Altérations des cellules musculaires lisses vasculaires dans la maladie d'Alzheimer et les remodelages vasculaires pathologiques

Samar Fathallah

▶ **To cite this version:**

Samar Fathallah. Altérations des cellules musculaires lisses vasculaires dans la maladie d'Alzheimer et les remodelages vasculaires pathologiques. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS421 . tel-04404836

HAL Id: tel-04404836
https://theses.hal.science/tel-04404836

Submitted on 19 Jan 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

ED394 – École Doctorale *Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique*

Réalisée au sein de l'Institut de Biologie Paris Seine
UMR8256 - Adaptation Biologique et Vieillissement
Équipe *Dynamique de la Signalisation Intracellulaire et Cibles Thérapeutiques*

ALTERATIONS DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER ET LES REMODELAGES VASCULAIRES PATHOLOGIQUES

Présentée par

Samar FATHALLAH

Dirigée par
le **Dr Régis BLAISE**
Maître de Conférence des Université, *Sorbonne-Université, IPBS, Paris*

Soutenue publiquement le 16 octobre 2023 devant un jury composé de :

Pr Xavier HOUARD, Professeur des Universités *Sorbonne Université, CRSA, Paris*	**Président**
Dr Muriel LAFFARGUE, Directrice de Recherche CNRS *Université Paul Sabatier, I2MC, Toulouse*	**Rapportrice**
Dr Nicolas SERGEANT, Directeur de Recherche INSERM *Université de Lille Nord de France, Lille*	**Rapporteur**
Dr Marie-Claude POTIER, Directrice de Recherche CNRS *Sorbonne Université, ICM, Paris*	**Examinatrice**
Dr Guillaume PIDOUX, Chargé de Recherche INSERM *Université Paris Saclay, Orsay*	**Examinateur**
Dr Régis BLAISE, Maître de Conférence *Sorbonne Université, IBPS, Paris*	**Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Cette thèse je ne la vois pas comme mon unique réussite, pour moi elle est aussi celle de mes proches sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Sans ma famille je ne serai jamais arrivée là où j'en suis aujourd'hui et c'est pour cette raison que je leur dédie cette thèse.
Réaliser une thèse est une expérience de vie à part entière. Pour moi cela va bien au-delà de la science et d'un projet que l'on souhaite mener à terme, c'est avant tout des rencontres avec différentes versions de nous-même qui nous amènent sans cesse à évoluer, à repousser nos limites mais c'est aussi des rencontres avec des personnes qui nous marqueront à jamais en tant que scientifique et en tant qu'être humain. Je souhaiterais donc remercier toutes ces personnes pour ce qu'elles m'ont apporté et leur dire ce que cela a représenté pour moi, même si aucun mot ne sera suffisant pour décrire tout ce que je pense et toute la reconnaissance que j'ai envers elles.

Tout ce que j'ai pu accomplir au cours de cette thèse est le reflet d'un voyage intellectuel, scientifique et académique stimulant, mais qui n'aurait jamais pu être réalisé en solitaire. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur le soutien inestimable et l'engagement sans faille de toute l'équipe DISTT et c'est avec une profonde gratitude que je souhaiterais remercier chacun d'entre eux.

Pour commencer, **Régis**. Merci d'avoir cru en moi et en ma capacité à réaliser cette thèse, alors qu'à ce moment-là je n'y croyais pas encore moi-même. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu as partagé avec moi sur le plan scientifique, mais te remercier pour cela sans parler de l'aspect humain ne rendrait pas hommage au directeur de thèse exceptionnel que tu as été pour moi. Tu as toujours été à l'écoute même dans mes silences, tu m'as laissée la liberté qu'il me fallait pour m'épanouir scientifiquement et personnellement et tu as toujours su trouver les mots en ce qui me concerne, peu importe que ce soit pour m'expliquer des notions complexes ou des techniques, pour me réconforter et me rassurer ou au contraire pour m'amener à repousser mes propres limites. Enfin, au quotidien ta richesse culturelle a souvent été une source d'inspiration et tes nombreuses anecdotes aussi diverses soit elles ont rythmé nos pauses café avec Ségolène, et ont été à l'origine de moments à jamais gravés dans notre mémoire.

Pierre, je tenais tout d'abord à te remercier d'avoir fait de moi une meilleure scientifique. Tu nous as appris à pratiquer la science avec rigueur et humilité mais surtout à ne jamais se limiter à la simple évidence du résultat. Je pense que ce qui m'aura le plus marquée, c'est le plaisir que tu prenais à répondre à nos questions par d'autres questions, car là où nous cherchions une réponse simple pour aller vite, tu nous offrais en fait l'opportunité de développer notre réflexion et de grandir scientifiquement, alors pour tout cela merci. Enfin je tenais simplement à te remercier d'avoir toujours répondu présent.

Isabelle, merci pour ton aide, tes conseils et le regard que tu as apporté sur les différents projets qui sont inestimables. Ta franchise tout comme ton exigence m'ont

souvent bousculée et fait me remettre en question, mais je t'en remercie et te respecte énormément pour cela car malgré tout elles m'ont poussée à me dépasser au quotidien.

Ségolène, merci d'avoir partagé avec moi le quotidien de la thèse, d'avoir partagé les moments de doutes et de joies. J'ai découvert beaucoup de choses pendant ces trois années, mais tu es vraisemblablement LA découverte. Surement pas faites pour s'entendre au départ, nous avons d'une certaine façon, réussi à créer un équilibre qui nous aura été bénéfique à toutes les deux. Mais surtout, merci de m'avoir fait comprendre que j'avais moi aussi ma voix et qu'elle comptait tout autant que celle de n'importe qui d'autre.

Bernard, je suis heureuse d'avoir eu la chance de travailler avec toi sur ce projet Alzheimer et d'avoir pu profiter de ton immense connaissance et expertise sur le sujet (*car il faut dire que je n'y connaissais pas grand-chose au départ*). Tu as cette capacité rare de créer un environnement serein et harmonieux qui rend le travail plus agréable et les défis plus faciles à surmonter. Alors merci pour ta générosité, ta bonne humeur et pour m'avoir donné de ton temps quand tu n'y étais pas obligé, de tout cela est née une belle amitié.

Liliana, merci pour ta bienveillance, ton écoute et toutes ces grandes discussions sur l'avenir après la thèse. Bien évidemment, je te remercie aussi pour ton aide et les précieux conseils scientifiques qui ont contribué à faire avancer les projets.

Je souhaiterais également remercier les anciens membres de l'équipe.

Yohan, merci d'avoir été présent lors de mes premiers pas au labo et de m'avoir transmis toutes ces petites astuces qui m'auront suivies jusqu'à la fin de cette aventure scientifique.

Martine, merci pour ta gentillesse et pour toutes ces discussions qu'on a pu avoir dans les moments de doutes qui viennent avec la thèse.

Nicolas et **Izeta**, merci à vous deux pour votre aide lors de votre passage dans l'équipe, et je vous souhaite le meilleur pour la suite de votre parcours scientifique.

Je tenais à remercier **les membres de mon jury**, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'y avoir consacrer leur temps en partageant avec moi à la fois leur expertise et leur soutien. En plus d'éclairer les aspects positifs de mon travail, vos commentaires et suggestions au cours de la soutenance m'ont véritablement poussée à me remettre en question, à aller au-delà de mes limites, et à améliorer la qualité de ma réflexion et de ma recherche.

