.

Holstein, J. D. *et al.* (2013) 'Genetic variants in GCKR, GIPR, ADCY5 and VPS13C and the risk of severe sulfonylurea-induced hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 121(1), pp. 54–57. doi: 10.1055/s-0032-1321834.

Hong, M.-K. *et al.* (2003) 'Paclitaxel coating reduces in-stent intimal hyperplasia in human coronary arteries: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the Asian Paclitaxel-Eluting Stent Clinical Trial (ASPECT)', *Circulation*, 107(4), pp. 517–520. doi: 10.1161/01.cir.0000054163.42072.d4.

Hoshi, N. *et al.* (2010) 'Interaction with AKAP79 modifies the cellular pharmacology of PKC', *Molecular Cell*, 37(4), pp. 541–550. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.014.

Hu, B. *et al.* (2002) 'A critical interplay between Ca2+ inhibition and activation by Mg2+ of AC5 revealed by mutants and chimeric constructs', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp. 33139–33147. doi: 10.1074/jbc.M112373200.

Hulur, I. *et al.* (2015) 'Enrichment of inflammatory bowel disease and colorectal cancer risk variants in colon expression quantitative trait loci', *BMC genomics*, 16, p. 138. doi: 10.1186/s12864-015-1292-z.

Iida, O. *et al.* (2013) 'Cilostazol reduces angiographic restenosis after endovascular therapy for femoropopliteal lesions in the Sufficient Treatment of Peripheral Intervention by Cilostazol study', *Circulation*, 127(23), pp. 2307–2315. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000711.

Indolfi, C. *et al.* (1997) 'Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury', *Nature Medicine*, 3(7), pp. 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', *Journal of the American College of Cardiology*, 36(1), pp. 288–293.

Inoue, Y. *et al.* (2000) 'Suppression of arterial intimal hyperplasia by cilostamide, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 inhibitor, in a rat balloon double-injury model', *British Journal of Pharmacology*, 130(2), pp. 231–241. doi: 10.1038/sj.bjp.0703287.

Ishibashi, S. *et al.* (1994) 'Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 93(5), pp. 1885–1893. doi: 10.1172/JCI117179.

Ishikawa, Y. *et al.* (1992) 'Isolation and characterization of a novel cardiac adenylylcyclase cDNA', *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19), pp. 13553–13557.

Ivanov, A. *et al.* (2006) 'Adenylate cyclase 5 and KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle', *The Journal of Physiology*, 570(Pt 1), pp. 73–84. doi: 10.1113/jphysiol.2005.100883.

Iversen, L. L. (1977) 'Catecholamine-sensitive adenylate cyclases in nervous tissues', *Journal of Neurochemistry*, 29(1), pp. 5–12. doi: 10.1111/j.1471-4159.1977.tb03918.x.

Iwami, G., Akanuma, M., *et al.* (1995) 'Multiplicity in type V adenylylcyclase: type V-a and type V-b', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 110(1–2), pp. 43–47. doi: 10.1016/0303-7207(95)03514-8.

Iwami, G., Kawabe, J., *et al.* (1995) 'Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(21), pp. 12481–12484. doi: 10.1074/jbc.270.21.12481.

Jedlitschky, G., Burchell, B. and Keppler, D. (2000) 'The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(39), pp. 30069–30074. doi: 10.1074/jbc.M005463200.

Jiang, L. I. *et al.* (2007) 'Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(14), pp. 10576–10584. doi: 10.1074/jbc.M609695200.

Joeyen-Waldorf, J. *et al.* (2012) 'Adenylate cyclase 7 is implicated in the biology of depression and modulation of affective neural circuitry', *Biological Psychiatry*, 71(7), pp. 627–632. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.11.029.

Johnson, R. *et al.* (2006) 'Regulation of human vascular smooth muscle cell migration by beta-adrenergic receptors', *The American Surgeon*, 72(1), pp. 51–54.

Johnson, R. C. *et al.* (1997) 'Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 99(5), pp. 1037–1043. doi: 10.1172/JCI119231.

Jourdan, K. B. *et al.* (2001) 'Characterization of adenylyl cyclase isoforms in rat peripheral pulmonary arteries', *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(6), pp. L1359-1369. doi: 10.1152/ajplung.2001.280.6.L1359.

Kaiser, C. *et al.* (2015) 'Long-term efficacy and safety of biodegradable-polymer biolimus-eluting stents: main results of the Basel Stent Kosten-Effektivitäts Trial-PROspective Validation Examination II (BASKET-PROVE II), a randomized, controlled noninferiority 2-year outcome trial', *Circulation*, 131(1), pp. 74–81. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013520.

Kalra, A. *et al.* (2017) 'New-Generation Coronary Stents: Current Data and Future Directions', *Current Atherosclerosis Reports*, 19(3), p. 14. doi: 10.1007/s11883-017-0654-1.

Kamiya, K. *et al.* (2007) 'Phosphorylation of the cyclic AMP response element binding protein mediates transforming growth factor beta-induced downregulation of cyclin A in vascular smooth muscle cells', *Molecular and Cellular Biology*, 27(9), pp. 3489–3498. doi: 10.1128/MCB.00665-06.

Kanonenberg, K. *et al.* (2019) 'Shaping the lipid composition of bacterial membranes for membrane protein production', *Microbial Cell Factories*, 18(1), p. 131. doi: 10.1186/s12934-019-1182-1.

Karpa, K. D. *et al.* (2000) 'The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors', *Molecular Pharmacology*, 58(4), pp. 677–683. doi: 10.1124/mol.58.4.677.

Katakami, N. *et al.* (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(23), pp. 2584–2591. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.892414.

Katsushika, S. *et al.* (1993) 'In vivo generation of an adenylylcyclase isoform with a half-molecule motif', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(4), pp. 2273–2276.

Kaupp, U. B. and Seifert, R. (2002) 'Cyclic nucleotide-gated ion channels', *Physiological Reviews*, 82(3), pp. 769–824. doi: 10.1152/physrev.00008.2002.

Kawabe, J. *et al.* (1994) 'Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(24), pp. 16554–16558.

Kawabe, J. i *et al.* (1996) 'Regulation of type V adenylyl cyclase by PMA-sensitive and -insensitive protein kinase C isoenzymes in intact cells', *FEBS letters*, 384(3), pp. 273–276. doi: 10.1016/0014-5793(96)00331-6.

Kawasaki, H. *et al.* (1998) 'A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1', *Science (New York, N.Y.)*, 282(5397), pp. 2275–2279. doi: 10.1126/science.282.5397.2275.

Keely, S. L. (1977) 'Activation of cAMP-dependent protein kinase without a corresponding increase in phosphorylase activity', *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 18(2), pp. 283–290.

Keuylian, Z. *et al.* (2012) 'The Notch Pathway Attenuates Interleukin 1 (IL1)-mediated Induction of Adenylyl Cyclase 8 (AC8) Expression during Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC) Trans-differentiation', *Journal of Biological Chemistry*, 287(30), pp. 24978–24989. doi: 10.1074/jbc.M111.292516.

Khan, S. M. *et al.* (2013) 'The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action', *Pharmacological Reviews*, 65(2), pp. 545–577. doi: 10.1124/pr.111.005603.

Kim, S. H. *et al.* (2011) 'Combined pharmacogenetic effect of ADCY9 and ADRB2 gene polymorphisms on the bronchodilator response to inhaled combination therapy', *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 36(3), pp. 399–405. doi: 10.1111/j.1365-2710.2010.01196.x.

Kingdon, E. J. *et al.* (2003) 'Calculated glomerular filtration rate is a useful screening tool to identify scleroderma patients with renal impairment', *Rheumatology (Oxford, England)*, 42(1), pp. 26–33. doi: 10.1093/rheumatology/keg023.

Kirii, H. *et al.* (2003) 'Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), pp. 656–660. doi: 10.1161/01.ATV.0000064374.15232.C3.

Klarenbeek, J. and Jalink, K. (2014) 'Detecting cAMP with an EPAC-based FRET sensor in single living cells', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1071, pp. 49–58. doi: 10.1007/978-1-62703-622-1_4.

Klemm, D. J. *et al.* (2001) 'cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49), pp. 46132–46141. doi: 10.1074/jbc.M104769200.

Knigge, A. *et al.* (2015) 'ADCY5 gene expression in adipose tissue is related to obesity in men and mice', *PloS One*, 10(3), p. e0120742. doi: 10.1371/journal.pone.0120742.

Knox, J. B. *et al.* (1997) 'Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases', *Circulation*, 95(1), pp. 205–212. doi: 10.1161/01.cir.95.1.205.

Kocher, O. *et al.* (1991) 'Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. Biochemical and morphologic studies', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 65(4), pp. 459–470.

Kolodgie, F. D. *et al.* (2001) 'The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes', *Current Opinion in Cardiology*, 16(5), pp. 285–292. doi: 10.1097/00001573-200109000-00006.

Kozakov, D. *et al.* (2017) 'The ClusPro web server for protein-protein docking', *Nature Protocols*, 12(2), pp. 255–278. doi: 10.1038/nprot.2016.169.

Lai, H. L. *et al.* (1997) 'Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cAMP response', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(8), pp. 4970–4977. doi: 10.1074/jbc.272.8.4970.

Lai, H. L. *et al.* (1999) 'The N terminus domain of type VI adenylyl cyclase mediates its inhibition by protein kinase C', *Molecular Pharmacology*, 56(3), pp. 644–650. doi: 10.1124/mol.56.3.644.

Lee, A. C.-L. *et al.* (2019) 'A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). doi: 10.3390/ijms20102383.

Lee, Y. H. and Gyu Song, G. (2015) 'Genome-wide pathway analysis in pancreatic cancer', *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 20(6), pp. 1565–1575.

Levin, L. R. and Reed, R. R. (1995) 'Identification of functional domains of adenylyl cyclase using in vivo chimeras', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(13), pp. 7573–7579. doi: 10.1074/jbc.270.13.7573.

Levy, D. (2012) 'Combating the epidemic of heart disease', *JAMA*, 308(24), pp. 2624–2625. doi: 10.1001/jama.2012.164971.

Li, C. *et al.* (2007) 'Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia', *Cell*, 131(5), pp. 940–951. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.037.

Li, R. *et al.* (2004) 'Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor', *Circulation Research*, 94(6), pp. 759–767. doi: 10.1161/01.RES.0000121568.40692.97.

Li, S. *et al.* (2006) 'Calmodulin-stimulated adenylyl cyclase gene deletion affects morphine responses', *Molecular Pharmacology*, 70(5), pp. 1742–1749. doi: 10.1124/mol.106.025783.

Li, Y. R. *et al.* (2015) 'Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases', *Nature Medicine*, 21(9), pp. 1018–1027. doi: 10.1038/nm.3933.

Liao, J. K. and Laufs, U. (2005) 'Pleiotropic effects of statins', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, pp. 89–118. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748.

Libby, P. *et al.* (2019) 'Atherosclerosis', *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), p. 56. doi: 26892967.

Libby, P. and Everett, B. M. (2019) 'Novel Antiatherosclerotic Therapies', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(4), pp. 538–545. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310958.

Lin, T.-H. *et al.* (2002) 'Protein kinase C inhibits type VI adenylyl cyclase by phosphorylating the regulatory N domain and two catalytic C1 and C2 domains', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18), pp. 15721–15728. doi: 10.1074/jbc.M111537200.

Lipskaia, L. *et al.* (2000) 'Enhanced cardiac function in transgenic mice expressing a Ca(2+)-stimulated adenylyl cyclase', *Circulation Research*, 86(7), pp. 795–801. doi: 10.1161/01.res.86.7.795.

Lo Conte, L., Chothia, C. and Janin, J. (1999) 'The atomic structure of protein-protein recognition sites', *Journal of Molecular Biology*, 285(5), pp. 2177–2198. doi: 10.1006/jmbi.1998.2439.

Lohmann, S. M. *et al.* (1984) 'High-affinity binding of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase to microtubule-associated and other cellular proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), pp. 6723–6727. doi: 10.1073/pnas.81.21.6723.

Ludwig, M.-G. and Seuwen, K. (2002) 'Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms', *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 22(1–4), pp. 79–110. doi: 10.1081/rrs-120014589.

Lüscher, T. F. *et al.* (2007) 'Drug-Eluting Stent and Coronary Thrombosis: Biological Mechanisms and Clinical Implications', *Circulation*, 115(8), pp. 1051–1058. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675934.

Maas, J. W. *et al.* (2005) 'Calcium-stimulated adenylyl cyclases are critical modulators of neuronal ethanol sensitivity', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(16), pp. 4118–4126. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4273-04.2005.

Macdougall, D. A. *et al.* (2009) 'Separate elements within a single IQ-like motif in adenylyl cyclase type 8 impart ca2+/calmodulin binding and autoinhibition', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(23), pp. 15573–15588. doi: 10.1074/jbc.M809585200.

Mahmood, S. S. *et al.* (2014) 'The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective', *Lancet (London, England)*, 383(9921), pp. 999–1008. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61752-3.

Maiga, B. *et al.* (2013) 'Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali', *PloS One*, 8(10), p. e75675. doi: 10.1371/journal.pone.0075675.

Mamluk, R. *et al.* (1999) 'Molecular identification of adenylyl cyclase 3 in bovine corpus luteum and its regulation by prostaglandin F2alpha-induced signaling pathways', *Endocrinology*, 140(10), pp. 4601–4608. doi: 10.1210/endo.140.10.7099.

Manjurano, A. *et al.* (2012) 'Candidate human genetic polymorphisms and severe malaria in a Tanzanian population', *PloS One*, 7(10), p. e47463. doi: 10.1371/journal.pone.0047463.

Manson, J. E. *et al.* (2019) 'Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease', *The New England Journal of Medicine*, 380(1), pp. 33–44. doi: 10.1056/NEJMoa1809944.

Marjamaki, A. *et al.* (1997) 'Factors determining the specificity of signal transduction by guanine nucleotide-binding protein-coupled receptors. Integration of stimulatory and inhibitory input to the effector adenylyl cyclase', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26), pp. 16466–16473. doi: 10.1074/jbc.272.26.16466.

Martin, A. C. L. *et al.* (2009) 'Capacitative Ca2+ entry via Orai1 and stromal interacting molecule 1 (STIM1) regulates adenylyl cyclase type 8', *Molecular Pharmacology*, 75(4), pp. 830–842. doi: 10.1124/mol.108.051748.

Martin, A. C. L. and Cooper, D. M. F. (2006) 'Capacitative and 1-oleyl-2-acetyl-sn-glycerol-activated Ca(2+) entry distinguished using adenylyl cyclase type 8', *Molecular Pharmacology*, 70(2), pp. 769–777. doi: 10.1124/mol.106.025213.

Marx, S. O., Totary-Jain, H. and Marks, A. R. (2011) 'Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis', *Circulation. Cardiovascular Interventions*, 4(1), pp. 104–111. doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.110.957332.

Mathiesen, J. M., Vedel, L. and Bräuner-Osborne, H. (2013) 'cAMP biosensors applied in molecular pharmacological studies of G protein-coupled receptors', *Methods in Enzymology*, 522, pp. 191–207. doi: 10.1016/B978-0-12-407865-9.00011-X.

Mattick, P. *et al.* (2007) 'Ca2+-stimulated adenylyl cyclase isoform AC1 is preferentially expressed in guinea-pig sino-atrial node cells and modulates the I(f) pacemaker current', *The Journal of Physiology*, 582(Pt 3), pp. 1195–1203. doi: 10.1113/jphysiol.2007.133439.

Maurice, D. H. *et al.* (2014) 'Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(4), pp. 290–314. doi: 10.1038/nrd4228.