Je souhaiterais également remercier **Boris** de m'avoir accueillie dans son équipe pendant ces quelques mois. Travailler à tes côtés a été une expérience enrichissante, et je te remercie sincèrement pour ta confiance, pour avoir pris le temps de me former et m'accompagner. Et plus que tout, merci d'avoir permis ma rencontre avec **Maëliss** et **Linda** (*mes acolytes de la 3606*). Il y'a des rencontres qui dès les premiers instants sont uniques et exceptionnelles et la nôtre en fait partie. A vous deux, merci d'avoir rendu ces longues journées de manip si fun et si rythmées (*mais chut faut pas trop que ça se sache*…), vous

m’avez fait me sentir chez moi, peut-être même un peu trop vu la difficulté que j’ai eu à vous quitter. Pour résumer, ce qui devait n’être qu’un passage éclair dans ma thèse à en réalité donner naissance à une des plus belles amitiés, qui je le sais ne fait que commencer.

Ensuite, je tenais à remercier **tous mes amis de l’IDPA** que j’ai d’ailleurs qualifié de grande famille (…*un peu déséquilibrée mais c’est ce qui fait son charme*), parce que c’est ce qu’elle est devenue pour moi. On a souvent partagé nos malheurs de thèse mais en parallèle on puisait aussi notre force les uns dans les autres puisque les réussites de chacun devenaient une motivation pour tous. L’IDPA ça a aussi été l’occasion de créer de nouvelles initiatives et ensemble nous avons fait naître Pizz’of Science et avec lui une occasion pour les doctorants et pour tous les membres de cet institut d’échanger et de se connaître à travers la science décontractée.

Bien sûr, un immense merci à toutes les personnes du B6 avec qui j'ai eu le plaisir de partager des discussions autour d’un un café, d’un déjeuner mais aussi des paillasses : merci à **Salima**, **Ada**, **Théo**, **Coralie**, **Oriane**, **Natayme**, **Francesca**, **Lou**, **Tamara**... Votre présence apporte de la vie à ce triste et long couloir.

Merci à **ma famille**, qui m’a toujours encouragée, écoutée, pris soin de moi et qui a tout fait pour que la seule chose dont j’ai à me soucier dans la vie ce soit d’accomplir mes rêves et d’atteindre mes objectifs. Tout faire pour vous rendre fiers a été une immense source de motivation et m’a donné la force d’aller au bout des choses, je suis profondément reconnaissante de vous avoir à mes côtés.

Pour finir **Doudi,** merci de m’avoir soutenue au quotidien pour ne pas dire supportée par moment, car il t’en aura fallu de la patience pour m’entendre parler de tout ce qui n’allait pas, de mes doutes et de mes remises en question permanente. Tu as été mon pilier, sans qui cet ascenseur émotionnel permanent qui définit si bien la thèse, aurait peut-être eu raison de ma détermination. Mais tu as avant tout été le premier avec qui j’ai partagé les petites joies de la thèse (*oui il y’en a aussi…*) et le premier à m’avoir vu évoluer et surmonter chaque épreuve au niveau professionnel comme dans la vie, et j’espère bien que tu seras le premier à faire tout cela pendant encore très longtemps… Au final, peu importe ce que je pourrai écrire, ce ne sera jamais assez pour te remercier.

RESUME

Les altérations des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), qu'elles soient phénotypiques (transdifférenciation) ou fonctionnelles, sont impliquées dans les remodelages vasculaires pathologiques (athérosclérose et resténose post-angioplastie), mais également dans les altérations vasculaires dans la maladie d'Alzheimer (MA) et les angiopathies amyloïdes cérébrales (AAC).

Dans une première partie de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans la transdifférenciation des CMLV. Des travaux précédents de l'équipe ont démontré dans les CMLV transdifférenciées, l'expression *de novo* d'un nouveau variant d'AC8 : l'AC8E. L'AC8E favorise la transdifférenciation des CMLV en réduisant la production d'AMPc qui par ses propriétés anti-inflammatoires, anti-migratoires et anti-prolifératives, permet le maintien de l'état différencié des CMLV. L'AC8E, se comporte comme un dominant négatif en s'hétérodimérisant avec les AC fonctionnelles et en les séquestrant dans le réticulum endoplasmique (RE), empêchant leur adressage à la membrane. Au cours de ma thèse, j'ai terminé la caractérisation de l'AC8E d'un point de vue biochimique et fonctionnel (par imagerie de biosenseurs) et d'un point de vue structurel (en collaboration avec l'Université de Reims Champagne-Ardennes), qui nous a permis de proposer pour la première fois, un modèle structural 3D complet d'une AC. Cette étude a démontré que l'effet dominant négatif de l'AC8E implique deux mécanismes : i) un repositionnement du domaine N-terminal de l'AC8E altérant la conformation du site catalytique et ii) la séquestration des dimères AC8E/ACs dans le reticulum endoplasmique, empêchant un adressage correct à la membrane. Nous avons alors identifié les séquences peptidiques d'interaction des dimères d'AC8/AC par une approche de PEPscan, sur la base desquelles dix peptides interférents ont été conçus, optimisés et testés en vue de rompre l'hétérodimérisation de l'AC8E avec ses partenaires.

Dans une seconde partie de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes moléculaires à l'origine des altérations de la tonicité vasculaire associée aux dépôts amyloïdes. Dans le contexte de la MA et des AAC, les dépôts vasculaires de peptides amyloïdes Aβ (principalement le peptide $A\beta_{1-40}$) conduisent à une altération de l'intégrité des vaisseaux cérébraux, entraînant une modification du tonus vasculaire menant à des hypoperfusions ou à des accidents vasculaires de type micro-hémorragies, impliqués dans l'altération des fonctions cognitives. Le tonus vasculaire est régulé par les CMLV et est dépendant de l'équilibre entre deux seconds messagers : l'AMPc et le calcium, respectivement vasodilatateur et vasoconstricteur. Nous avons étudié l'effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur ces deux voies de signalisations par imagerie dynamique dans des cultures primaires de CMLV aortiques et cérébrovasculaires, mais également *ex vivo* en mesurant par wire-myographie l'effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la réactivité d'artères basilaires de rats, en réponse à des agents vasomodulateurs. Cette étude démontre que les CMLV exposées au peptide $A\beta_{1-40}$ acquièrent un phénotype hypercontractile puisque la réponse calcique est augmentée, et que la production d'AMPc est diminuée, vraisemblablement en partie par un mécanisme dépendant de la PDE3. Ces résultats ont été confirmés *ex vivo* par une augmentation de la vasoconstriction et une diminution de la vasodilatation des artères basilaires de rats exposées au peptide $A\beta_{1-40}$. Cette étude a permis une avancée dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de la réactivité vasculaire induite par le peptide $A\beta_{1-40}$, et font des CMLV, des cibles potentielles pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à réduire les altérations du débit sanguin cérébral dans le contexte des AAC et de la MA, mais également à limiter l'apparition d'hypoperfusions et/ou de microhémorragies chez les patients.

SUMMARY

The alterations in vascular smooth muscle cells (VSMCs), whether phenotypic (transdifferentiation) or functional, play a crucial role in pathological vascular remodeling processes such as atherosclerosis and post-angioplasty restenosis. Additionally, these alterations are also implicated in vascular dysfunction in Alzheimer's disease (AD) and cerebral amyloid angiopathy (CAA).

In the first part of my thesis, I investigated the molecular mechanisms involved in the transdifferentiation of VSMCs. Previous research by our team demonstrated the de novo expression of a novel AC8 splicing variant named AC8E, in transdifferentiated VSMCs. AC8E promotes VSMC transdifferentiation by reducing cAMP production, known for its anti-inflammatory, anti-migratory, and anti-proliferative properties, thereby contributing to the preservation of VSMCs' differentiated state. AC8E acts as a dominant negative by forming heterodimers with other full-length ACs, impeding the traffic of functional units towards the plasma membrane. During my thesis, I completed the biochemical and functional characterization of AC8E (by FRET-based biosensor imaging), and structural analysis in collaboration with the University of Reims Champagne-Ardennes. This collaboration allowed us to propose, for the first time, a comprehensive 3D structural model of an AC. Our study revealed that the dominant negative effect of AC8E involves two mechanisms: i) a shift of the N-terminal domain of AC8E, possibly disrupting the catalytic core's conformation, and ii) sequestration of AC8E/AC dimers in the ER, preventing correct membrane targeting. Subsequently, we identified peptide interaction sequences of AC8/AC dimers using a PEPscan approach, based on which ten interfering peptides were designed, optimized, and tested to disrupt the heterodimerization of AC8E with its partners.

In the second part of my thesis, I focused on the molecular mechanisms underlying alterations in vascular tone associated with amyloid deposits. In the context of AD and CAA, vascular deposits of amyloid peptides, primarily $A\beta_{1-40}$, lead to a disruption of cerebral vascular integrity, resulting in changes in vascular tone leading to hypoperfusion or microhemorrhages, both implicated in cognitive impairment. Vascular tone is regulated by VSMCs and depends on the balance between two second messengers: cAMP (vasodilator) and calcium (vasoconstrictor). We studied the effect of Aβ1-40 peptide on these signaling pathways using dynamic imaging in primary aortic and cerebrovascular VSMC cultures and ex vivo wire myography to measure the effect of $A\beta_{1-40}$ on the reactivity of rat basilar arteries to vasomodulators. Our study demonstrates that VSMCs exposed to $A\beta_{1-40}$ acquire an hypercontractile phenotype due to an increased calcium response and decreased cAMP production (possibly through a mechanism involving PDE3). These findings were confirmed *ex vivo* by increased vasoconstriction and decreased vasodilation in rat basilar arteries exposed to $A\beta_{1-40}$. This study advances our understanding of the molecular mechanisms underlying alteration of vascular reactivity induced by $A\beta_{1-40}$ and highlights VSMCs as potential targets for the development of new therapeutic strategies aimed at reducing cerebral blood flow alterations in the context of CAA and AD, as well as limiting the occurrence of hypoperfusion and/or microhemorrhages in patients.

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

aa : Acide Aminé
AAC : Angiopathie Amyloide Cérébrale
Aβ : Peptide Amyloide β
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-VSV-G : Adenylyl Cyclase 8E étiquetée VSV-G
AGTR : Récepteurs à l'Angiotensin II
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
APP : Amyloid Precursor Protein
ApoE : Apolipoprotéine E
ATP : Adénosine-5'-TriPhosphate

B

BACE1 ou 2 : β-site clivage enzyme 1 or 2
BA : Artère basilaire
BHE : barrière hémato-encéphalique

C

C1 et C2 : Domaines cytosoliques des adenylyl cyclases
Ca^{2+} : Calcium
Ca^{2+}/CaM : Complexe calcium-calmoduline
CaM : Calmodulin
CDS : Séquence codante
CMLV : Cellules Musculaires Lisses Vasculaires

D

DAG : Diacylglycérol
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO : DiMethyl-SulfOxyde

E

ECE : Endothelial Converting Enzyme
EP : Récepteurs des Prostaglandines E2
Epac : Exchange protein directly activated by cAMP

F

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

Fsk : Forskoline

G

GAP : GTPase activating proteins

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

GMPc : Guanosine 3',5'-Monophosphate cyclique

H

HA : Hémagglutinine

HEK : Human Embryonic Kidney cells

I

IB : Immunoblot

IBMX : 3-IsoButyl-1-MethylXanthine

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

IDE : Insulin Degrading Enzyme

IF: Immunofluorescence

IFNγ : Interféron-γ

IL1β : Interleukine 1β

IP : Immunoprécipitation

IP_3 : Inositol 1,4,5-triphosphate

Iso : Isoprotérénol

L

LCS : Liquide Céphalo Spinal

LDL-C: Low Density Lipoprotein Cholesterol

LDL-R : Récepteur au LDL

LTCC : L-type Calcium Channel

M

M1 et M2 : Cassettes transmembranaires des adenylyl cyclases

MA : Maladie d'Alzheimer

MCI : Mild Cognitive Impairment

MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

MEC : Matrice extracellulaire

MLC : Myosin Light Chain

MLC20 : Myosin Light Chain 20

MLCP : Myosin Light Chain Phosphatase

MLCK : Myosin Light Chain Kinase

MMP : Métalloprotéinases matricielles

MRP : Multidrug Resistance Protein
MYPT1 : Myosin Phosphatase Target subunit 1

N

NCX : Échangeur Na^{+}/Ca^{2+}
NEP : Néprilysine
NO : Oxyde nitrique
Nter : Domaine N-terminal de l'AC8E

P

PA : Pression artérielle
pb : paires de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PDE : Phosphodiestérase
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PGE2 : Prostaglandine E2
PGI2 : Prostacycline
PHF : Paired Helical Filaments
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PKG : Protéine Kinase G
PLC : Phospholipase C
PMCA : Plasma membrane Ca^{2+}-ATPase

R

RAGE : Receptor for advanced glycation end products
RCPG : Récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines
RE : Réticulum endoplasmique
RGS : Regulators of G protein signaling
RIS : Resténose Intra-Stent
ROC : Receptor Operated Channel
ROS : Espèces réactives de l'oxygène

S

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SERCA : Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase
siRNA : ARN interférents
SM-MHC : Smooth muscle myosine heavy chain
SNC : Système Nerveux Central
SOC : Store operated Channel
SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TBS-T : Tris Buffered Saline-Tween