McKean, J. S. *et al.* (2015) 'The cAMP-producing agonist beraprost inhibits human vascular smooth muscle cell migration via exchange protein directly activated by cAMP', *Cardiovascular Research*, 107(4), pp. 546–555. doi: 10.1093/cvr/cvv176.

Merhi-Soussi, F. *et al.* (2005) 'Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice', *Cardiovascular Research*, 66(3), pp. 583–593. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.01.008.

Miano, J. M. *et al.* (1994) 'Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis', *Circulation Research*, 75(5), pp. 803–812. doi: 10.1161/01.res.75.5.803.

Michiels, C. (2003) 'Endothelial cell functions', *Journal of Cellular Physiology*, 196(3), pp. 430–443. doi: 10.1002/jcp.10333.

Miller, Y. I. *et al.* (2011) 'Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity', *Circulation Research*, 108(2), pp. 235–248. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223875.

de Mooij-van Malsen, A. J. G. *et al.* (2009) 'Interspecies trait genetics reveals association of Adcy8 with mouse avoidance behavior and a human mood disorder', *Biological Psychiatry*, 66(12), pp. 1123–1130. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.06.016.

Morgado, M. *et al.* (2012) 'Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(2), pp. 247–266. doi: 10.1007/s00018-011-0815-2.

Morice, M.-C. *et al.* (2002) 'A Randomized Comparison of a Sirolimus-Eluting Stent with a Standard Stent for Coronary Revascularization', *New England Journal of Medicine*, 346(23), pp. 1773–1780. doi: 10.1056/NEJMoa012843.

Mou, T.-C. *et al.* (2009) 'Structural basis for inhibition of mammalian adenylyl cyclase by calcium', *Biochemistry*, 48(15), pp. 3387–3397. doi: 10.1021/bi802122k.

Muglia, L. M. *et al.* (1999) 'The 5'-flanking region of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene imparts tissue-specific expression in transgenic mice', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(6), pp. 2051–2058.

Mühleisen, T. W. *et al.* (2014) 'Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder', *Nature Communications*, 5, p. 3339. doi: 10.1038/ncomms4339.

Murphy, W. A. *et al.* (2003) 'The iceman: discovery and imaging', *Radiology*, 226(3), pp. 614–629. doi: 10.1148/radiol.2263020338.

Myhill, N. *et al.* (2008) 'The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2', *Molecular Biology of the Cell*, 19(7), pp. 2777–2788. doi: 10.1091/mbc.e07-10-0995.

Myoishi, M. *et al.* (2007) 'Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome', *Circulation*, 116(11), pp. 1226–1233. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.682054.

Nakagawa, H. *et al.* (2009) 'Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2', *The FEBS journal*, 276(24), pp. 7237–7252. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07423.x.

Nakahashi, Y. *et al.* (1997) 'Construction of a full-length Ca2+-sensitive adenylyl cyclase/aequorin chimera', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(29), pp. 18093–18097. doi: 10.1074/jbc.272.29.18093.

Nakashima, Y. *et al.* (1994) 'ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree', *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 14(1), pp. 133–140. doi: 10.1161/01.atv.14.1.133.

Napoli, C. *et al.* (1997) 'Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions', *The Journal of Clinical Investigation*, 100(11), pp. 2680–2690. doi: 10.1172/JCI119813.

Nasu, H. *et al.* (2015) 'Two cases of diabetic mastopathy: MR imaging and pathological correlation', *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, 22(5), pp. 552–556. doi: 10.1007/s12282-012-0407-5.

Navab, M. *et al.* (2004) 'The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL', *Journal of Lipid Research*, 45(6), pp. 993–1007. doi: 10.1194/jlr.R400001-JLR200.

Neer, E. J., Echeverria, D. and Knox, S. (1980) 'Increase in the size of soluble brain adenylate cyclase with activation by guanosine 5'-(beta, gamma-imino)triphosphate', *The Journal of Biological Chemistry*, 255(20), pp. 9782–9789.

Nelson, A. J., Puri, R. and Nissen, S. E. (2020) 'Statins in a Distorted Mirror of Media', *Current Atherosclerosis Reports*, 22(8), p. 37. doi: 10.1007/s11883-020-00853-9.

Nelson, C. P. *et al.* (2011) 'Principal role of adenylyl cyclase 6 in K+ channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells', *Cardiovascular Research*, 91(4), pp. 694–702. doi: 10.1093/cvr/cvr137.

Nelson, E. J. *et al.* (2003) 'Ethanol-induced phosphorylation and potentiation of the activity of type 7 adenylyl cyclase. Involvement of protein kinase C delta', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(7), pp. 4552–4560. doi: 10.1074/jbc.M210386200.

Nevo, I. *et al.* (1998) 'Regulation of adenylyl cyclase isozymes on acute and chronic activation of inhibitory receptors', *Molecular Pharmacology*, 54(2), pp. 419–426. doi: 10.1124/mol.54.2.419.

Newby, A. C. (2005) 'Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture', *Physiological Reviews*, 85(1), pp. 1–31. doi: 10.1152/physrev.00048.2003.

Newby, L. K. *et al.* (2014) 'Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: a randomised phase 2 trial', *Lancet (London, England)*, 384(9949), pp. 1187–1195. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60417-7.

Newman, W. H. *et al.* (1998) 'Release of tumor necrosis factor-alpha from coronary smooth muscle: activation of NF-kappaB and inhibition by elevated cyclic AMP', *The Journal of Surgical Research*, 80(2), pp. 129–135. doi: 10.1006/jsre.1998.5456.

Newman, W. H. *et al.* (2003) 'Cyclic AMP inhibits production of interleukin-6 and migration in human vascular smooth muscle cells', *The Journal of Surgical Research*, 109(1), pp. 57–61.

Nidorf, S. M. *et al.* (2013) 'Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease', *Journal of the American College of Cardiology*, 61(4), pp. 404–410. doi: 10.1016/j.jacc.2012.10.027.

Nikolaev, V. O. *et al.* (2004) 'Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(36), pp. 37215–37218. doi: 10.1074/jbc.C400302200.

Nordestgaard, B. G. *et al.* (2013) 'Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society', *European Heart Journal*, 34(45), pp. 3478–3490a. doi: 10.1093/eurheartj/eht273.

Nordman, S. *et al.* (2008) 'Genetic variation of the adenylyl cyclase 3 (AC3) locus and its influence on type 2 diabetes and obesity susceptibility in Swedish men', *International Journal of Obesity (2005)*, 32(3), pp. 407–412. doi: 10.1038/sj.ijo.0803742.

Nus, M. and Mallat, Z. (2016) 'Immune-mediated mechanisms of atherosclerosis and implications for the clinic', *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(11), pp. 1217–1237. doi: 10.1080/1744666X.2016.1195686.

O' Brien, E. R. *et al.* (2011) 'Pathogenesis of neointima formation following vascular injury', *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, 11(1), pp. 30–39. doi: 10.2174/187152911795945169.

O'Donoghue, M. L. *et al.* (2014) 'Effect of Darapladib on Major Coronary Events After an Acute Coronary Syndrome: The SOLID-TIMI 52 Randomized Clinical Trial', *JAMA*, 312(10), p. 1006. doi: 10.1001/jama.2014.11061.

O'Donoghue, M. L. *et al.* (2016) 'Effect of Losmapimod on Cardiovascular Outcomes in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial', *JAMA*, 315(15), pp. 1591–1599. doi: 10.1001/jama.2016.3609.

Ohara, O. *et al.* (1991) 'cAMP negatively regulates mRNA levels of actin and tropomyosin in rat cultured vascular smooth muscle cells', *Journal of Biochemistry*, 109(6), pp. 834–839. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123467.

Olianas, M. C., Ingianni, A. and Onali, P. (1998) 'Role of G protein betagamma subunits in muscarinic receptor-induced stimulation and inhibition of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb', *Journal of Neurochemistry*, 70(6), pp. 2620–2627. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70062620.x.

Ono, H. *et al.* (2004) 'cAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor-alpha-induced vascular smooth muscle cell migration', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(9), pp. 1634–1639. doi: 10.1161/01.ATV.0000138052.86051.0d.

Orlov, S. N. *et al.* (1999) 'Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3', *Cell Death and Differentiation*, 6(7), pp. 661–672. doi: 10.1038/sj.cdd.4400539.

Ostrom, R. S. *et al.* (2002) 'Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains', *Molecular Pharmacology*, 62(5), pp. 983–992.

Owens, G. K. (1995) 'Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells', *Physiological Reviews*, 75(3), pp. 487–517. doi: 10.1152/physrev.1995.75.3.487.

Owens, G. K., Kumar, M. S. and Wamhoff, B. R. (2004) 'Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease', *Physiological Reviews*, 84(3), pp. 767–801. doi: 10.1152/physrev.00041.2003.

Owens, G. K. and Thompson, M. M. (1986) 'Developmental changes in isoactin expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. Relationship between growth and cytodifferentiation', *The Journal of Biological Chemistry*, 261(28), pp. 13373–13380.

Pagano, M. *et al.* (2009) 'Insights into the residence in lipid rafts of adenylyl cyclase AC8 and its regulation by capacitative calcium entry', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296(3), pp. C607-619. doi: 10.1152/ajpcell.00488.2008.

Palmer, D., Tsoi, K. and Maurice, D. H. (1998) 'Synergistic inhibition of vascular smooth muscle cell migration by phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 inhibitors', *Circulation Research*, 82(8), pp. 852–861.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987) 'Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor', *Nature*, 327(6122), pp. 524–526. doi: 10.1038/327524a0.

Pálvölgyi, A. *et al.* (2018) 'Auto-inhibition of adenylyl cyclase 9 (AC9) by an isoform-specific motif in the carboxyl-terminal region', *Cellular Signalling*, 51, pp. 266–275. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.08.010.

Panasevich, S. *et al.* (2013) 'Investigation of novel genes for lung function in children and their interaction with tobacco smoke exposure: a preliminary report', *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 102(5), pp. 498–503. doi: 10.1111/apa.12204.

Patel, S. G. *et al.* (2019) 'Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green florescent protein in different cell lines', *Scientific Reports*, 9(1), p. 6298. doi: 10.1038/s41598-019-42456-8.

Paterson, J. M. *et al.* (1995) 'Control of a novel adenylyl cyclase by calcineurin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(3), pp. 1000–1008. doi: 10.1006/bbrc.1995.2385.

Paterson, J. M. *et al.* (2000) 'Characterisation of human adenylyl cyclase IX reveals inhibition by Ca(2+)/Calcineurin and differential mRNA plyadenylation', *Journal of Neurochemistry*, 75(4), pp. 1358–1367. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0751358.x.

Pearson, J. D. (1999) 'Endothelial cell function and thrombosis', *Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 12(3), pp. 329–341. doi: 10.1053/beha.1999.0028.

Pelletier, S. *et al.* (2005) 'Cyclic AMP induces morphological changes of vascular smooth muscle cells by inhibiting a Rac-dependent signaling pathway', *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), pp. 412–422. doi: 10.1002/jcp.20308.

Piepoli, M. F. *et al.* (2016) '2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)', *European Heart Journal*, 37(29), pp. 2315–2381. doi: 10.1093/eurheartj/ehw106.

Plüddemann, A., Neyen, C. and Gordon, S. (2007) 'Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands', *Methods (San Diego, Calif.)*, 43(3), pp. 207–217. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.06.004.

Plump, A. S. *et al.* (1992) 'Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells', *Cell*, 71(2), pp. 343–353. doi: 10.1016/0092-8674(92)90362-g.

Podda, M. V. and Grassi, C. (2014) 'New perspectives in cyclic nucleotide-mediated functions in the CNS: the emerging role of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels', *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 466(7), pp. 1241–1257. doi: 10.1007/s00424-013-1373-2.

Ponsioen, B. *et al.* (2004) 'Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator', *EMBO reports*, 5(12), pp. 1176–1180. doi: 10.1038/sj.embor.7400290.

Pratt, S. *et al.* (2005) 'The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites', *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(5), pp. 855–863. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-04-0291.

Premont, R. T. *et al.* (1996) 'Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(23), pp. 13900–13907. doi: 10.1074/jbc.271.23.13900.

Pries, A. R., Secomb, T. W. and Gaehtgens, P. (2000) 'The endothelial surface layer', *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 440(5), pp. 653–666. doi: 10.1007/s004240000307.

Prinz, A. *et al.* (2006) 'Novel, isotype-specific sensors for protein kinase A subunit interaction based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET)', *Cellular Signalling*, 18(10), pp. 1616–1625. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.01.013.

Procopio, D. O. *et al.* (2013) 'Genetic markers of comorbid depression and alcoholism in women', *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 37(6), pp. 896–904. doi: 10.1111/acer.12060.

Qi, C. *et al.* (2019) 'The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein', *Science*, 364(6438), pp. 389–394. doi: 10.1126/science.aav0778.

Qiao, J. H. *et al.* (1997) 'Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice', *The American Journal of Pathology*, 150(5), pp. 1687–1699.

Quignot, C. *et al.* (2018) 'InterEvDock2: an expanded server for protein docking using evolutionary and biological information from homology models and multimeric inputs', *Nucleic Acids Research*, 46(W1), pp. W408–W416. doi: 10.1093/nar/gky377.

Raal, F. J. *et al.* (2020) 'Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia', *The New England Journal of Medicine*, 382(16), pp. 1520–1530. doi: 10.1056/NEJMoa1913805.

Rajavashisth, T. B. *et al.* (1990) 'Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins', *Nature*, 344(6263), pp. 254–257. doi: 10.1038/344254a0.

Rall, T. W., Sutherland, E. W. and Wosilait, W. D. (1956) 'The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts', *The Journal of Biological Chemistry*, 218(1), pp. 483–495.

Ramaker, K. *et al.* (2018) 'Cell penetrating peptides: a comparative transport analysis for 474 sequence motifs', *Drug Delivery*, 25(1), pp. 928–937. doi: 10.1080/10717544.2018.1458921.

Raoux, M. *et al.* (2015) 'Multilevel control of glucose homeostasis by adenylyl cyclase 8', *Diabetologia*, 58(4), pp. 749–757. doi: 10.1007/s00125-014-3445-z.

Ray, K. K. *et al.* (2020) 'Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol', *The New England Journal of Medicine*, 382(16), pp. 1507–1519. doi: 10.1056/NEJMoa1912387.

Rees, S. D. *et al.* (2011) 'Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: ADCY5 and GLIS3 variants may predispose to type 2 diabetes', *PloS One*, 6(9), p. e24710. doi: 10.1371/journal.pone.0024710.

Reid, G. *et al.* (2003) 'Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5', *Molecular Pharmacology*, 63(5), pp. 1094–1103. doi: 10.1124/mol.63.5.1094.

Rhee, M. H. *et al.* (1998) 'Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes', *Journal of Neurochemistry*, 71(4), pp. 1525–1534. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71041525.x.

Rhyne, J. *et al.* (2009) 'Multiple splice defects in ABCA1 cause low HDL-C in a family with hypoalphalipoproteinemia and premature coronary disease', *BMC medical genetics*, 10, p. 1. doi: 10.1186/1471-2350-10-1.

Ridker, P. M. *et al.* (2017) 'Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease', *New England Journal of Medicine*, 377(12), pp. 1119–1131. doi: 10.1056/NEJMoa1707914.

Rodbell, M. (1980) 'The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction', *Nature*, 284(5751), pp. 17–22. doi: 10.1038/284017a0.

Roger, B. *et al.* (2011) 'Adenylyl cyclase 8 is central to glucagon-like peptide 1 signalling and effects of chronically elevated glucose in rat and human pancreatic beta cells', *Diabetologia*, 54(2), pp. 390–402. doi: 10.1007/s00125-010-1955-x.

de Rooij, J. *et al.* (1998) 'Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP', *Nature*, 396(6710), pp. 474–477. doi: 10.1038/24884.