tdCMLV : Cellules Musculaires Lisses Vasculaires transdifférenciées à l'IL1β

^{T}EPAC^{vv} : mTurquoise-EPACVenus-Venus

TGF-β : Transforming Growth Factor-β

TM : Domaine transmembranaire des adenylyl cyclases

TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α

V

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

W

WB: Western Blot

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 23

I. Structure des artères de gros et moyen calibre 23

I.1. Le système artériel 23

I.2. Structure de la paroi artérielle 24

I.3. Principaux types cellulaires composant la paroi 25

I.3.1. Cellules endothéliales 25

I.3.2. Cellules musculaires lisses vasculaires 28

II. Mécanismes de régulation de la contractilité des CMLV 32

II.1. Voies de contraction des CML 33

II.1.1. Contraction dépendante du calcium 33

II.1.2. Contraction par sensibilisation au calcium 35

II.2. Voies de relaxation des CMLV 35

II.2.1. La diminution des niveaux intracellulaires de calcium 36

II.2.2. L'hyperpolarisation de la membrane plasmique 36

II.2.3. La diminution de la phosphorylation de la MLC_{20} 36

III. Transition phénotypique des CMLV et remodelages vasculaires 38

III.1. Différents phénotypes des CMLV 38

III.2. Remodelages vasculaires de la physiologie à la pathologie 40

IV. Réceptivité des CMLV et voies de signalisation AMPc et calcique 42

IV.1. RCPG 42

IV.1.1. Structure et activation 42

IV.1.2. Principaux effecteurs des RCPG 44

IV.1.3. Principaux vasomodulateurs dans les CMLV 49

IV.2. Signalisation adénosine 3',5'-monophosphate ou AMPc 50

IV.2.1. L'AMPc 51

IV.2.2. Les Adenylyls Cyclases 52

IV.2.3. Les Phosphodiestérases 66

IV.2.4. Les MRP 70

IV.2.5. Les effecteurs de l'AMPc 71

IV.3. Signalisation Calcique 73

IV.3.1. Rôle du calcium dans les CMLV 73

IV.3.2. Régulateurs de l'homéostasie calcique 74

IV.4. De multiples interactions au cœur de la signalisation RCPG 80

OBJECTIFS DES PROJETS DE THESE 83

MATERIELS & METHODES 86

I. Techniques conventionnelles 86

II. Culture Cellulaire 86

II.1. Milieux de culture 86

II.2. Culture primaire de CMLV cérébrovasculaires 87

II.2.1. Mise au point de la culture primaire 87

II.2.2. Phénotype des rbCMLV par immunofluorescence 90

II.3. Traitement des CMLV avec le peptide $A\beta_{1-40}$ 90

III. Dynamique d'AMPc et Calcium 91

III.1. Imagerie de biosenseurs 91

III.2. Sonde FURA-2AM 93

IV. Mesure de réactivité vasculaire 94

IV.1. Extraction de l'artère basilaire 94

IV.2. Montage et mesure de vasoréactivité 95

PARTIE 1 : ATHEROSCLEROSE ET RESTENOSE POST-ANGIOPLASTIE 98

INTRODUCTION 99

I. De l'athérosclérose à la Resténose post-angioplastie 99

I.1. Définition 99

I.2. L'athérogénèse 100

I.2.1. Initiation de la lésion athéromateuse 101

I.2.2. Progression de la lésion athéromateuse 102

I.2.3. Complications de la lésion athéromateuse : Fragilisation et Rupture de la plaque 105

I.2.4. L'IL1β : cytokine la plus importante de l'athérogénèse 106

I.3. Traitement de l'athérosclérose 107

I.3.1. Prévention primaire 107

I.3.2. Prévention secondaire et traitements pharmacologiques 107

I.3.3. Traitements chirurgicaux 108

I.4. La resténose post-angioplastie (RIS) 109

II. La transdifférenciation des CMLV, un acteur clé des remodelages vasculaires pathologiques 113

II.1. Importance de l'AMPc dans les CMLV 113

II.2. L'adenylyl cyclase 8, un acteur clé des remodelages vasculaires pathologiques et de la transdifférenciation des CMLV 114
II.2.1. L'adenylyl cyclase 8 114
II.2.2. Implication de l'AC8 dans la transdifférenciation des CMLV 117
II.3. Identification d'un nouveau variant de l'AC8 : l'AC8E 120
II.3.1. Clonage et identification des variants d'AC8 exprimés dans les CMLV transdifférenciées 120
II.3.1. Implication de ces AC8 dans la dynamique de production d'AMPc 120
II.3.2. Caractérisation biochimique et fonctionnelle des AC8E-H 122
II.3.3. L'AC8E agit comme un dominant négatif 124

OBJECTIFS 126

RESULTATS 128

I. Article 1 "Unraveling the inhibitory mechanism of Adenylyl Cyclase 8E: New insights into regulatory pathways of cAMP signal integration" 129

I.1. Résumé 129
I.2. Article 1 131

II. Résultats complémentaires non publiés 132

II.1. Identification des séquences d'interaction AC3/AC8 par PEPSCAN 132
II.2. Design et Tests des peptides interférents 135
II.2.1. Design des peptides 135
II.2.2. Tests des peptides 136

DISCUSSION 141

I. Caractérisation fonctionnelle, biochimique et structurelle de l'AC8E 142

I.1. Effet dominant négatif de l'AC8E : un double mécanisme inhibiteur 142
I.1.1. Le domaine N-terminal et l'inhibition de l'activité catalytique 142
I.1.2. L'hétérodimérisation et la rétention intracellulaire 143
I.2. Spécificité tissulaire de l'AC8E 147
I.3. Les variants d'épissages des AC et l'effet dominant négatif, un mécanisme spécifique de l'AC8E ? 149

II. AC8E comme cible thérapeutique chez l'Homme ? 151

II.1. Détection de l'AC8E chez l'Homme 151
II.2. Cibler l'AC8E pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques 152
II.2.1. Cibler l'interaction protéine-protéine (PPI) 152
II.2.2. Les peptides interférents 153
II.2.3. Stratégie de ciblage local et direct de l'expression de l'AC8E : les siRNA 156

III. CONCLUSION 157

PARTIE 2 : MALADIE D'ALZHEIMER ET ANGIOPATHIE AMYLOÏDE CEREBRALE 159

INTRODUCTION 160

I. Maladie d'Alzheimer 160

I.1. Historique 160
I.2. Épidémiologie 161
I.3. Diagnostic 161
I.4. Signes et symptômes 162
I.5. Traitements 163
I.6. Démences dégénératives et vasculaires 164
I.7. AAC et MA 165

II. De la protéine APP à la formation de la plaque 166

II.1. Structure et isoformes de la protéine APP 166
II.2. Clivages protéolytiques de l'APP 168
II.2.1. Voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique 168
II.2.2. Fonctions physiologiques des différents fragments d'APP 170
II.3. Mécanismes de clairance du peptide Aβ 171
II.3.1. Efflux du peptide Aβ 172
II.3.2. Dégradation enzymatique 173
II.3.3. L'influx par les récepteurs RAGE 173
II.3.4. Dérégulation des mécanismes de clairance 175
II.4. Structure et propriétés des différents peptides Aβ 176
II.5. Les différents stades d'agrégation et toxicité du peptide 178

III. Angiopathie Amyloïde Cérébrale 180

III.1. Le système cérébrovasculaire 180
III.1.1. Anatomie du système 180
III.1.2. Structure et environnement des artères cérébrales 182
III.2. Physiopathologie de l'AAC 186
III.2.1. Définition et Épidémiologie 186
III.2.2. Types d'AAC et sévérité 188
III.2.3. Formes familiales des AAC 189
III.2.4. Importance du ratio $A\beta_{1-40}$ /$A\beta_{1-42}$ 192

IV. AAC et dysfonctionnement vasculaire 193

IV.1. Effets des peptides Aβ sur les cellules pariétales et leur environnement 193
IV.1.1. Cellules endothéliales 193
IV.1.2. Cellules musculaires lisses vasculaires 193
IV.1.3. Perturbation de la MEC et de la BHE 194
IV.2. Altération du débit sanguin cérébral par les dépôts amyloïdes 195
IV.3. Régulation de la tonicité vasculaire en condition physiologique 197

OBJECTIFS 200

RESULTATS 202

I. Effets du peptide amyloïde dans les CMLV Aortiques 202
I.1. Effet du peptide amyloïde sur la production d'AMPc 202
I.2. Effets du peptide amyloïde sur l'activité des PDE3 et PDE4 208
I.3. Effets du peptide amyloïde sur la libération de calcium 211
I.4. Un cross talk AMPc – Calcium médié par la PDE1 215

II. Effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la vasoréactivité des artères basilaires de rats 219
II.1. Évaluation de la capacité contractile des artères basilaires de rats exposées au peptide $A\beta_{1-40}$ 219
II.2. Effet du peptide amyloïde sur la relaxation 224

III. Effets du peptide amyloïde dans les CMLV Cérébrales 226
III.1. Effets du peptide amyloïde sur la production d'AMPc 226
III.2. Effet du peptide amyloïde sur la réponse calcique dans les rB-CMLV 231
III.3. Cross Talk AMPc/Calcium dans les CMLV cérébrales 233
III.4. Comparaison des effets du peptide $A\beta_{1-40}$: CMLV aortiques vs CMLV cérébrales vs Artères basilaires 234

DISCUSSION 236

I. Altération de la contractilité des CMLV par le peptide $A\beta_{1-40}$ 238
I.1. Altération de la dynamique d'AMPc 238
I.2. Altération de la dynamique calcique 241
I.2.1. La capacité contractile des CMLV aortiques est réduite par le peptide $A\beta_{1-40}$ 242
I.2.2. La capacité contractile des CMLV cérébrales est augmentée par le peptide $A\beta_{1-40}$ 245
I.3. Altérations des CMLV dans les maladies neurodégénératives et cérébrovasculaires 246

II. Altération de la réactivité vasculaire par le peptide Aβ dans le modèle d'artère basilaire de rat 247

III. Origine vasculaire et choix du modèle d'étude 251

IV. Angiopathie Amyloïde Cérébrale et Maladie d'Alzheimer : un rôle prépondérant de l'atteinte vasculaire ? 253

V. CONCLUSION 256

CONCLUSION GENERALE 258

ANNEXES 259

REFERENCES..... 265

TABLES DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION GENERALE

Figures

Figure I 1.Représentation schématique de la paroi artérielle 24
Figure I 2.Représentation des différentes origines embryonnaires des CMLV par territoire vasculaire.....29
Figure I 3. Régulation de la phosphorylation de la MLC20 33
Figure I 4.Représentation schématique non exhaustive des acteurs impliqués dans la contraction et la relaxation des CMLV..... 37
Figure I 5.Plasticité des CMLV : phénotype contractile et synthétique 38
Figure I 6. Classification des RCPG de la famille 1..... 43
Figure I 7. Cycle d'activation/inactivation des petites protéines G 46
Figure I 8. Différentes signalisations des RCPG..... 48
Figure I 9. Synthèse et Dégradation de l'AMPc..... 51
Figure I 10.Structure générale des AC membranaires 53
Figure I 11. Structure des domaines 5C1a et 2C2 et du site catalytique activé par Gαs 54
Figure I 12. Structure 3D de l'AC9 bovine 56
Figure I 13. Dimérisation intra- et intermoléculaire des Adenylyls Cyclases 57
Figure I 14. Classification phylogénétique des AC membranaires 60
Figure I 15. Structure des PDE..... 67
Figure I 16. Représentation des acteurs du maintien de l'homéostasie calcique..... 74
Figure I 17. Compartimentalisation du signal calcique 80
Figure I 18. Voies de signalisations et mécanismes moléculaires contrôlant les niveaux d'AMPc et de Calcium dans les CMLV..... 81

Tableaux

Tableau I (Bockaert and Pin 1999). Classification des protéines G hétérotrimériques et rôle des sous-unités α..... 45
Tableau I 2. Principales fonctions et effecteurs des petites protéines G..... 47
Tableau I 3. Principaux vasomodulateurs des CMLV et les voies de signalisation recrutées.. 49
Tableau I 4. Classification par groupe des AC en fonction de leurs modalités de régulation . 63
Tableau I 5. Distribution tissulaire et fonctions physiologiques de AC membranaires..... 65
Tableau I 6. Principales PDE exprimées dans les CMLV et leurs propriétés..... 70

MATERIELS & METHODES

Figures

Figure M 1. Comparaison de la prolifération des rBCMLV avec ou sans matrice de collagène 89
Figure M 2. Marquage phénotypique des rb-CMLV par immunofluorescence 90
Figure M 3.Biosenseur ^{T}EPAC^{VV} 91
Figure M 4. Sonde calcique Fura-2AM 93
Figure M 5. Dissection et montage des artères basilaires sur fil 94
Figure M 6. Wire myographe et les étapes de montage d'une artère isolée 96

Tableaux

Tableau M 1.Composition des solutions pour la culture primaire de CMLV cérébrovasculaires 87

PARTIE 1

Figures

Figure I1. 1. Représentation schématique d'une artère athérosclérosée 99
Figure I1. 2. Processus d'athérogénèse et diversité des phénotypes de CMLV retrouvée dans la plaque d'athérome 100
Figure I1. 3.Angioplastie percutanée au ballonnet avec pose de stent 109
Figure I1. 4 Représentation schématique de la resténose post-angioplastie 110
Figure I1. 5. Représentation schématique des variants de l'AC8 116
Figure I1. 6.Évidences de l'implication *in vivo* de l'AC8 dans les remodelages vasculaires pathologiques chez la souris, le rat et l'Homme 118
Figure I1. 7. Représentation schématique des domaines protéiques des AC8E, F, G et H en comparaison de l'AC8A. ...../..... 121
Figure I1. 8. Étude biochimique et fonctionnelle des AC8E-H dans les HEK293A. 123
Figure I1. 9. L'AC8E s'hétérodimérise avec l'AC3 et inhibe l'activité cyclase 125

Figure R1. 1. Schéma représentatif de l'approche de PEPscan 133
Figure R1. 2. Identification des motifs d'acides aminés impliqués dans l'interaction AC8E/ AC3 134
Figure R1. 3. Évaluation de l'effet des peptides interférents candidats sur la production d'AMPc 137
Figure R1. 4. Les peptides 8P1 et 8P2 ne restaurent pas la dynamique d'AMPc 139

Figure D1. 1. Dégradation de l'AC6 dépendante de l'AC8E dans les tdCMLV 146
Figure D1. 2. Expression et épissage de l'AC8A et AC8E. 148
Figure D1. 3. Effet du siRNA AC8 sur la formation de la néointima par angioplastie à ballonnet chez le rat. 156

PARTIE 2

Figures

Figure I2. 1 Structure des domaines de la protéine APP et de protéines APP-like 167
Figure I2. 2 Voie de clivage protéolytique de l'APP 169
Figure I2. 3. Mécanismes de clairance du peptide Aβ à travers la BHE 174
Figure I2. 4 Structure et différentes formes du peptide Aβ 176
Figure I2. 5. Anatomie du cercle de Willis 181
Figure I2. 6. Réseau vasculaire et unité neurovasculaire 184
Figure I2. 7. Structure de la BHE et des jonctions serrées 185
Figure I2. 8. De la production du peptide à l'AAC 186
Figure I2. 9.Différents types d'AAC et sévérité 189
Figure I2. 10. Représentation schématique des mutations de l'APP associées aux formes familiales d'AAC 190
Figure I2. 11. Graphique représentant l'autorégulation du débit sanguin cérébral en fonction de la pression 198
Figure I2. 12. Régulation de la contractilité des CMLV 199

Figure R2. 1 Le traitement $A\beta_{1-40}$ diminue la production d'AMPc dans les CMLV aortiques 205
Figure R2. 2.Le traitement $A\beta_{1-40}$ diminue la production d'AMPc en réponse à l'Isoprotérénol 206
Figure R2. 3 Le peptide $A\beta_{1-40}$ ne modifie pas la production d'AMPc en réponse à la PGE2 dans les CMLV aortiques 208
Figure R2. 4. La PDE3 et non pas la PDE4 semble impliquée dans la diminution d'AMPc Aβ-dépendante 211
Figure R2. 5. Le traitement $A\beta_{1-40}$ réduit la réponse calcique induite par l'Angiotensine II dans les CMLV aortiques. 214
Figure R2. 6. Identification d'un Cross-Talk PDE1 dépendant 218
Figure R2. 7. La capacité contractile absolue n'est pas altérée par le traitement au peptide $A\beta_{1-40}$ 221
Figure R2. 8 Le peptide $A\beta_{1-40}$ augmente la contraction à l'U46619 de l'artère basilaire 223
Figure R2. 9. Le peptide $A\beta_{1-40}$ diminue la relaxation à l'isoprotérénol de l'artère basilaire 225
Figure R2. 10. Le traitement $A\beta_{1-40}$ diminue la production d'AMPc en réponse à la forskoline dans les CMLV cérébrales 229