Roy, A. A. *et al.* (2006) 'RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells', *Cellular Signalling*, 18(3), pp. 336–348. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.05.004.

Roy, A. A., Lemberg, K. E. and Chidiac, P. (2003) 'Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions', *Molecular Pharmacology*, 64(3), pp. 587–593. doi: 10.1124/mol.64.3.587.

Rudaz, A., Rima, A. and Humair, J.-P. (2010) '[Cardiovascular risk scores: why, how and when to use them?]', *Revue Medicale Suisse*, 6(264), pp. 1809–1812, 1814–1815.

Ruffer, M. A. (1911) 'On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 BC—525 AD)'.

Ruzicka, D. L. and Schwartz, R. J. (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(6 Pt 2), pp. 2575–2586. doi: 10.1083/jcb.107.6.2575.

Rybalkin, S. D. *et al.* (1997) 'Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype', *The Journal of Clinical Investigation*, 100(10), pp. 2611–2621. doi: 10.1172/JCI119805.

Rybalkin, S. D. *et al.* (2002) 'Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation', *Circulation Research*, 90(2), pp. 151–157.

Sabatine, M. S. *et al.* (2017) 'Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease', *The New England Journal of Medicine*, 376(18), pp. 1713–1722. doi: 10.1056/NEJMoa1615664.

Salim, S. *et al.* (2003) 'Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), pp. 15842–15849. doi: 10.1074/jbc.M210663200.

Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M. (1974) 'A highly sensitive adenylate cyclase assay', *Analytical Biochemistry*, 58(2), pp. 541–548. doi: 10.1016/0003-2697(74)90222-x.

Sanabra, C. and Mengod, G. (2011) 'Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain', *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41(1), pp. 43–54. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.11.001.

Sassi, Y. *et al.* (2008) 'Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation', *Journal of Clinical Investigation*, 118(8), pp. 2747–2757. doi: 10.1172/JCI35067.

Schaefer, M. L. *et al.* (2000) 'Altered stress-induced anxiety in adenylyl cyclase type VIII-deficient mice', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(13), pp. 4809–4820.

Schallmach, E., Steiner, D. and Vogel, Z. (2006) 'Adenylyl cyclase type II activity is regulated by two different mechanisms: implications for acute and chronic opioid exposure', *Neuropharmacology*, 50(8), pp. 998–1005. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.01.004.

Schinkel, A. H. *et al.* (1993) 'N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(10), pp. 7474–7481.

Scholich, K. *et al.* (1997) 'Characterization of soluble forms of nonchimeric type V adenylyl cyclases', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), pp. 2915–2920. doi: 10.1073/pnas.94.7.2915.

Scott, J. D., Dessauer, C. W. and Taskén, K. (2013) 'Creating Order from Chaos: Cellular Regulation by Kinase Anchoring', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), pp. 187–210. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140204.

Sedan, Y. *et al.* (2016) 'Peptiderive server: derive peptide inhibitors from protein-protein interactions', *Nucleic Acids Research*, 44(W1), pp. W536-541. doi: 10.1093/nar/gkw385.

Seebacher, T., Linder, J. U. and Schultz, J. E. (2001) 'An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity', *European Journal of Biochemistry*, 268(1), pp. 105–110. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.01850.x.

Seimon, T. A. *et al.* (2010) 'Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress', *Cell Metabolism*, 12(5), pp. 467–482. doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.010.

Serruys, P. W. *et al.* (1994) 'A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group', *The New England Journal of Medicine*, 331(8), pp. 489–495. doi: 10.1056/NEJM199408253310801.

Shankman, L. S. *et al.* (2015) 'KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis', *Nature Medicine*, 21(6), pp. 628–637. doi: 10.1038/nm.3866.

Shuttleworth, T. J. and Thompson, J. L. (1999) 'Discriminating between capacitative and arachidonate-activated Ca(2+) entry pathways in HEK293 cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(44), pp. 31174–31178. doi: 10.1074/jbc.274.44.31174.

Sigwart, U. *et al.* (1987) 'Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty', *The New England Journal of Medicine*, 316(12), pp. 701–706. doi: 10.1056/NEJM198703193161201.

Simard, T. *et al.* (2014) 'The evolution of coronary stents: a brief review', *The Canadian Journal of Cardiology*, 30(1), pp. 35–45. doi: 10.1016/j.cjca.2013.09.012.

Simpson, R. E., Ciruela, A. and Cooper, D. M. F. (2006) 'The role of calmodulin recruitment in Ca2+ stimulation of adenylyl cyclase type 8', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(25), pp. 17379–17389. doi: 10.1074/jbc.M510992200.

Sinnarajah, S. *et al.* (2001) 'RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III', *Nature*, 409(6823), pp. 1051–1055. doi: 10.1038/35059104.

Skalhegg, B. S. 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, pp. D678-693. doi: 10.2741/skalhegg.

Small, K. M. *et al.* (2003) 'An Ile to Met polymorphism in the catalytic domain of adenylyl cyclase type 9 confers reduced beta2-adrenergic receptor stimulation', *Pharmacogenetics*, 13(9), pp. 535–541. doi: 10.1097/00008571-200309000-00002.

Sodani, K. *et al.* (2012) 'Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance', *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), pp. 58–72. doi: 10.5732/cjc.011.10329.

Sohma, H. *et al.* (1999) 'Quantitative reduction of type I adenylyl cyclase in human alcoholics', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1454(1), pp. 11–18. doi: 10.1016/s0925-4439(99)00018-6.

Somlyo, A. P. (1993) 'Myosin isoforms in smooth muscle: how may they affect function and structure?', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 14(6), pp. 557–563. doi: 10.1007/BF00141552.

Splansky, G. L. *et al.* (2007) 'The Third Generation Cohort of the National Heart, Lung, and Blood Institute's Framingham Heart Study: design, recruitment, and initial examination', *American Journal of Epidemiology*, 165(11), pp. 1328–1335. doi: 10.1093/aje/kwm021.

Srinivasan, S., Bingham, J. L. and Johnson, D. (2009) 'The ABCs of human alternative splicing: a review of ATP-binding cassette transporter splicing', *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 12(1), pp. 149–158.

STABILITY Investigators *et al.* (2014) 'Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease', *The New England Journal of Medicine*, 370(18), pp. 1702–1711. doi: 10.1056/NEJMoa1315878.

Stary, H. C. (1992) 'Composition and classification of human atherosclerotic lesions', *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 421(4), pp. 277–290. doi: 10.1007/BF01660974.

Stary, H. C. *et al.* (1994) 'A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Circulation*, 89(5), pp. 2462–2478. doi: 10.1161/01.cir.89.5.2462.

Stary, H. C. *et al.* (1995) 'A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Circulation*, 92(5), pp. 1355–1374. doi: 10.1161/01.cir.92.5.1355.

Stary, H. C. (2000) 'Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(5 Suppl), pp. 1297S-1306S. doi: 10.1093/ajcn/72.5.1297s.

Steiner, D. *et al.* (2005) 'Regulation of adenylate cyclase type VIII splice variants by acute and chronic Gi/o-coupled receptor activation', *The Biochemical Journal*, 386(Pt 2), pp. 341–348. doi: 10.1042/BJ20041670.

Steiner, D. *et al.* (2006) 'Adenylyl cyclase type-VIII activity is regulated by G(betagamma) subunits', *Cellular Signalling*, 18(1), pp. 62–68. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.03.014.

Stergiakouli, E. *et al.* (2014) 'Genome-wide association study of height-adjusted BMI in childhood identifies functional variant in ADCY3', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(10), pp. 2252–2259. doi: 10.1002/oby.20840.

Storm, D. R. *et al.* (1998) 'Impaired cerebellar long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice', *Neuron*, 20(6), pp. 1199–1210. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80500-0.

Strazzabosco, M. *et al.* (2009) 'Differentially expressed adenylyl cyclase isoforms mediate secretory functions in cholangiocyte subpopulation', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(1), pp. 244–252. doi: 10.1002/hep.22926.

Stumpf, M. P. H. *et al.* (2008) 'Estimating the size of the human interactome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), pp. 6959–6964. doi: 10.1073/pnas.0708078105.

Sugawara, K. *et al.* (2016) 'Structure and functional roles of Epac2 (Rapgef4)', *Gene*, 575(2 Pt 3), pp. 577–583. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.029.

Sukhova, G. K. *et al.* (1999) 'Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques', *Circulation*, 99(19), pp. 2503–2509. doi: 10.1161/01.cir.99.19.2503.

Surdo, N. C. *et al.* (2017) 'FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at β-adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility', *Nature Communications*, 8, p. 15031. doi: 10.1038/ncomms15031.

Sutherland, E. W., Rall, T. W. and Menon, T. (1962) 'Adenyl cylase. I. Distribution, preparation, and properties', *The Journal of Biological Chemistry*, 237, pp. 1220–1227.

Sutherland, E. W. and Wosilait, W. D. (1956) 'The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. I. Liver phosphorylase; preparation and properties', *The Journal of Biological Chemistry*, 218(1), pp. 459–468.

Suzuki, H. *et al.* (1997) 'A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection', *Nature*, 386(6622), pp. 292–296. doi: 10.1038/386292a0.

Szilagyi, A. and Zhang, Y. (2014) 'Template-based structure modeling of protein-protein interactions', *Current Opinion in Structural Biology*, 24, pp. 10–23. doi: 10.1016/j.sbi.2013.11.005.

Tabakoff, B. *et al.* (2001) 'Phosphorylation cascades control the actions of ethanol on cell cAMP signalling', *Journal of Biomedical Science*, 8(1), pp. 44–51. doi: 10.1007/BF02255970.

Takeuchi, K. and Wagner, G. (2006) 'NMR studies of protein interactions', *Current Opinion in Structural Biology*, 16(1), pp. 109–117. doi: 10.1016/j.sbi.2006.01.006.

Takigawa, T. *et al.* (2010) 'Cilostazol reduces restenosis after carotid artery stenting', *Journal of Vascular Surgery*, 51(1), pp. 51–56. doi: 10.1016/j.jvs.2009.08.040.

Tanabe, K. *et al.* (2003) 'TAXUS III Trial: in-stent restenosis treated with stent-based delivery of paclitaxel incorporated in a slow-release polymer formulation', *Circulation*, 107(4), pp. 559–564. doi: 10.1161/01.cir.0000048184.96491.8a.

Tang, T. *et al.* (2008) 'Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling', *Circulation*, 117(1), pp. 61–69. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.730069.

Tang, W. J. and Gilman, A. G. (1991) 'Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits', *Science (New York, N.Y.)*, 254(5037), pp. 1500–1503. doi: 10.1126/science.1962211.

Tang, W. J., Krupinski, J. and Gilman, A. G. (1991) 'Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylylcyclase', *The Journal of Biological Chemistry*, 266(13), pp. 8595–8603.

Tardif, J.-C. *et al.* (2008) 'Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet (London, England)*, 371(9626), pp. 1761–1768. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60763-1.

Tardif, J.-C. *et al.* (2013) 'Effects of the P-selectin antagonist inclacumab on myocardial damage after percutaneous coronary intervention for non-ST-segment elevation myocardial infarction: results of the SELECT-ACS trial', *Journal of the American College of Cardiology*, 61(20), pp. 2048–2055. doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.003.

Tardif, J.-C. *et al.* (2015) 'Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib', *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 8(2), pp. 372–382. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000663.

Taskén, K. and Aandahl, E. M. (2004) 'Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A', *Physiological Reviews*, 84(1), pp. 137–167. doi: 10.1152/physrev.00021.2003.

Taurin, S. *et al.* (2002) 'Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of apoptosis', *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(2), pp. 254–259. doi: 10.1023/a:1014478417580.

Taussig, R. *et al.* (1994) 'Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(8), pp. 6093–6100.

Taussig, R., Iñiguez-Lluhi, J. A. and Gilman, A. G. (1993) 'Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha', *Science (New York, N.Y.)*, 261(5118), pp. 218–221. doi: 10.1126/science.8327893.

Taussig, R., Quarmby, L. M. and Gilman, A. G. (1993) 'Regulation of purified type I and type II adenylylcyclases by G protein beta gamma subunits', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(1), pp. 9–12.

Tesmer, J. J. *et al.* (1997) 'Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS', *Science (New York, N.Y.)*, 278(5345), pp. 1907–1916. doi: 10.1126/science.278.5345.1907.

Theurkauf, W. E. and Vallee, R. B. (1982) 'Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2', *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), pp. 3284–3290.

Thomas, G. S. *et al.* (2014) 'Why did ancient people have atherosclerosis?: from autopsies to computed tomography to potential causes', *Global Heart*, 9(2), pp. 229–237. doi: 10.1016/j.gheart.2014.04.002.

Thompson, R. C. *et al.* (2013) 'Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations', *The Lancet*, 381(9873), pp. 1211–1222. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60598-X.

Tokunou, T. *et al.* (2001) 'cAMP response element-binding protein mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(11), pp. 1764–1769. doi: 10.1161/hq2112.098770.

Torres-Quesada, O., Röck, R. and Stefan, E. (2017) 'Systematic Quantification of GPCR/cAMP-Controlled Protein Kinase A Interactions', *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 49(4), pp. 240–249. doi: 10.1055/s-0042-110791.

Toyota, T. *et al.* (2002) 'Molecular analysis, mutation screening, and association study of adenylate cyclase type 9 gene (ADCY9) in mood disorders', *American Journal of Medical Genetics*, 114(1), pp. 84–92. doi: 10.1002/ajmg.10117.

Trubey, K. R. *et al.* (2006) 'Tastants evoke cAMP signal in taste buds that is independent of calcium signaling', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(2), pp. C237-244. doi: 10.1152/ajpcell.00303.2005.

Tünnemann, G. *et al.* (2008) 'Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines', *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 14(4), pp. 469–476. doi: 10.1002/psc.968.

Ueki, N. *et al.* (1987) 'Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), pp. 9049–9053. doi: 10.1073/pnas.84.24.9049.

Vadakkan, K. I. *et al.* (2006) 'Genetic reduction of chronic muscle pain in mice lacking calcium/calmodulin-stimulated adenylyl cyclases', *Molecular Pain*, 2, p. 7. doi: 10.1186/1744-8069-2-7.

Vadiveloo, P. K. *et al.* (1997) 'G1 phase arrest of human smooth muscle cells by heparin, IL-4 and cAMP is linked to repression of cyclin D1 and cdk2', *Atherosclerosis*, 133(1), pp. 61–69. doi: 10.1016/s0021-9150(97)00116-0.

Vallin, B. *et al.* (2018) 'Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.06.012.

Venkatesan, K. *et al.* (2009) 'An empirical framework for binary interactome mapping', *Nature Methods*, 6(1), pp. 83–90. doi: 10.1038/nmeth.1280.

Vercellino, I. *et al.* (2017) 'Role of the nucleotidyl cyclase helical domain in catalytically active dimer formation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(46), pp. E9821–E9828. doi: 10.1073/pnas.1712621114.

Villacres, E. C. *et al.* (1998) 'Type I adenylyl cyclase mutant mice have impaired mossy fiber long-term potentiation', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), pp. 3186–3194.

Violin, J. D. *et al.* (2008) 'beta2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(5), pp. 2949–2961. doi: 10.1074/jbc.M707009200.

Virani, S. S. *et al.* (2020) 'Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association', *Circulation*, 141(9), pp. e139–e596. doi: 10.1161/CIR.0000000000000757.

Vora, D. K. *et al.* (1997) 'Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression', *Circulation Research*, 80(6), pp. 810–818. doi: 10.1161/01.res.80.6.810.

Vorherr, T. *et al.* (1993) 'The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase', *Biochemistry*, 32(23), pp. 6081–6088. doi: 10.1021/bi00074a020.

Wagner, R. *et al.* (2011) 'Glucose-raising genetic variants in MADD and ADCY5 impair conversion of proinsulin to insulin', *PloS One*, 6(8), p. e23639. doi: 10.1371/journal.pone.0023639.