Figure R2. 11.La production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol a tendance à diminuer dans les CMLV cérébrales traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ 230
Figure R2. 12. Le traitement au peptide $A\beta_{1-40}$ augmente le $[Ca2+]_i$ en réponse à l'U46619 dans les CMLV cérébrales 232
Figure R2. 13. Cross Talk des voies AMPc et Calcium dans les CMLV cérébrales 233

Tableaux

Tableau R2. 1. Comparaison des effets du peptide amyloïde sur l'AMPc et le calcium selon la nature des CMLV ou sur la vasoréactivité des artères basilaires de rat 234

ANNEXES

Figures

Figure S 1. Réponse calcique des CMLV aortiques à différents agonistes vasoconstricteurs260
Figure S 2. Comparaison des niveaux d'AMPc à l'état basal et après stimulation maximale dans les CMLV aortiques..... 261
Figure S 3. Comparaison des niveaux d'AMPc à l'état basal et après stimulation maximale dans les CMLV cérébrales 261

Tableaux

Tableau S 1. Liste des primers utilisés pour les expériences de RT-qPCR 262
Tableau S 2. Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot et d'immunofluorescence 263
Tableau S 3. Liste des agents pharmacologiques utilisés pour les expériences d'imagerie dynamique 264

INTRODUCTION GENERALE

I. Structure des artères de gros et moyen calibre

Le système cardio-vasculaire fait circuler le sang dans tout l'organisme et permet le maintien de l'homéostasie en assurant l'acheminement de dioxygène, de nutriments et d'hormones à l'ensemble des cellules de l'organisme, ainsi que la clairance du dioxyde de carbone et des déchets métaboliques. Il est constitué de deux groupes de vaisseaux distincts : les artères et artérioles formant le système artériel et les veines et veinules formant le système veineux, ces deux systèmes étant reliés par les capillaires au sein des organes. Le système artériel transporte le sang riche en oxygène du cœur (à l'exception de l'artère pulmonaire) vers les tissus alors que le système veineux transporte le sang appauvri en oxygène (à l'exception de la veine pulmonaire) des tissus vers le cœur.

I.1. Le système artériel

Trois types d'artères sont décrites du plus grand au plus petit diamètre : les artères élastiques, les artères musculaires et les artérioles.

Les artères élastiques correspondent aux vaisseaux de gros calibre dont le diamètre est compris entre 1 et 2 cm et présentent une paroi épaisse et riche en fibres élastiques (40%). Leur élasticité accrue leur permet de résister aux variations de pression artérielle induites par l'onde cardiaque et de transformer les pulsations en débit continu. Ainsi les artères les plus proches du cœur et à la fois les plus grandes de l'organisme (aorte, artères pulmonaires ou encore carotides) sont des artères élastiques.

Les artères musculaires correspondent aux vaisseaux de petits et moyens calibres dont le diamètre est compris entre 1 et 100mm, et leur paroi est riche en cellules musculaires lisses vasculaires ou CMLV. Elles assurent la liaison entre les artères élastiques et les artérioles, régulant ainsi le débit sanguin tissulaire.

Les artérioles, sont des vaisseaux très fins, d'un diamètre compris entre 30 et 100µm en moyenne. La structure de leur paroi est similaire à celle des artères musculaires, mais l'épaisseur de chaque tunique est réduite. Elles assurent la transition avec les capillaires et permettent de réduire le débit sanguin à ce niveau, en raison de leurs petits diamètres qui augmente les résistances.

I.2. Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle est organisée en trois couches concentriques : *intima, média et adventice* (*Figure I1*), de la lumière vers la périphérie.

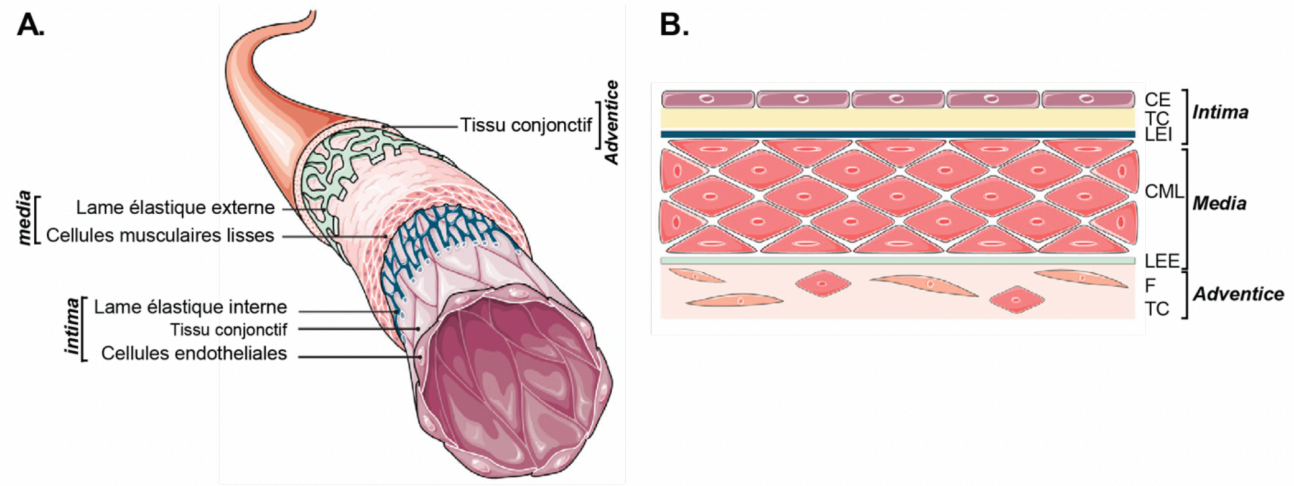


Figure I 1.Représentation schématique de la paroi artérielle

(A) Schéma d'une artère et de ses composants cellulaires. **(B)** Schéma de la structure fine des tuniques de la paroi. **CE** : Cellules endothéliales, **TC** : tissu conjonctif, **LEI** : limitante élastique interne, **CML** : cellules musculaires lisses, **LEE** : limitante élastique externe, **F** : Fibroblastes. D'après (Gueguen et al. 2016)

L'intima, ou endothélium vasculaire tapisse la face luminale des vaisseaux. Elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur un espace sous-endothélial correspondant à du tissu conjonctif lâche. L'endothélium via la sécrétion de diverses molécules joue un rôle central dans l'homéostasie vasculaire et la contractilité des CMLV. Une lamina élastique interne sépare l'intima de la média.

La média est la couche centrale et généralement la plus épaisse de la paroi vasculaire. Elle est composée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), elles-mêmes entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en collagène, élastine et protéoglycanes. Sa composition riche en CMLV lui confère un rôle majeur dans la régulation de la contractilité, de la pression artérielle et donc dans le maintien du flux sanguin. Le ratio entre fibres élastiques et CMLV de cette couche détermine le type d'artère : élastique ou musculaire. Une lamina élastique externe sépare la média de l'adventice.

L'adventice, la couche la plus externe, est constituée d'un tissu conjonctif lâche contenant majoritairement des fibroblastes et des fibres de collagène. L'adventice contient également un réseau de nerf appelé « *nervi vasorum* » responsable de l'innervation des

CMLV (contrôlée par le système nerveux autonome) et un réseau de micro-vaisseaux nourriciers « *vasa vasorum* » dont le rôle est d'assurer l'acheminement des nutriments et du dioxygène aux couches les plus éloignées de la circulation sanguine.

S'il est admis que la majorité des artères partagent une structure commune de leur paroi, au fil des années des différences ont tout de même été mises en évidences entre les différents territoires vasculaires. Les artères cérébrales intracrâniennes, par exemple, sont dépourvues de lamina élastique externe et leur couche médiale peut être discontinue créant ainsi des « médials gaps» (Frösen and Joutel 2018). Les conséquences que peuvent avoir ces différences structurelles sur l'élasticité ou les propriétés contractiles des artères ne sont pas encore connues.

I.3. Principaux types cellulaires composant la paroi

I.3.1. *Cellules endothéliales*

L'endothélium est bien plus qu'une barrière entre le sang et les tissus, il est considéré aujourd'hui comme un organe avec une fonction endocrine à part entière dont les effets sont multiples. Il garantit l'homéostasie vasculaire en interagissant avec les cellules et molécules circulantes ainsi qu'avec les CMLV présentes dans la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales (CE) sont des cellules polarisées, fines et allongées (Krüger-Genge *et al.* 2019).

La barrière endothéliale

La paroi vasculaire forme une barrière sélective pour le transport de molécules entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales sont interconnectées par trois types de jonctions assurant à la fois l'adhérence intercellulaire et la perméabilité de l'endothélium aux fluides, molécules et cellules immunitaires : les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence et les jonctions gap (Michiels 2003). Les cellules endothéliales, associées à d'autres types cellulaires vont former des structures spécifiques de l'interface sang/organe, comme au niveau du corpuscule rénal ou de la barrière hémato-encéphalique ; cette dernière sera présentée ultérieurement dans le manuscrit (voir Partie 2 du manuscrit partie III.2.2d).

Régulation du tonus vasculaire

Les cellules endothéliales en interagissant avec les cellules musculaires lisses régulent le tonus vasculaire. En effet, l'intégration de stimuli environnementaux (PA, hypoxie, …) et les forces de cisaillement exercées sur l'endothélium, modulent la synthèse et la libération de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs qui vont directement ou indirectement réguler la contractilité des CMLV.

L'endothélium sécrète plusieurs substances vasodilatatrices permettant la relaxation des CMLV. En 1980, Furchgott et Zadwadzki ont mis en évidence le rôle indispensable des cellules endothéliales dans la relaxation des CMLV induite par l'acétylcholine, cela grâce à la sécrétion de ce qu'ils ont appelé EDRF « Endothelial derived relaxing factor » (Furchgott and Zawadzki 1980). Cet EDRF a ensuite été décrit sept ans plus tard comme étant l'oxyde nitrique (NO) (Palmer *et al.* 1987). Le NO produit par la NO-Synthase endothéliale (eNOS) diffuse vers les CMLV, active la guanylyl cyclase soluble (GCs) et stimule la production de guanosine 3'5'-monophospahte cyclique (GMPc), entrainant ainsi la relaxation des CMLV. Un autre agent vasodilatateur est sécrété par l'endothélium : la prostacycline (PGI_2) qui est un dérivé de l'acide arachidonique. La PGI_2 active des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) couplés Gαs sur les CMLV qui stimulent les adenylyls cyclases (AC) et ainsi la production d'adénosine 3'5'-monophosphate cyclique (AMPc), aux fonctions vasodilatatrices. Les cellules endothéliales génèrent également un facteur hyperpolarisant (EDHF), qui prendrait le relai lorsque la voie du NO est indisponible, sa contribution reste à ce jour encore discutée (Garland and Dora 2017). La production de NO est constitutive mais peut être potentialisée par une stimulation à l'acétylcholine, l'angiotensine II, l'histamine ou encore l'adénosine. Il en est de même pour la PGI_2 dont la production peut être potentialisée par la thrombine, l'acide arachidonique, l'histamine ou encore la sérotonine (Krüger-Genge *et al.* 2019).

L'endothélium est également capable de sécréter des agents vasoconstricteurs qui sont appelés EDCF « *Endothelial derived contracting factors* ». Le principal EDCF est l'endothéline, produite *de novo* en réponse à l'hypoxie, aux forces de cisaillement ou encore à des substances telles que la thrombine, l'angiotensine II ou les cytokines. Elle produit un effet contractile durable en activant des récepteurs couplés Gαq qui stimulent l'augmentation de calcium intracellulaire (Krüger-Genge *et al.* 2019). Tous les EDCF libérées par les cellules

endothéliales n'ont pas été clairement identifiés mais parmi eux on retrouve l'angiotensine II, les prostanoïdes (PGH2, Thromboxane A2) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Tang and Vanhoutte 2009).

Régulation de la coagulation

En condition physiologique, les cellules endothéliales sont impliquées dans les mécanismes anticoagulants et anti-thrombotiques. Elles sécrètent de manière constitutive deux agents antiplaquettaires : le NO et la PGI_2, dont la sécrétion peut être potentialisée pour limiter la formation de thrombi. Les cellules endothéliales assurent également la fluidité sanguine en stimulant une des voies anticoagulantes la plus importante, la voie protéine C/protéine S. Lorsque la thrombine se lie au récepteur endothélial thrombomodulin, la protéine C s'active, s'associe à la protéine S (synthétisée par les CE) et inactive à son tour des facteurs pro-coagulants. Lors d'une lésion ou d'une exposition à des molécules pro-inflammatoires, l'augmentation de facteurs pro-coagulants peuvent conduire à un changement phénotypique des cellules endothéliales qui adoptent un phénotype pro-thrombotique à leur tour (Michiels 2003).

Implication dans l'immunité

Les cellules endothéliales participent activement à l'immunité innée et adaptative (Shao *et al.* 2020). Il a été montré entre autres, qu'une exposition à des stimuli pro-inflammatoires tels que TNFα ou l'IL-1β, conduit à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales, ainsi qu'à une altération des jonctions endothéliales modifiant la perméabilité transcellulaire en déstructurant les protéines d'échafaudage de type zonula occludens (ZO), claudines, occludines. Ces mécanismes vont favoriser le recrutement, le roulement et l'internalisation des leucocytes activés dans l'espace sous-endothélial, participant à la mise en place d'une inflammation chronique ou aigue localisée, mécanisme clé dans le développement de pathologies comme l'athérosclérose (McQueen and Warboys 2023) ou l'épilepsie (Uprety *et al.* 2021), mais aussi dans la composante inflammatoire de la maladie d'Alzheimer (Custodia *et al.* 2023).