Wagner, S. *et al.* (2007) 'Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli', *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 6(9), pp. 1527–1550. doi: 10.1074/mcp.M600431-MCP200.

Walker-Gray, R., Stengel, F. and Gold, M. G. (2017) 'Mechanisms for restraining cAMP-dependent protein kinase revealed by subunit quantitation and cross-linking approaches', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(39), pp. 10414–10419. doi: 10.1073/pnas.1701782114.

Wallach, J. *et al.* (1994) 'Molecular cloning and expression of a novel type V adenylyl cyclase from rabbit myocardium', *FEBS letters*, 338(3), pp. 257–263. doi: 10.1016/0014-5793(94)80279-3.

Walsh, D. A., Perkins, J. P. and Krebs, E. G. (1968) 'An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle', *The Journal of Biological Chemistry*, 243(13), pp. 3763–3765.

Wang, A.-B. *et al.* (2007) 'A20 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and migration through blocking PI3k/Akt singling in vitro and in vivo', *Journal of Biomedical Science*, 14(3), pp. 357–371. doi: 10.1007/s11373-007-9150-x.

Wang, H. *et al.* (2003) 'Type 8 adenylyl cyclase is targeted to excitatory synapses and required for mossy fiber long-term potentiation', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(30), pp. 9710–9718.

Wang, H. *et al.* (2010) 'Evaluation of the association between the AC3 genetic polymorphisms and obesity in a Chinese Han population', *PloS One*, 5(11), p. e13851. doi: 10.1371/journal.pone.0013851.

Wang, W.-J. *et al.* (2008) 'Interaction between CD147 and P-glycoprotein and their regulation by ubiquitination in breast cancer cells', *Chemotherapy*, 54(4), pp. 291–301. doi: 10.1159/000151225.

Wang, Y. *et al.* (2019) 'Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in ApoE (Apolipoprotein E)-Deficient Mouse Atherosclerosis', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(5), pp. 876–887. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312434.

Warrington, N. M. *et al.* (2015) 'A genome-wide association study of body mass index across early life and childhood', *International Journal of Epidemiology*, 44(2), pp. 700–712. doi: 10.1093/ije/dyv077.

Watson, E. L. *et al.* (1998) 'Capacitative Ca2+ entry is involved in cAMP synthesis in mouse parotid acini', *The American Journal of Physiology*, 274(3), pp. C557-565. doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.3.C557.

Watson, E. L. *et al.* (2000) 'The type 8 adenylyl cyclase is critical for Ca2+ stimulation of cAMP accumulation in mouse parotid acini', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(19), pp. 14691–14699. doi: 10.1074/jbc.275.19.14691.

Watson, P. A. *et al.* (1994) 'Molecular cloning and characterization of the type VII isoform of mammalian adenylyl cyclase expressed widely in mouse tissues and in S49 mouse lymphoma cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(46), pp. 28893–28898.

Wayman, G. A. *et al.* (1996) 'Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo', *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), pp. 6075–6082. doi: 10.1128/mcb.16.11.6075.

Wayman, G. A., Impey, S. and Storm, D. R. (1995) 'Ca2+ inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(37), pp. 21480–21486. doi: 10.1074/jbc.270.37.21480.

Webb, J. G. *et al.* (2001) 'Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(4), pp. H1545-1552.

Webb, N. R. and Moore, K. J. (2007) 'Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy', *Current Drug Targets*, 8(12), pp. 1249–1263. doi: 10.2174/138945007783220597.

Webb, R. C. (2003) 'Smooth muscle contraction and relaxation', *Advances in Physiology Education*, 27(1–4), pp. 201–206. doi: 10.1152/advan.00025.2003.

Wehbe, N. *et al.* (2020) 'EPAC in Vascular Smooth Muscle Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14). doi: 10.3390/ijms21145160.

Wei, J. *et al.* (1998) 'Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals', *Neuron*, 21(3), pp. 495–504. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80561-9.

Wei, J., Wayman, G. and Storm, D. R. (1996) 'Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(39), pp. 24231–24235. doi: 10.1074/jbc.271.39.24231.

Wellington, C. L. *et al.* (2002) 'Truncation mutations in ABCA1 suppress normal upregulation of full-length ABCA1 by 9-cis-retinoic acid and 22-R-hydroxycholesterol', *Journal of Lipid Research*, 43(11), pp. 1939–1949. doi: 10.1194/jlr.m200277-jlr200.

Wielinga, P. R. *et al.* (2003) 'Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), pp. 17664–17671. doi: 10.1074/jbc.M212723200.

Wilensky, R. L. *et al.* (2008) 'Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development', *Nature Medicine*, 14(10), pp. 1059–1066. doi: 10.1038/nm.1870.

Willoughby, D. *et al.* (2010) 'AKAP79/150 interacts with AC8 and regulates Ca2+-dependent cAMP synthesis in pancreatic and neuronal systems', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(26), pp. 20328–20342. doi: 10.1074/jbc.M110.120725.

Willoughby, D., Halls, M. L., *et al.* (2012) 'A key phosphorylation site in AC8 mediates regulation of Ca(2+)-dependent cAMP dynamics by an AC8-AKAP79-PKA signalling complex', *Journal of Cell Science*, 125(Pt 23), pp. 5850–5859. doi: 10.1242/jcs.111427.

Willoughby, D., Everett, K. L., *et al.* (2012) 'Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca2+ and cAMP signaling', *Science Signaling*, 5(219), p. ra29. doi: 10.1126/scisignal.2002299.

Willoughby, D. *et al.* (2014) 'TRPC1 contributes to the Ca2+-dependent regulation of adenylate cyclases', *The Biochemical Journal*, 464(1), pp. 73–84. doi: 10.1042/BJ20140766.

Willoughby, D. and Cooper, D. M. F. (2007) 'Organization and Ca2+ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains', *Physiological Reviews*, 87(3), pp. 965–1010. doi: 10.1152/physrev.00049.2006.

Winder, S. J., Sutherland, C. and Walsh, M. P. (1991) 'Biochemical and functional characterization of smooth muscle calponin', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 304, pp. 37–51. doi: 10.1007/978-1-4684-6003-2_5.

Windholz, J. *et al.* (2011) 'Effects of genetic variants in ADCY5, GIPR, GCKR and VPS13C on early impairment of glucose and insulin metabolism in children', *PloS One*, 6(7), p. e22101. doi: 10.1371/journal.pone.0022101.

Wissler, R. W. (1967) 'The arterial medial cell, smooth muscle, or multifunctional mesenchyme?', *Circulation*, 36(1), pp. 1–4. doi: 10.1161/01.cir.36.1.1.

Wolf, E. J. *et al.* (2014) 'A genome-wide association study of clinical symptoms of dissociation in a trauma-exposed sample', *Depression and Anxiety*, 31(4), pp. 352–360. doi: 10.1002/da.22260.

Wong, S. T. *et al.* (1999) 'Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP', *Neuron*, 23(4), pp. 787–798. doi: 10.1016/s0896-6273(01)80036-2.

Wong, S. T. *et al.* (2001) 'Adenylyl cyclase 3 mediates prostaglandin E(2)-induced growth inhibition in arterial smooth muscle cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36), pp. 34206–34212. doi: 10.1074/jbc.M103923200.

Wood, F. A. *et al.* (2020) 'N-of-1 Trial of a Statin, Placebo, or No Treatment to Assess Side Effects', *The New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJMc2031173.

Woodcock-Mitchell, J. *et al.* (1988) 'Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles', *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 39(3), pp. 161–166. doi: 10.1111/j.1432-0436.1988.tb00091.x.

Wootten, D. *et al.* (2018) 'Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(10), pp. 638–653. doi: 10.1038/s41580-018-0049-3.

Wosilait, W. D. and Sutherland, E. W. (1956) 'The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. II. Enzymatic inactivation of liver phosphorylase', *The Journal of Biological Chemistry*, 218(1), pp. 469–481.

Wray, N. R. *et al.* (2012) 'Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned', *Molecular Psychiatry*, 17(1), pp. 36–48. doi: 10.1038/mp.2010.109.

Wu, Z. L. *et al.* (1995) 'Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), pp. 220–224. doi: 10.1073/pnas.92.1.220.

Xu, D. *et al.* (2001) 'Human airway smooth muscle expresses 7 isoforms of adenylyl cyclase: a dominant role for isoform V', *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(4), pp. L832-843. doi: 10.1152/ajplung.2001.281.4.L832.

Yamamoto, M. *et al.* (2000) 'Hippocampal level of neural specific adenylyl cyclase type I is decreased in Alzheimer's disease', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1535(1), pp. 60–68. doi: 10.1016/s0925-4439(00)00083-1.

Yokoyama, U. *et al.* (2008) 'Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), pp. 28702–28709. doi: 10.1074/jbc.M804223200.

Yokoyama, U. *et al.* (2010) 'Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus', *Circulation Research*, 106(12), pp. 1882–1892. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214924.

Yoshimura, M. and Cooper, D. M. (1992) 'Cloning and expression of a Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), pp. 6716–6720. doi: 10.1073/pnas.89.15.6716.

Yoshimura, M., Ikeda, H. and Tabakoff, B. (1996) 'mu-Opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase', *Molecular Pharmacology*, 50(1), pp. 43–51.

Younes, A. *et al.* (2008) 'Ca(2+) -stimulated basal adenylyl cyclase activity localization in membrane lipid microdomains of cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(21), pp. 14461–14468. doi: 10.1074/jbc.M707540200.

Yu, H. *et al.* (2018) 'FOXO3a (Forkhead Transcription Factor O Subfamily Member 3a) Links Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis, Matrix Breakdown, Atherosclerosis, and Vascular Remodeling Through a Novel Pathway Involving MMP13 (Matrix Metalloproteinase 13)', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(3), pp. 555–565. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310502.

Yu, H. J., Ma, H. and Green, R. D. (1993) 'Calcium entry via L-type calcium channels acts as a negative regulator of adenylyl cyclase activity and cyclic AMP levels in cardiac myocytes', *Molecular Pharmacology*, 44(4), pp. 689–693.

Yu, J. *et al.* (2016) 'InterEvDock: a docking server to predict the structure of protein-protein interactions using evolutionary information', *Nucleic Acids Research*, 44(W1), pp. W542-549. doi: 10.1093/nar/gkw340.

Zaccolo, M. *et al.* (2000) 'A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells', *Nature Cell Biology*, 2(1), pp. 25–29. doi: 10.1038/71345.

Zaccolo, M. and Pozzan, T. (2002) 'Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes', *Science (New York, N.Y.)*, 295(5560), pp. 1711–1715. doi: 10.1126/science.1069982.

Zhang, G. *et al.* (1997) 'Structure of the adenylyl cyclase catalytic core', *Nature*, 386(6622), pp. 247–253. doi: 10.1038/386247a0.

Zhang, J. *et al.* (1997) 'Adenylyl cyclase isoforms and vasopressin enhancement of agonist-stimulated cAMP in vascular smooth muscle cells', *The American Journal of Physiology*, 273(2 Pt 2), pp. H971-980. doi: 10.1152/ajpheart.1997.273.2.H971.

Zhang, P. *et al.* (2010) 'Family-based association analysis to finemap bipolar linkage peak on chromosome 8q24 using 2,500 genotyped SNPs and 15,000 imputed SNPs', *Bipolar Disorders*, 12(8), pp. 786–792. doi: 10.1111/j.1399-5618.2010.00883.x.

Zhang, S. H. *et al.* (1992) 'Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E', *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), pp. 468–471. doi: 10.1126/science.1411543.

Zhang, Z. *et al.* (2004) 'Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination', *Molecular Pharmacology*, 66(3), pp. 395–403. doi: 10.1124/mol.104.001966.

Zhu, X. and Wess, J. (1998) 'Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function', *Biochemistry*, 37(45), pp. 15773–15784. doi: 10.1021/bi981162z.

ANNEXES

ANNEXE 1 : L'AC8E interagit avec l'AC3 par sa cassette transmembranaire M2.

Dans le but d'étudier le rôle de la cassette transmembranaire M2 dans la capacité de l'AC8E à s'hétérodimériser, nous avons généré une construction de l'AC8E étiquetée VSV-G présentant un codon STOP en position 413, à la jonction C1a-C1b, et avons analysé sa capacité à interagir avec l'AC3 étiquetée HA.

Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E étiquetée VSV-G (AC8E-VSV-G) ou l'AC8Estop413-VSV-G et/ou l'AC3 étiquetée HA (AC3-HA). L'expression des AC étiquetées dans le lysat total des cellules a été confirmée par western-blot (**Figure A.1, panel supérieur**). Après immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps VSV-G, on détecte une bande immunoréactive à l'anticorps anti-HA à une masse moléculaire d'environ 300 kDa dans les cellules HEK293 co-exprimant l'AC8E-VSV-G et l'AC3-HA (**Figure A.1, panel inférieur gauche, pistes 5**). Aucune bande immunoréactive n'est présente dans les immunoprécipitats issus de cellules exprimant l'AC8Estop413-VSV-G et l'AC3-HA, ni dans les cellules exprimant uniquement l'AC3-HA (**Figure A.1, panel inférieur gauche, pistes 4 et 6 *vs* 5**). Ces résultats révèlent que la délétion du segment C1b-M2-C2 de l'AC8E supprime sa capacité à s'hétérodimériser avec l'AC3.

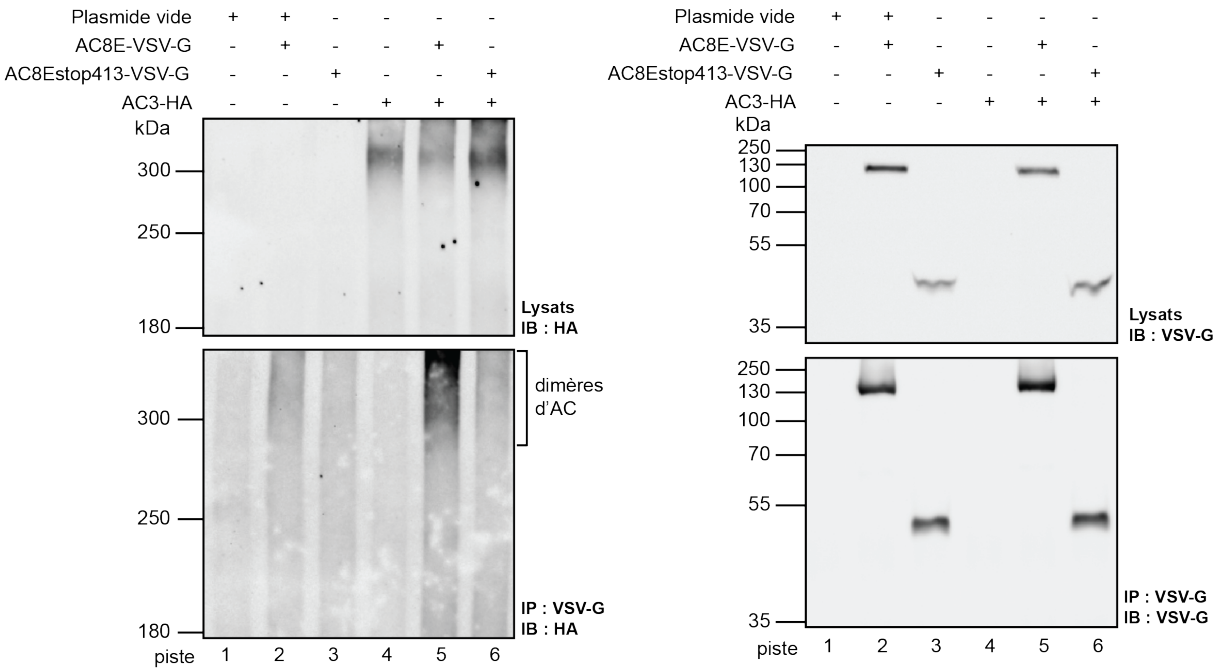


Figure A.1 : La délétion du fragment C1b-M2-C2 supprime la capacité de l'AC8E à s'hétérodimériser avec l'AC3.

Les protéines des lysats et immunoprécipitats (IP) ont été séparées sur SDS-PAGE en condition dénaturante/non-réductrice. Les Western blots montrent l'expression des dimères d'AC dans des cellules HEK293 exprimant transitoirement AC8E-VSV-G ou AC8E et/ou AC3-HA. Les lysats et immunoprécipitats obtenus à l'aide de l'anti-VSV ont été analysés par western blot à l'aide d'anti-HA (panel de gauche) ou d'anti VSV-G (panel de droite). IB : immunoblot.

ANNEXE 2 : Les AC8E-H interagiraient préférentiellement avec l'AC6 dans les CMLV trans-différenciées à l'IL-1β.

Les deux principales isoformes d'AC dans les CMLV de rat sont les AC3 et AC6 (Ostrom *et al.*, 2002). Le traitement à l'IL-1β, qui induit l'expression de l'AC8E dans les CMLV, diminue significativement (de plus de 50%) l'expression de l'AC6 (ici visualisée sous la forme de dimères) par rapport aux CMLV contrôles non traitées (**Figure A.2, piste 3 *vs* 1**) ; en revanche, le niveau d'expression de l'AC3 (objectivé par l'intensité de la bande correspondante au monomère d'AC3) n'est pas altéré (données non présentées). L'extinction de l'expression de l'AC8 dans les CMLV traitées à l'IL-1β, par une stratégie d'interférence à l'ARN, prévient la diminution de l'expression de l'AC6 pour la restaurer à un niveau proche de celui observé dans les CMLV non traitées (**Figure A.2**). La diminution d'expression de l'AC6 dans les CMLV traitées à l'IL-1β résulte donc de l'expression de l'AC8E. Nous suggérons donc que, dans les CMLV trans-différenciées, l'AC8E s'hétérodimérise préférentiellement avec l'AC6, isoforme d'AC la plus exprimée dans les CMLV, la retienne dans le réticulum endoplasmique, puis la dégrade en l'adressant au protéasome ou lysosomes.

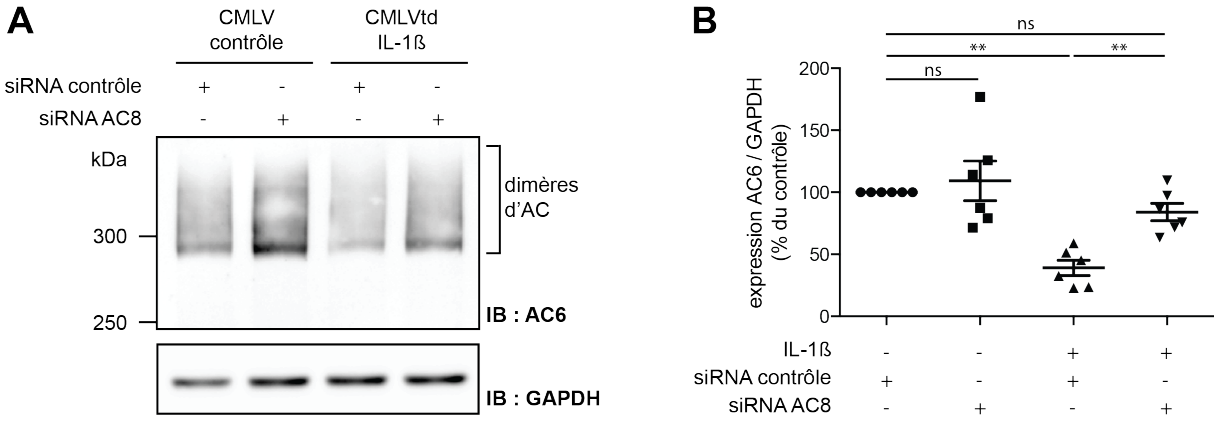


Figure A.2 : L'expression de l'AC6 dans les CMLV traitées à l'IL1ß est dépendante de l'AC8.
Les CMLV ont été transfectées avec un pool d'ARN interférents contrôles ou ciblant l'AC8. Vingt-quatre heures après, les cellules ont été traitées (ou non) pendant 48h à l'IL-1ß puis lysées et l'expression de l'AC6, normalisée à la GAPDH, a été analysée par (**A**) western-blot à l'aide d'un anticorps anti-AC5/6. Les résultats de densité optique, quantifiée par image J (**B**), sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles et sont représentés en moyennes ± SEM de 6 expériences indépendantes. Les valeurs sont les suivantes : CMLV contrôles + siRNA contrôle : 100.0 ± 0.00 % ; CMLV contrôles + siRNA AC8 : 109.2 ± 16.01 % ; CMLV transdifférenciées (td) IL-1ß + siRNA contrôle : 39.12 ± 6.138 % ; CMLVtd IL-1ß + siRNA AC8 : 84.10 ± 7.008 %. L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Mann-Whitney. ** $P < 0.01$, ns : non significatif. **IB** : immunoblot.

ANNEXE 3 : Orientation des AC8A et AC8E-H dans la membrane plasmique.

La loi de la balance des charges formulée par Hartmann et ses collaborateurs stipule que la différence de charge entre les 15aa entourant une région transmembranaire détermine l'orientation du domaine transmembranaire dans la bicouche lipidique. Ainsi, la région présentant la charge la plus élevée sera préférentiellement orientée vers le compartiment cytoplasmique (Hartmann, Rapoport and Lodish, 1989). **L'analyse des charges portées par les domaines N-terminal, C1 et C2 (aux abords des domaines transmembranaires) de l'AC8A révèle que l'ancrage de cette AC dans la bicouche lipidique respecte rigoureusement la loi de la balance des charges** (**Figure A.3**).

A

TM1 Δ_{C-N} = -4 (<0) → N_{Cyto}- C_{Ext}

TM2 Δ_{C-N} = +2 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM3 Δ_{C-N} = -2,5 (<0) → N_{Cyto}- C_{Ext}

TM4 Δ_{C-N} = +1 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM5 Δ_{C-N} = 0 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM6 Δ_{C-N} = +1 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM7 Δ_{C-N} = +0,5 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM8 Δ_{C-N} = 0 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM9 Δ_{C-N} = -2 (<0) → N_{Cyto}- C_{Ext}

TM10 Δ_{C-N} = +2 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM11 Δ_{C-N} = -4,5 (<0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

TM12 Δ_{C-N} = +2 (≥0) → N_{Ext}- C_{Cyto}

B

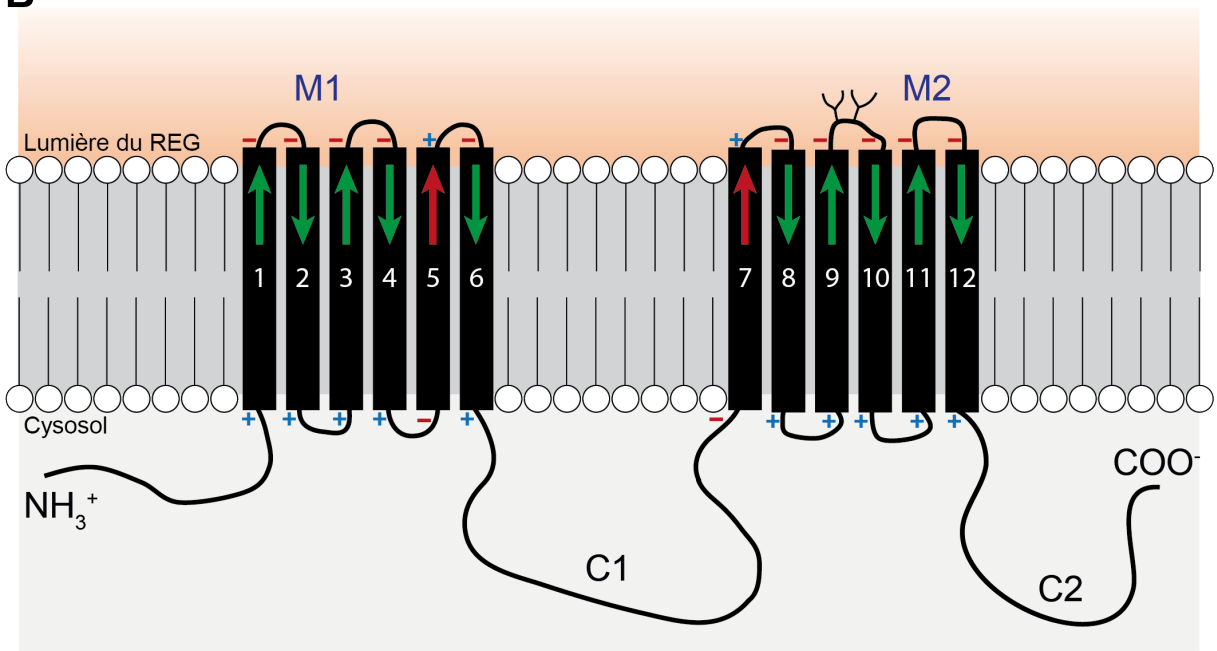


Figure A.3 : L'orientation membranaire de l'AC8A respecte la loi de la balance des charges.

A. Différence de charge (C-N) entre les 15 acides aminés flanquant domaine transmembranaire aux extrémités N et C du domaine. **B.** Représentation schématique de l'orientation membranaire de l'AC8A. Les charges de chaque portion de 15aa flanquant les domaines transmembranaires sont indiquées par un + ($\Delta_{C-N}\geq 0$) ou un – ($\Delta_{C-N}<0$).

La délétion des 5 premiers domaines transmembranaires de l'enzyme soulève la question de l'orientation des AC8E-H dans la bicouche lipidique. Différents résultats permettent d'élucider l'orientation des AC8E-H dans la bicouche lipidique. La boucle reliant les domaines TM9 et -10 de l'AC8E est localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique puisque les résidus N814 et N818 sont N-glycosylés (Pagano *et al.*, 2009). Le domaine N-terminal de l'AC8 est localisé dans le cytosol puisque l'AC8E est capable de co-immunoprécipiter avec l'AKAP79 (***Article*** Vallin *et al.*, 2018, ***Fig.S9***).

Afin que le TM6 traverse la bicouche lipidique en respectant la localisation cytosolique du domaine N-terminal et l'orientation de la cassette transmembranaire M2, il serait nécessaire que la région C1 de l'AC8E traverse également la bicouche lipidique. Cependant, cette localisation s'opposerait à la loi de la balance des charges, car les 15 premiers acides aminés du domaine C1 ont une charge globale positive impliquant une localisation préférentiellement cytosolique. Il est tout de même possible de résoudre ce paradoxe d'orientation membranaire en analysant l'hydrophobicité relative des domaines transmembranaires. En effet, il a été montré *i)* qu'un domaine prédit comme étant transmembranaire, mais présentant une faible hydrophobicité, peut devenir extramembranaire ; et *ii)* qu'un domaine transmembranaire de forte hydrophobicité stabilise les domaines transmembranaires voisins présentant une faible hydrophobicité relative (Bogdanov, Dowhan and Vitrac, 2014). Ainsi, sur la base de la loi de la balance des charges, et en prenant compte le profil d'hydrophobicité relative des 7 domaines transmembranaires de l'AC8E et en accord avec les résultats expérimentaux obtenus, le domaine N-terminal resterait cytosolique avec un TM6 relocalisé dans le cytosol ; les autres domaines auraient la même orientation que dans l'AC8A (**Figure A.4**).

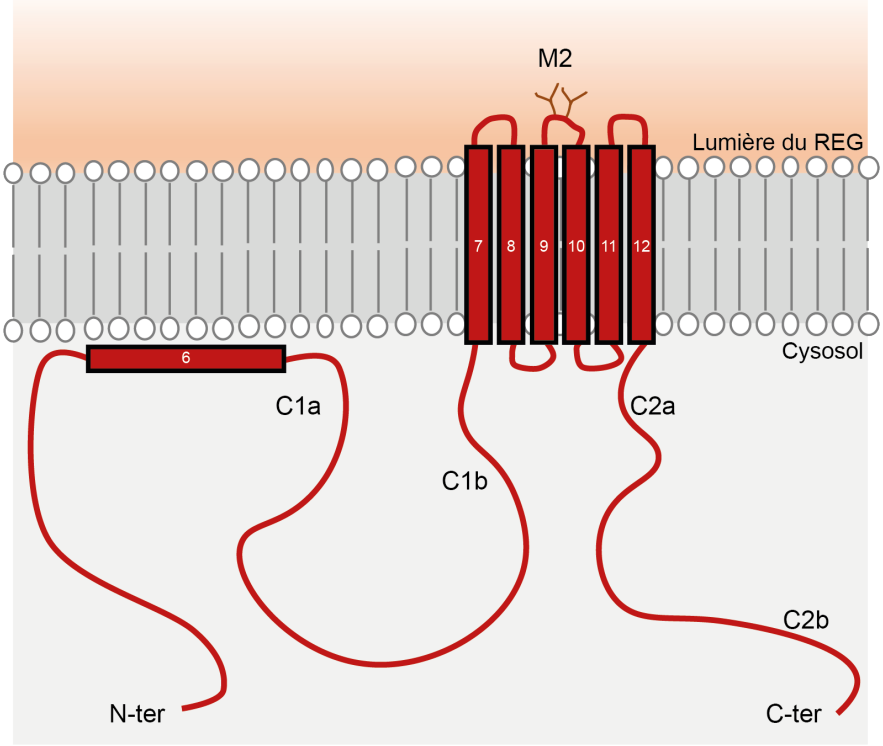


Figure A.4 : Orientation membranaire de l'AC8E.

ANNEXE 4 : Aucune des délétions effectuées dans le domaine N-terminal empêche l'effet dominant-négatif de l'AC8E

Les différentes constructions qui ont été analysées pour leur capacité à inhiber la production d'AMPc des cellules HEK sont schématisées dans la **Figure A.5**.

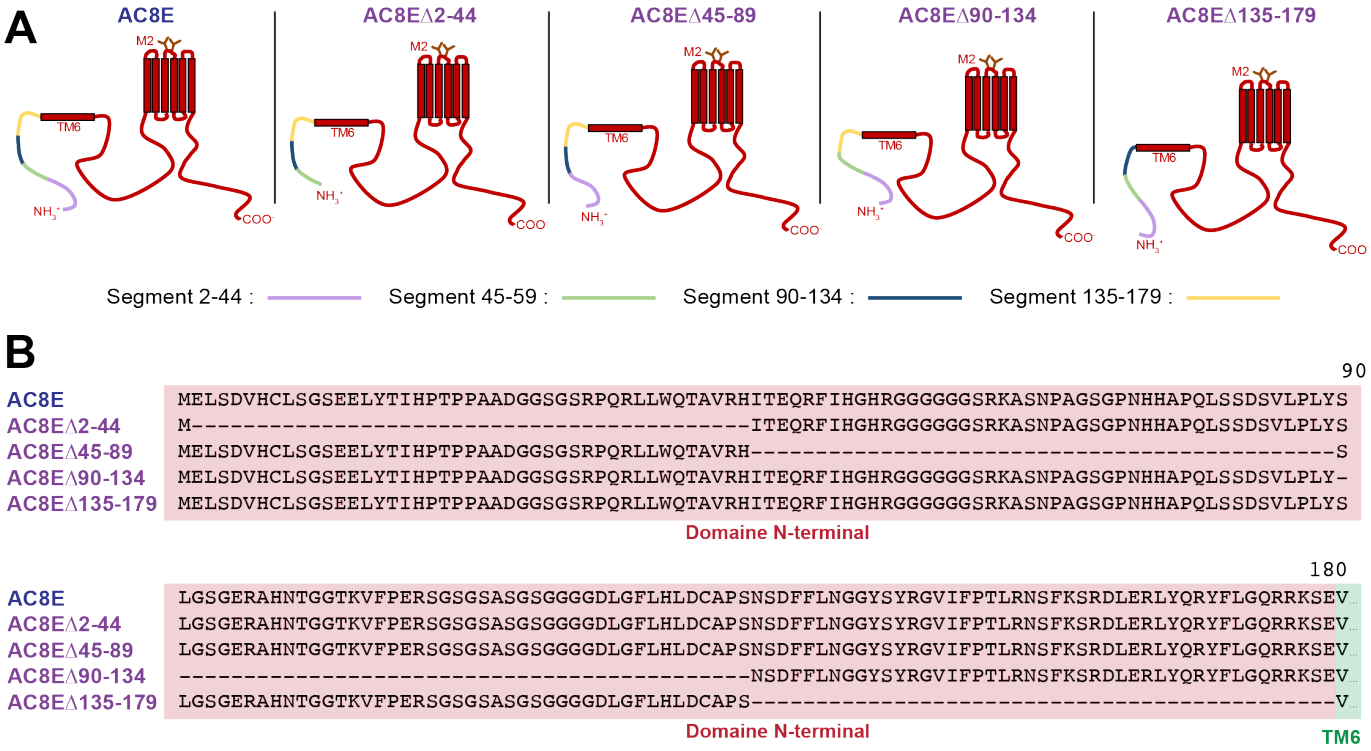


Figure A.5 : Mutants de l'AC8E présentant une délétion partielle du domaine N-terminal.

A. Représentation schématique AC8E et mutants AC8EΔ2-44, AC8EΔ45-89, AC8EΔ90-134, AC8EΔ135-179. **B.** Alignement des séquences peptidiques du domaine N-terminal des AC8E et mutants AC8EΔ2-44, AC8EΔ45-89, AC8EΔ90-134, AC8EΔ135-179.

La mesure d'accumulation d'AMPc dans des cellules HEK exprimant transitoirement les mutants de délétion AC8EΔ2-44, AC8EΔ45-89, AC8EΔ90-134 ou AC8EΔ135-179, indique qu'aucune de ces délétions partielles du domaine N-terminal de l'AC8E n'empêche l'effet dominant négatif de l'AC8E (**Figure A.6**).

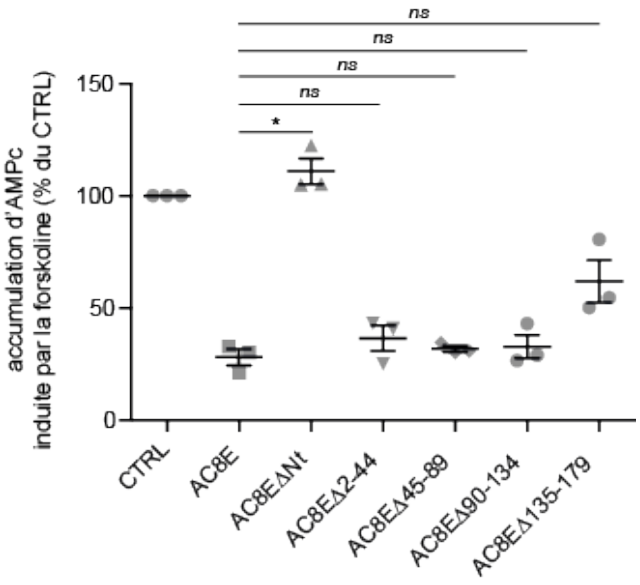


Figure A.6 : Les délétions de 45aa dans le domaine N-terminal de l'AC8E ne lèvent pas l'effet inhibiteur de l'AC8E.

Dosages immunologiques d'accumulation d'AMPc effectués sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC8E, l'AC8EΔNt, l'AC8EΔ2-44, l'AC8EΔ45-89, l'AC8EΔ90-134, l'AC8EΔ135-179 ou un plasmide contrôle, après 60 min de traitement forskoline (10µM) plus IBMX (500µM). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles et sont représentés en moyennes ± SEM de 3 expériences indépendantes. Les valeurs sont les suivantes : CTRL : 100,0 ± 0,00 % ; AC8E : 28,06 ± 3,61 % ; AC8EΔNt : 110,9 ± 5,77 % ; AC8EΔ2-44 : 36,50 ± 5,71 % ; AC8EΔ45-89 : 31,79 ± 1,38 % ; AC8EΔ90-135 : 32,83 ± 5,15 % ; AC8EΔ135-179 : 61,77 ± 9,49 %. L'analyse statistique est effectuée avec le test non paramétrique Kruskal-Wallis. * $P < 0,05$; *ns* : non significatif

ANNEXE 5 : Identification des cassettes transmembranaires (M1 et/ou M2) des AC3 et AC6 impliquées dans l'hétérodimérisation avec l'AC8E.

Les constructions plasmidiques générées codent *i)* les cassettes M1 ou M2 des AC3 et AC6 étiquetées HA en position N-terminale (M1AC3-HA, M2AC3-HA ; M1AC6-HA, M2AC6-HA) et *ii)* la cassette M2 de l'AC8 étiquetée VSV-G en position N-terminale (M2AC8-VSV-G). On notera que chaque construction présente une cassette transmembranaire flanquée des 60 acides aminés qui l'entourent de part et d'autre (**Figure A.7**).

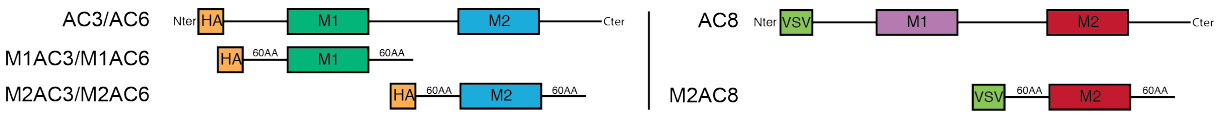
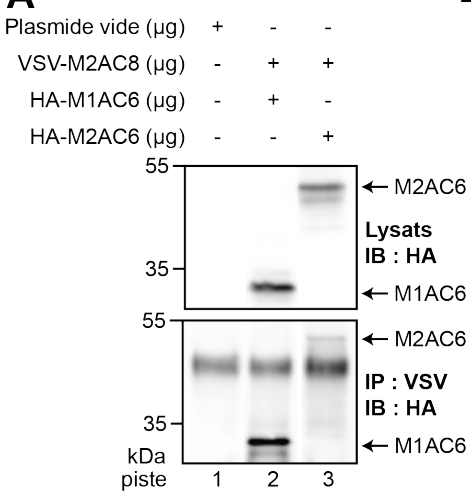


Figure A.7 : Représentation schématique des constructions réalisées.

Des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement M2AC8E et M1AC6 ou M2AC6.

Dans les cellules HEK293 transfectées avec les plasmides codant M2AC8E et M1AC6 ou M2AC6 dans un rapport 1:1, la protéine recombinante M2AC8E co-immunoprécipite avec M1AC6 et M2AC6 (**Figure A.8, panel inférieur**). On remarque que dans ces conditions expérimentales, l'intensité de la bande correspondante à la protéine recombinante M1AC6 immunoprécipitée est 8,3 fois supérieure à celle de M2AC6 (**Figure A.8B**) ; pourtant, leurs concentrations initiales, reflétées par l'intensité des bandes dans le lysat à partir duquel sont réalisées les expériences d'immunoprécipitation, sont presque identiques (**Figure A.8B** : 8554 pour M1AC6 et 6338 pour M2AC6 et **Figure A.8A**).

A



B

Piste	2	3	
Densité optique	8554	6338	**Inputs**
Ratio M1/M2	1,35		
Densité optique	1443	173	**IP : VSV**
Ratio M1/M2	8,32		

Figure A.8 : La cassette transmembranaire M2AC8 interagit préférentiellement avec la cassette M1 de l'AC6.
A. Western blots des lysats (**panel supérieur**) et immunoprécipitats (IP, **panel inférieur**) issus des cellules HEK293 exprimant AC8E-VSV et/ou M1AC6-HA ou M2AC6-HA réalisés grâce à un anticorps anti-HA (IB : HA). Les protéines des lysats et immunoprécipitats ont été séparées sur SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices. L'immunoprécipitation a été réalisée à l'aide d'un anti-VSV-G. **B.** Tableau des densités optiques (en unité de D.O.) des bandes immunoréactives.

ANNEXE 6 : Purification des AC étiquetées HA

Le rendement et la pureté protéique obtenus par transcription-traduction *in vitro* ont été évalués à partir de lysat de cellules HeLa transfectées par un vecteur pT7 dans lequel a été inséré l'ADNc codant l'AC8E et l'étiquette HA. La pureté de l'AC8E après immunoprécipitation s'est révélée être très insuffisante. En effet, si l'AC8E-HA est bien présente dans l'immunoprécipitat (**Figure A.9A**), la coloration au bleu de Coomassie d'un SDS-PAGE effectué exactement dans les mêmes conditions que celui ayant servi à réaliser le western blot révèle que notre protéine d'intérêt est minoritaire par rapport aux autres protéines contenues dans l'immunoprécipitat. (**Figure A.9B, piste IP**). Le dosage de l'AC8E-HA purifiée effectué par mesure de la densitométrie après coloration au bleu de Coomassie par rapport à des quantités connues de sérum albumine bovine pure évalue la quantité totale d'AC8E-HA purifiée à environ 850 ng (**Figure A.9B**).

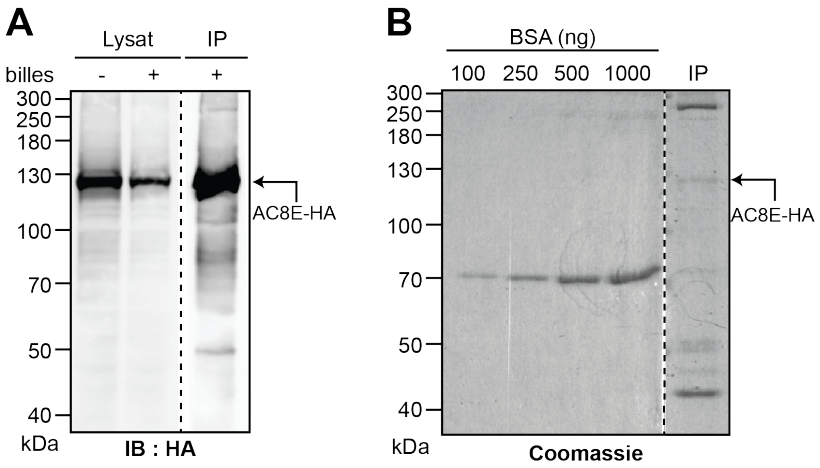
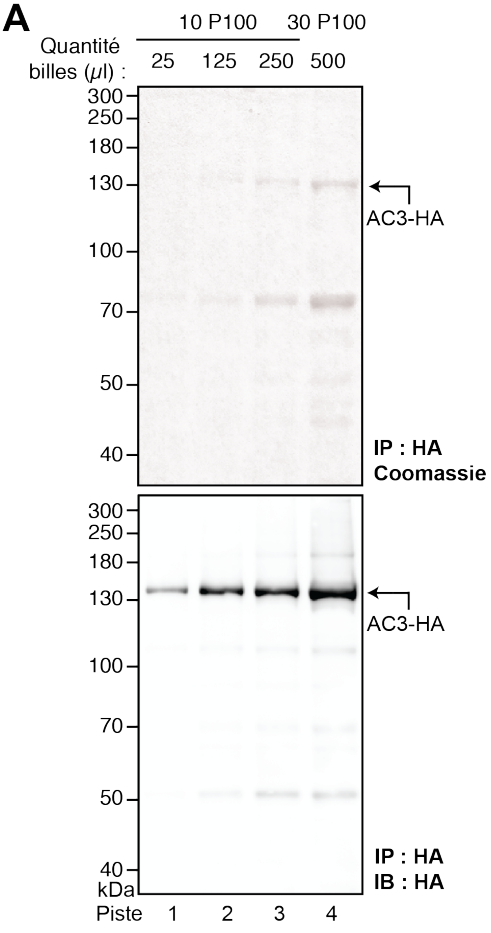


Figure A.9 : Purification des AC étiquetées HA par approche de transcription-traduction in vitro.
Le lysat issu de cellules HeLa a été incubé avec un plasmide pT7 encodant l'AC8E-HA, puis a été incubé en présence d'un anticorps anti-HA couplé à des billes magnétiques. Les immunoprécipitats (IP) et les lysats ont été analysés par SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices. Les western blots réalisés à partir de ces SDS-PAGE sont effectués avec un anti-HA (**A**). La pureté des protéines immunoprécipitées a été évaluée après coloration au bleu de Coomassie G-250 d'un SDS-PAGE sur lequel ont été déposés l'immunoprécipitat et des quantités croissantes de sérum albumine bovine (**B**). La quantité de la protéine AC8E-HA contenue dans l'immunoprécipitat a été estimée par la mesure de la densité optique de la bande de masse moléculaire apparente à 130kDa correspondante à celle de l'AC8E-HA et comparaison à la gamme étalon établie avec des quantités connues de sérum albumine bovine

La production des AC recombinantes a donc été réalisée dans un système de surexpression hétérologue. Pour ce faire, nous avons créé des lignées monoclonales de cellules HEK293 surexprimant ces protéines de façon stable par sélection à l'aide de l'antibiotique G418. La lignée de HEK293 exprimant l'AC3-HA a été utilisée pour mettre au point la chromatographie d'affinité utilisant un anticorps anti-HA couplés à des billes magnétiques. La quantité de AC3-HA purifiée a été estimée par mesure de la densitométrie après coloration au bleu de Coomassie par rapport à des quantités connues de sérum albumine bovine pure (**Figure A.10, panel supérieur**). L'identité de la bande correspondante à la masse moléculaire apparente de l'AC3 colorée au bleu de coomassie est confirmée par le western blot réalisé en présence d'anticorps anti-HA (**Figure A.10, panel inférieur**). Nos résultats indiquent que la lyse de 30 boites de culture de 100mm de diamètre confluentes de cellules HEK293 surexprimant l'AC3-HA, suivie d'une immunoprécipitation à l'aide de 500µl d'anti-HA couplé à des billes magnétiques permet d'obtenir environ 3µg d'AC3-HA (**Figure A.10B**).

A

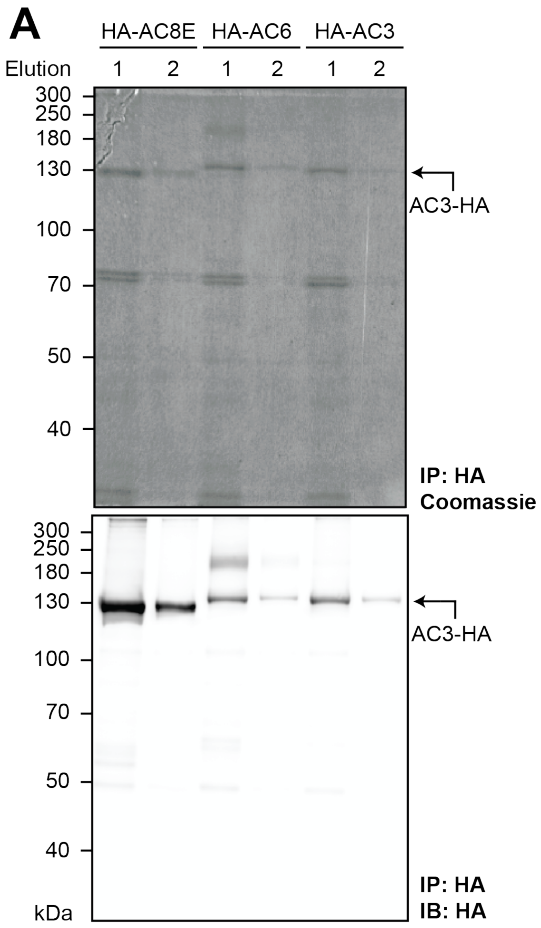


B

Nombre de boites de culture diamètre 100mm	Quantité anti-HA couplé à des billes magnétiques (µl)	Quantité totale d'AC3-HA dans l'immunoprécipitat (µg)
10	25	0,1
	125	0,4
	250	0,6
30	500	3

Figure A.10 : Mise au point de la chromatographie d'affinité pour purifier les AC-HA.
A. Des lignées monoclonales de HEK293 exprimant AC3-HA ont été cultivées en 10 ou 30 plaques de culture 100mm et lysées. Le lysat a été incubé avec des quantités croissantes d'anticorps anti-HA couplés à des billes magnétiques. Les immunoprécipitats (IP) ont été élués et analysés en SDS-PAGE. La pureté et la quantité des protéines immunoprécipitées ont été évaluées par coloration au bleu de Coomassie G-250 (panel supérieur). L'immunoréactivité des protéines immuoprécipitées a été analysée par immunoblot anti-HA (panel inférieur). **B.** Quantité totale d'AC3-HA contenu dans l'immunoprécipitat issus des différentes conditions de culture et d'immunoprécipitation.

Sur la base du rendement de cette expérience préliminaire, nous avons pu déterminer le nombre de cellules à lyser et la quantité d'anticorps anti-HA couplés aux billes magnétiques qu'il fallait pour réaliser le PEPscan. Le dosage des immunoprécipitats (effectué selon la technique précédemment décrite) estime la quantité de protéines récupérée à 23.6µg pour l'AC8E-HA, 14.7µg pour l'AC6-HA et 15.3µg pour l'AC3-HA (**Figure A.11B**). Pour chaque échantillon, l'identité de la bande de masse moléculaire apparente d'environ 130kDa est confirmée par le fait qu'elle soit immunoréactive à l'anti-HA (**Figure A.11A panel inférieur**). On remarque deux bandes de masse moléculaire apparente proche de 70 kDa sur le gel réalisé en conditions dénaturantes et réductrices coloré au bleu de Coomassie (**Figure A.11A, panel supérieur)**. Aucune de ces deux bandes n'est reconnue par un anticorps anti-HA, éliminant l'hypothèse selon laquelle il s'agit de produits de dégradation. Ce résultat suggère que ces deux protéines, systématiquement co-immunoprécitées avec les AC étiquetées HA, sont des protéines faisant partis d'un complexe incluant les AC. Si l'identité de ces deux protéines reste à définir, on peut exclure qu'il s'agisse d'AKAP. En effet, elles ne sont pas reconnues par un anticorps dirigé contre l'AKAP79 (données non présentées).



B

Isoforme	Quantité totale dans l'immunoprécipitat (µg)
AC8E-HA	23,6
AC6-HA	14,7
AC3-HA	15,3

Figure A.11 : Purification des HA-AC3, HA-AC6 et HA-AC8E. Des lignées monoclonales de HEK293 exprimant stablement HA-AC3 ou HA-AC6 ou HA-AC8E ont été cultivées en 150 plaques de culture 100mm et lysées. Le lysat a été incubé avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-HA. Les protéines hybridées aux billes ont été éluées et analysées sur SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices. **A.** La pureté et la quantité de protéines immunoprécipitées a été évaluée par coloration au bleu de Coomassie G-250 et comparaison à une gamme étalon établie avec des quantités connues de sérum albumine bovine (panel supérieur). L'immunoréactivité des protéines éluées a été analysée par immunoblot anti-HA (panel inférieur). **B.** Quantité totale d'HA-AC contenue dans l'immunoprécipitat correspondant.

Les AC-HA présentes dans les immunoprécipitats sont probablement sous forme complexée. En effet, leur analyse par western blot en conditions dénaturantes, mais **non** réductrices, montre une absence de signal à l'anti-HA à 130 kDa, taille observée des AC-HA, mais un signal diffus de plus haut poids moléculaire (données non présentées). Il nous a donc été nécessaire d'isoler les AC-HA avant de réaliser les expériences de PEPscan.

La bande protéique de 130 KDa a été électro-élué du SDS-PAGE réalisé en conditions dénaturantes et réductrices après avoir concentré d'un facteur 10, par précipitation à l'acétone[34], les protéines des immunoprécipitats recueillis. Les mises au point de l'électro-élution révèlent que le rendement de cette méthode peut atteindre 30 à 50% (données non présentées) en diminuant le pourcentage du gel de polyacrylamide et allongeant le temps d'éléctro-élution pour un courant d'une puissance constante de 3 Watts. Ce rendement nous a contraint à répéter quatre fois les expériences d'immunoprécipitation décrites en **Figure A.11** pour obtenir la quantité de protéine souhaitée.

[34]La précipitation à l'acétone de la BSA contenue dans le tampon d'élution de l'immunoprécipitation des AC présente un rendement de 70 à 90%.

ANNEXE 7 : Caractérisation d'un variant d'épissage de l'AC6 cloné dans les CMLV de rat.

Le variant de l'AC6 a été cloné depuis des ADNc issus de cultures primaires de CMLV de rat. L'analyse de sa séquence nucléotidique révèle une délétion de 54pb dans l'exon 7, qui se traduit par une délétion de 18 acides aminés dans le domaine C1 (**Figure A.12**). Pourtant , l'analyse des transcrits de CMLV de rat en culture primaire ne permet pas de détecter ce variant d'épissage cloné depuis ces échantillons (résultats non présentés).

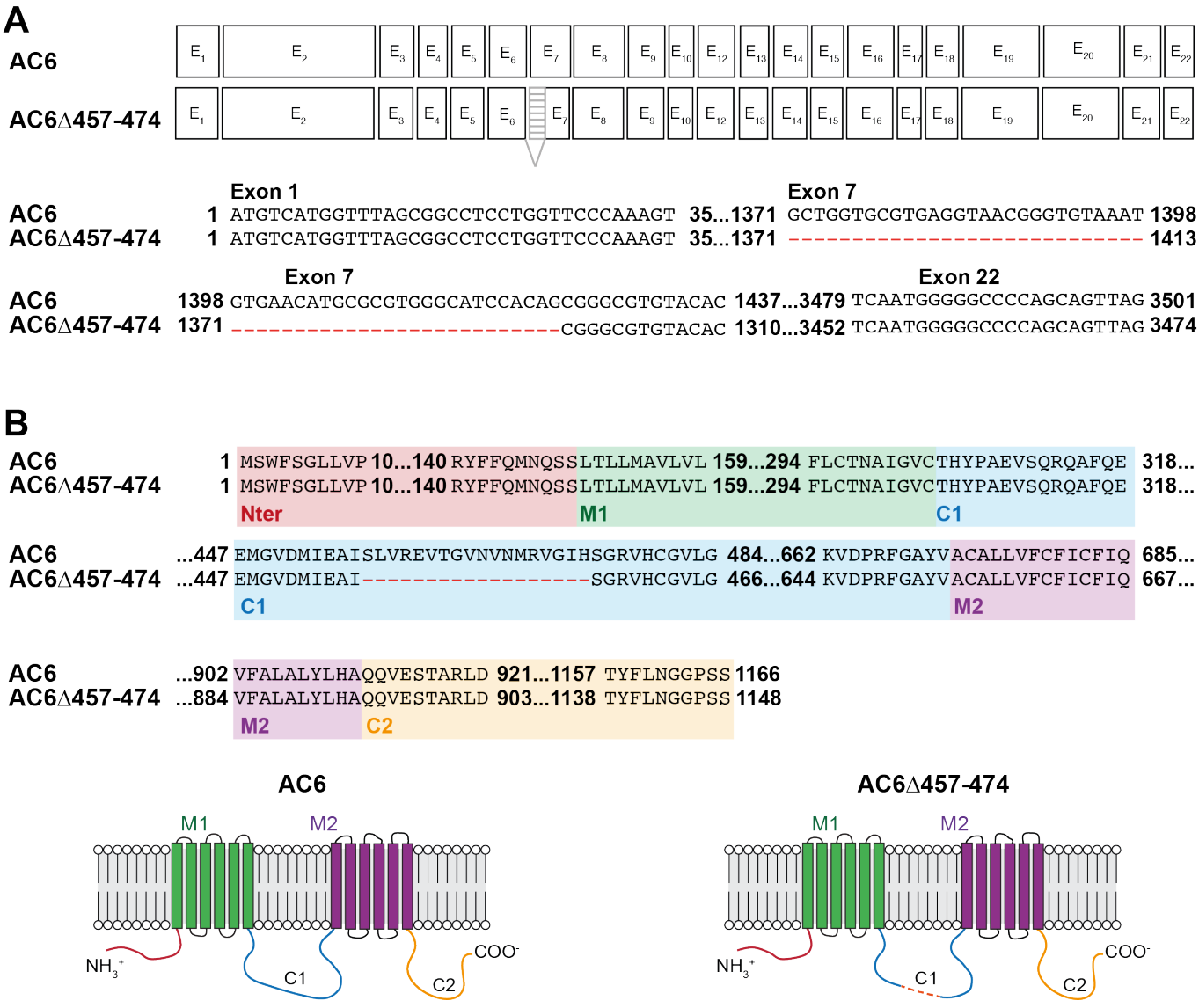


Figure A.12 : Identification d'un variant d'épissage de l'AC6 présentant une délétion de 18aa dans le domaine C1.

A. Alignement de séquences nucléotidiques de l'AC6 et de l'AC6Δ457-474 clonée dans les cultures primaires de CMLV de rat. Le panel supérieur montre l'épissage alternatif de l'exon 7. **B.** Alignement des séquences protéiques des AC6 et AC6Δ457-474. Le panel inférieur montre une représentation schématique des AC6 et AC6Δ457-474. Le segment amputé dans le domaine C1 est représenté en rouge pointillé.

De façon intéressante, l'expression de ce variant de l'AC6 induit une diminution significative, de 45,9%, de l'accumulation d'AMPc après 1h de traitement à 10µM forskoline en présence d'IBMX (500µM) par rapport à des cellules transfectées avec un plasmide contrôle (**Figure A.13**).

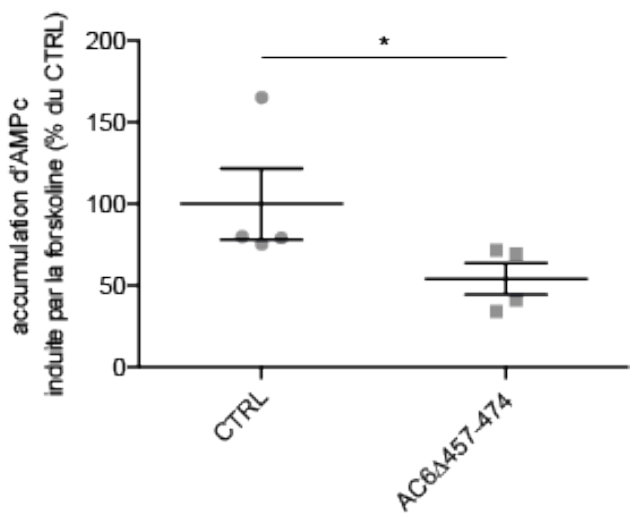


Figure A.13 : La délétion des acides aminés 457 à 474 de l'AC6 induit un effet dominant-négatif.
Dosages immunologiques d'accumulation d'AMPc effectués sur des cellules HEK293 exprimant transitoirement l'AC6Δ457-474, ou un plasmide contrôle, après 60 min de traitement forskolin (10µM) plus IBMX (500µM). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôle et sont représentés en moyennes ± SEM de 4 expériences indépendantes. Les valeurs sont les suivantes : CTRL : 100,0 ± 21,76 % ; AC6Δ457-474 : 54,14 ± 9,64 %. L'analyse statistique a été effectuée avec le test non paramétrique Mann-Whitney. * $P < 0,05$.

ANNEXE 8 : Modélisation des AC.

Afin d'établir le modèle de la région transmembranaire des AC9, AC3, AC8A et AC8E, leurs séquences peptidiques ont été alignées à l'aide de multiples serveurs en utilisant *T-Coffee*. Les bornes des domaines transmembranaires obtenues sur les différents pour chaque AC sont communiquée en **Figure A.14**, **Figure A**.15, **Figure A**.16 et **Figure A**.17.

Servers	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7	TM8	TM9	TM10	TM11	TM12
TOPCONS	117-137	143-163	172-192	218-238	242-262	281-301	788-808	820-840	862-882	892-912	921-941	978-998
OCTOPUS	117-137	143-163	171-191	224-254	nil	284-304	788-808	820-840	861-881	892-912	919-939	979-999
Philius	116-136	143-164	172-195	216-235	242-263	281-301	788-811	820-844	862-884	892-912	922-941	978-997
PolyPhobius	117-136	142-164	173-194	218-237	242-263	281-301	788-809	820-843	862-884	893-912	921-940	978-997
SCAMPI	118-138	143-163	172-192	218-238	242-262	281-301	785-805	817-837	862-882	895-915	921-941	977-997
SPOCTOPUS	117-137	143-163	172-192	223-253	nil	284-304	788-808	820-840	861-881	892-912	919-939	980-1000
CCTOP	118-136	142-162	173-194	218-238	242-261	281-301	788-808	821-845	866-884	898-913	919-940	978-998
HMMTOP	118-136	142-163	167-194	211-238	244-271	274-301	779-806	819-846	856-883	900-927	930-957	971-998
Memsat	119-134	142-165	169-196	219-240	244-261	282-300	770-785	789-813	819-849	856-882	898-913	917-940
Octopus	116-136	142-162	172-192	221-251	nil	281-301	nil	788-808	824-844	nil	nil	917-937
Philius	116-136	143-164	172-195	216-235	242-263	281-301	788-811	820-844	862-884	892-912	922-941	978-997
Phobius	116-136	142-164	176-198	218-235	242-261	281-300	788-809	821-845	866-884	890-910	922-940	978-997
Pro	119-139	144-164	176-196	217-237	240-260	281-301	788-808	825-845	866-886	nil	nil	977-997
Prodiv	116-136	142-162	174-194	217-237	240-260	281-301	792-812	825-845	866-886	892-912	915-935	977-997
Scampi	118-137	145-164	172-191	218-237	240-259	281-300	487-506	787-806	825-844	862-881	921-940	977-996
ScampiMsa	118-137	142-161	177-196	218-237	242-261	277-296	773-792	795-814	824-843	862-881	921-940	977-996
TMHMM	118-137	142-164	173-195	nil	234-256	nil	nil	785-807	822-844	nil	918-940	978-997
Others												
UNIPROT	116-136	142-164	176-198	nil	242-261	nil	788-809	821-845	nil	922-940	nil	978-997
MEMSAT-SVM (psipred)	118-137	143-165	173-196	222-240	244-261	283-303	784-814	818-847	857-887	896-913	917-942	980-1000
PHOBIUS	116-136	142-164	176-198	218-235	242-261	281-300	788-809	821-845	866-884	890-910	922-940	978-997
PROTTER	116-136	142-164	176-198	218-235	242-261	281300	788-809	821-845	866-884	890-910	922-940	978-997
Final filter												
TCOFFE	118-136	143-165	172-192	218-234	241-258	285-302	711-811	819-837	867-885	894-912	922-941	978-997
TOPCONS	117-137	143-163	172-192	218-238	242-262	281-301	788-808	820-840	862-882	892-912	921-941	978-998
CCTOP	118-136	142-162	173-194	218-238	242-261	281-301	788-808	821-845	866-884	898-913	919-940	978-998
HMMTOP	118-136	142-163	167-194	211-238	244-271	274-301	779-806	819-846	856-883	900-927	930-957	971-998
MEMSAT-SVM (psipred)	118-137	143-165	173-196	222-240	244-261	283-303	784-814	818-847	857-887	896-913	917-942	980-1000
chosen	117-137	143-163	172-192	218-238	241-258	281-301	788-808	818-840	862-884	896-912	917-940	978-998

Figure A.14 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC9 dans la séquence peptidique.

Websevers	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7	TM8	TM9	TM10	TM11	TM12
TOPCONS	77-97	105-125	137-157	168-188	190-210	227-247	631-651	659-679	703-723	751-771	774-794	838-858
OCTOPUS	77-97	106-126	136-156	174-188	190-204	227-247	628-648	659-679	701-721	751-771	773-793	838-858
Philius	78-100	106-125	138-157	168-183	190-210	226-246	631-651	662-685	705-725	751-769	775-795	836-857
PolyPhobius	78-100	105-125	138-157	169-185	190-210	226-246	631-651	658-681	704-723	751-769	775-794	839-857
SCAMPI	76-96	105-125	138-158	168-188	190-210	227-247	632-652	659-679	705-725	750-770	775-795	840-860
SPOCTOPUS	77-97	106-126	136-156	174-188	190-204	227-247	628-648	659-679	702-722	751-771	773-793	838-858
TMHMM												
CCTTOP	78-98	106-126	138-157	169-185	189-209	226-246	631-651	662-682	704-724	751-770	775-796	840-857
HMMTOP	79-100	106-130	138-159	162-183	189-210	226-247	631-652	655-682	704-725	728-749	752-773	776-797
Memsat	77-100	106-127	138-156	170-189	193-208	228-246	631-653	657-685	702-724	752-770	774-796	841-856
Octopus	78-98	107-127	136-156	169-183	185-199	227-247	631-651	658-678	702-722	751-771	773-793	nil
Philius	78-100	106-125	138-157	168-183	190-210	226-246	631-651	662-685	705-725	751-769	775-795	836-857
Phobius	78-100	106-126	138-157	169-185	190-210	230-247	631-651	663-685	706-731	751-768	775-793	840-857
Pro	80-100	105-125	137-157	162-182	185-205	226-246	632-652	665-685	706-726	747-767	777-797	nil
Prodiv	77-97	109-129	135-155	167-187	190-210	222-242	631-651	663-683	704-724	745-765	771-791	77-96
Scampi	105-124	139-158	168-187	190-209	227-246	631-650	661-680	705-724	750-769	775-794	839-858	nil
ScampiMsa	76-95	105-124	138-157	165-184	189-208	226-245	632-651	659-678	705-724	750-769	777-796	837-856
TMHMM	78-100	105-125	138-160	170-187	189-211	226-245	630-649	659-681	709-731	751-770	775-797	840-857
others												
MEMSAT-SVM (psipred)	79-101	107-127	137-158	172-187	191-209	225-246	632-652	656-683	703-726	753-770	774-798	840-859
UNIPROT	80-100	105-125	139-159	173-193	226-246	381-401	631-651	662-682	706-726	755-775	777-797	833-853
PHOBIUS	78-100	106-126	138-157	169-185	190-210	230-247	631-651	663-685	706-731	751-768	775-793	840-857
PROTTER	78-100	106-126	138-157	169-185	190-210	230-247	631-651	663-685	706-731	751-769	775-793	840-858
Final filter												
TOPCONS	77-97	105-125	137-157	168-188	190-210	227-247	631-651	659-679	703-723	751-771	774-794	838-858
CCTTOP	78-98	106-126	138-157	169-185	189-209	226-246	631-651	662-682	704-724	751-770	775-796	840-857
HMMTOP	79-100	106-130	138-159	162-183	189-210	226-247	631-652	655-682	704-725	728-749	752-773	776-797
MEMSAT-SVM (psipred)	79-101	107-127	137-158	172-187	191-209	225-246	632-652	656-683	703-726	753-770	774-798	840-859
Memsat	77-100	106-127	138-156	170-189	193-208	228-246	631-653	657-685	702-724	752-770	774-796	841-856
Prodiv	77-97	109-129	135-155	167-187	190-210	222-242	631-651	663-683	704-724	745-765	771-791	77-96
chosen	77-97	105-125	137-157									

Figure A.15 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC3 dans la séquence peptidique.

Websevers	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7	TM8	TM9	TM10	TM11	TM12
TOPCONS	179-199	209-229	238-258	264-284	286-306	318-338	710-730	737-757	780-800	830-850	856-876	893-913
OCTOPUS	179-199	208-228	238-258	272-286	288-302	320-340	710-730	737-757	780-800	831-851	853-873	895-915
Philius	181-201	210-229	238-265	267-282	284-307	318-338	708-730	738-758	779-802	829-850	856-878	897-913
PolyPhobius	179-202	210-229	240-261	267-284	288-307	318-338	709-730	737-759	782-803	832-850	857-878	893-913
SCAMPI	179-199	209-229	241-261	264-284	286-306	318-338	711-731	738-758	784-804	830-850	856-876	891-911
SPOCTOPUS	179-199	208-228	238-258	272-286	288-302	320-340	710-730	737-757	780-800	831-851	853-873	895-915
TMHMM	181-203	210-229	244-263	270-292	nil	317-339	708-730	740-758	779-801	832-850	856-978	Nil
CCTTOP	179-199	210-229	242-261	267-284	288-307	318-335	711-730	738-758	783-803	830-850	856-875	897-913
HMMTOP	178-205	208-229	243-264	267-284	288-315	318-339	711-732	735-756	759-780	783-804	809-830	833-854
Memsat	179-200	210-230	242-264	268-285	289-305	319-334	710-734	738-768	782-803	830-849	853-874	897-912
Octopus	178-198	209-229	241-261	265-279	281-295	318-338	710-730	738-758	781-801	830-850	852-872	nil
Philius	181-201	210-229	238-265	267-282	284-307	318-338	708-730	738-758	779-802	829-850	856-878	897-913
Phobius	180-199	211-229	241-261	267-284	291-312	318-338	713-730	736-758	779-803	832-850	857-877	897-913
Pro	179-199	210-230	242-262	283-303	nil	nil	711-731	744-764	785-805	826-846	856-876	892-912
Prodiv	177-204	209-229	241-261	266-286	289-309	314-334	711-731	736-764	785-805	827-847	850-870	892-912
Scampi	185-204	209-228	244-263	272-291	318-337	504-523	711-730	738-757	784-803	830-849	856-875	891-910
ScampiMsa	177-196	208-227	242-261	264-283	286-305	314-333	711-730	738-757	784-803	832-851	856-875	891-910
TMHMM	181-203	210-229	244-263	270-292	nil	317-339	708-730	740-758	779-801	832-851	856-878	nil
others												
MEMSAT-SVM (psipred)	180-200	209-229	239-260	268-283	287-307	319-337	708-730	734-764	782-803	832-850	854-874	897-913
UNIPROT	180-200	209-229	244-264	271-291	293-313	318-338	713-733	735-755	784-804	828-848	858-878	891-911
PHOBIUS	180-199	211-229	241-261	267-284	291-312	318-338	713-730	736-758	779-803	nil	857-877	897-913
PROTTER	180-199	211-229	241-261	267-284	291-312	318-338	713-730	736-758	779-803	832-850	857-877	897-913
Final filter												
TOPCONS	179-199	209-229	238-258	264-284	286-306	318-338	710-730	737-757	780-800	830-850	856-876	893-913
CCTTOP	179-199	210-229	242-261	267-284	288-307	318-335	711-730	738-758	783-803	830-850	856-875	897-913
HMMTOP	178-205	208-229	243-264	267-284	288-315	318-339	711-732	735-756	759-780	783-804	809-830	833-854
MEMSAT-SVM (psipred)	180-200	209-229	239-260	268-283	287-307	319-337	708-730	734-764	782-803	832-850	854-874	897-913
Memsat	179-200	210-230	242-264	268-285	289-305	319-334	710-734	738-768	782-803	830-849	853-874	897-912
Prodiv	177-204	209-229	241-261	266-286	289-309	314-334	711-731	736-764	785-805	827-847	850-870	892-912
chosen	**179-199**	**209-229**	**238-258**	**264-284**	**286-306**	**318-338**	**710-730**	**737-757**	**780-800**	**830-850**	**856-876**	**893-913**

Figure A.16 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC8A dans la séquence peptidique.

Websevers	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7	TM8	TM9	TM10	TM11	TM12
TOPCONS	nil	nil	nil	nil	nil	181-201	572-592	599-619	643-663	692-712	717-737	758-778
OCTOPUS	nil	nil	nil	nil	nil	182-202	572-592	599-619	643-663	693-713	715-735	758-778
Philius	nil	nil	nil	nil	nil	180-200	570-592	600-620	641-664	691-712	718-740	759-775
PolyPhobius	nil	nil	nil	nil	nil	175-189	191-205	572-592	598-620	644-665	694-712	718-737
SCAMPI	nil	nil	nil	nil	nil	181-201	573-593	601-621	646-666	690-710	718-738	758-778
SPOCTOPUS	nil	nil	nil	nil	nil	182-202	572-592	599-619	643-663	693-713	715-735	758-778
CCTTOP	nil	nil	nil	nil	nil	180-197	573-592	600-620	645-664	694-710	718-737	759-774
HMMTOP	nil	nil	nil	nil	nil	nil	573-600	603-630	645-666	683-710	713-740	746-773
Memsat	nil	nil	nil	nil	nil	182-197	572-596	600-630	634-664	692-711	715-736	759-774
Octopus	nil	nil	nil	nil	nil	nil	572-592	600-620	643-663	692-712	714-734	nil
Philius	nil	nil	nil	nil	nil	180-200	570-592	600-620	641-664	691-712	718-740	759-775
Phobius	nil	nil	nil	nil	nil	180-200	575-592	598-620	641-665	694-712	719-739	759-775
Pro	nil	nil	nil	nil	nil	nil	573-593	606-626	647-667	688-708	718-738	754-774
Prodiv	nil	nil	nil	nil	nil	nil	573-593	606-626	647-667	688-708	714-734	755-775
Scampi	nil	nil	nil	nil	nil	180-199	366-385	573-592	600-619	646-665	692-711	718-737
ScampiMsa	nil	nil	nil	nil	nil	180-199	573-592	600-619	646-665	694-713	718-737	753-772
TMHMM	nil	nil	nil	nil	nil	179-201	570-592	602-620	641-663	694-713	718-740	
others												
MEMSAT-SVM (psipred)	nil	nil	nil	nil	nil	182-200	572-593	597-627	644-666	717-737	760-775	
UNIPROT	nil	nil	nil	nil	nil	180-200	575-592	598-620	641-665	694-712	719-739	
PHOBIUS	nil	nil	nil	nil	nil	180-200	575-592	598-620	641-665	691-712	719-739	759-775
PROTTER	nil	nil	nil	nil	nil	180-200	575-592	597-620	641-665	694-712	719-739	759-775
Final filter												
TOPCONS	nil	nil	nil	nil	nil	181-201	572-592	599-619	643-663	692-712	717-737	758-778
CCTTOP	nil	nil	nil	nil	nil	180-197	573-592	600-620	645-664	694-710	718-737	759-774
HMMTOP	nil	nil	nil	nil	nil	nil	573-600	603-630	645-666	683-710	713-740	746-773
MEMSAT-SVM (psipred)	nil	nil	nil	nil	nil	182-200	572-593	597-627	644-666	717-737	760-775	
Memsat	nil	nil	nil	nil	nil	182-197	572-596	600-630	634-664	692-711	715-736	759-774
Prodiv	nil	nil	nil	nil	nil	nil	573-593	606-626	647-667	688-708	714-734	755-775
chosen						**181-201**	**572-592**	**599-619**	**643-663**	**692-712**	**717-737**	**758-778**

Figure A.17 : Localisation des domaines transmembranaires de l'AC8E dans la séquence peptidique.

Les régions N-terminale, C1b et C2b des AC9, AC3, AC8A et AC8E ont été modélisées individuellement (**Figure A.18**) afin d'établir les modèles de la structure tridimensionnelle intégrale de ces AC présentés en résultats.

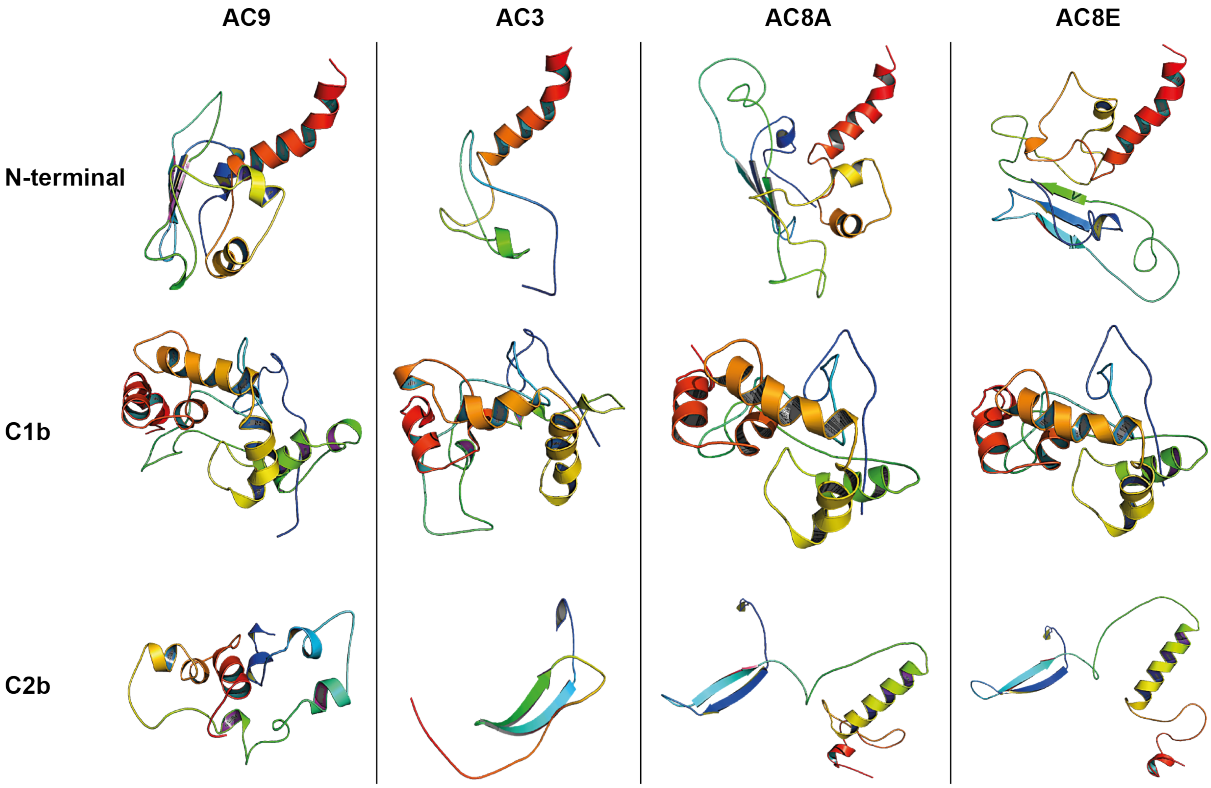


Figure A.18 : Modèle de la structure des régions N-terminale, C1b et C2b des AC9, AC3, AC8A et AC8E.