I.3.2. *Cellules musculaires lisses vasculaires*

Les CMLV organisées en couches concentriques dans la média de la paroi artérielle, sont des cellules mononuclées, généralement fusiformes et relativement allongées avec une longueur comprise entre 15 et 500µm et un diamètre variant entre 2 et 5µm, selon le tissu. Elles sont liées par une matrice extracellulaire (MEC) composée d'élastine, de collagène (type I et III) et de protéoglycanes, qu'elles produisent elle-même et qui participe au maintien de l'intégrité structurelle du vaisseau. À un stade de différenciation avancée ces cellules quiescentes, expriment un large répertoire de protéines contractiles spécifiques et d'autres molécules, qui constituent leur identité phénotypique, leur permettant d'assurer leur fonction contractile (Owens *et al.* 2004a). Ces cellules dotées d'un fort potentiel contractile modulent le tonus vasculaire, élément clé de la régulation de la pression artérielle et du débit sanguin.

a) Origine embryonnaire et territorialité

Les cellules musculaires lisses vasculaires ont des origines embryonnaires diverses et proviennent d'au moins sept sources différentes chez les embryons de vertébrés. Ces sources comprennent la crête neurale, le mésoderme latéral, le mésoderme para-axial, les somites, le proépicarde, les cellules souches mésenchymateuses. De nombreuses études discutent de l'implication que pourrait avoir une telle diversité d'origine des CMLV dans les pathologies vasculaires (Majesky 2007a; Pfaltzgraff and Bader 2015; Wang *et al.* 2015).

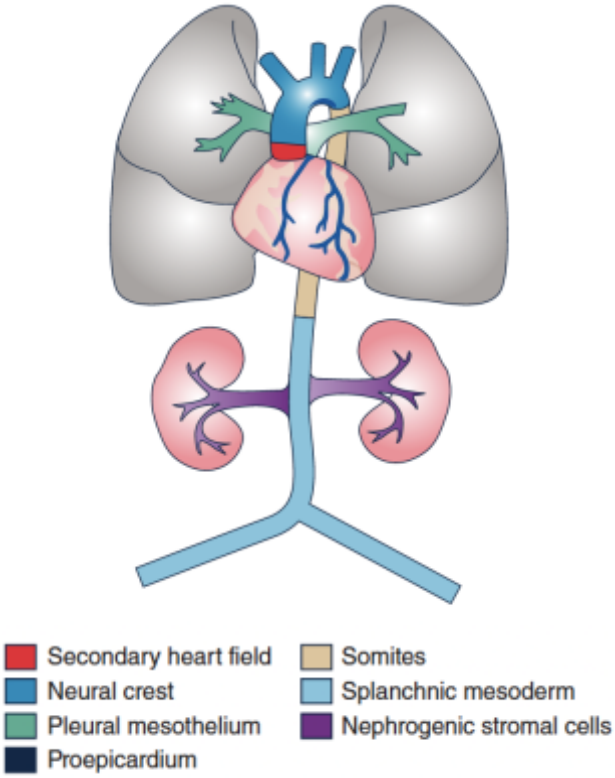


Figure I 2.Représentation des différentes origines embryonnaires des CMLV par territoire vasculaire

Chaque couleur représente l'origine embryonnaire des CMLV de cette région (Wang *et al*, 2015).

Il a longtemps été considéré que les CMLV sont identiques peu importe l'origine, pourtant il existe de nombreuses différences entre les cellules issues de différents territoires vasculaires et parfois même de segments différents d'une même artère (Archer 1996). Une étude a d'ailleurs montré qu'en réponse à une hypoxie, on observait une vasoconstriction des artères pulmonaires alors que les artères cérébrales ou rénales répondaient par une vasodilatation, témoignant d'une différence inter-territoriale. Il a également été observé, toujours en réponse à une hypoxie, que la taille des CMLV des sections importantes de l'artère pulmonaire (>800µm) ne variait que très peu, alors que celle des CMLV des sections moyennes ou petites de l'artère pulmonaire (200-600µm) présentaient une réduction de taille de l'ordre de 20%, témoignant cette fois d'une différence intra-territoriale (Madden *et al.* 1992a).

Cette variabilité des CMLV affecte tout autant la morphologie, la sensibilité aux vasomodulateurs, l'expression de protéines contractiles ou des isoformes de protéines, que

l'expression des canaux potassiques et pourrait justifier que la réponse d'une artère à un même stimulus varie selon le lit vasculaire d'origine (Archer 1996).

b) Marqueurs phénotypiques

Le statut phénotypique des CMLV, comme le suivi de leur état de différenciation, a longtemps était compliqué puisque les CMLV partagent un grand nombre de leurs marqueurs phénotypiques avec d'autres types cellulaires (Fibroblastes, Cardiomyocytes) et que plusieurs phénotypes de CMLV (voir partie II de l'introduction générale) peuvent exister en condition physiologique ou pathologique. Cependant, un certain nombre de marqueurs protéiques (contractiles ou non contractiles) spécifiques de l'état différencié et mature des CMLV a pu être identifié (Owens *et al.* 2004a).

L'α-actine

L'actine est le composant majeur de l'appareil contractile. Parmi les six isoformes d'actine retrouvée chez les mammifères quatre sont exprimées dans les CMLV matures : l'α-actine du muscle lisse, la β-actine non musculaire, la γ-actine du muscle lisse et la γ-actine non musculaire, présentant toutes un poids moléculaire d'environ 42kDa. L'α-actine, dont l'expression augmente au cours du développement, est l'isoforme la plus abondante dans les CMLV matures et c'est aussi la protéine majoritaire des CMLV (40% des protéines totales). Cependant, elle n'est plus considérée comme un marqueur spécifique à part entière puisqu'elle est exprimée transitoirement par d'autres cellules d'origine mésodermale lors de la réparation tissulaire par les myofibroblastes, ou encore durant le développement du muscle cardiaque et squelettique (Ostrom *et al.* 2002).

La SM-MHC

La myosine est le deuxième composant majeur de l'appareil contractile. Il s'agit d'un hexamère formé par deux chaines lourdes nommées MHC (*myosin heavy chain*) et deux paires de chaines légères nommées MLC (*myosin light chain*), l'une de 17kDa non phosphorylable (MLC_{17}) et l'autre de 20 kDa phosphorylable et régulatrice de l'activité contractile (MLC_{20}). De nombreuses isoformes de ces sous unités ont été identifiées et sont exprimées par les CMLV (Rovner *et al.* 1986). On distingue des isoformes non musculaires

de la myosine : NM-MHC A et NM-MHC B et des isoformes de la myosine du muscle lisse nommées SM-MHC : SM1 et SM2. Les isoformes de SM-MHC, SM1 et SM2, sont codées par un unique gène MYH11 et ne sont exprimées par aucun autre type cellulaire vasculaire ce qui en fait aujourd'hui un des meilleurs marqueurs du phénotype différencié des CMLV (Nagai *et al.* 1989; Ostrom *et al.* 2002).

Autres protéines contractiles : SM-22α et calponine

La SM22 (Smooth Muscle 22) est une protéine du cytosquelette de 22kDa très abondante et dont l'expression est particulièrement spécifique aux CMLV (Shanahan *et al.* 1993). L'isoforme SM-22α est la plus répandue et peut parfois être retrouvée sous le nom de Transgelin. Son expression est tardive au cours du développement embryonnaire, ce qui en fait un marqueur idéal pour les CMLV différenciées matures (Morgan and Gangopadhyay 2001). Parmi les autres marqueurs, on retrouve **la calponine,** une autre protéine du cytosquelette de 30kDa qui régule la contraction des CMLV en interagissant avec les filaments d'actine (F-actin) et la tropomyosine.

Protéine non contractiles exprimées dans les CMLV

Des protéines non contractiles sont également exprimées par les CMLV et peuvent servir de marqueurs de transition des CMLV vers un phénotype synthétique (migratoire et prolifératif) lorsque leur niveau d'expression varie (Rensen *et al.* 2007). On peut citer la **caldesmone** qui régule la contraction par liaison à l'actine ou encore la **vinculine** localisée au niveau des jonctions cellulaires dont l'isoforme γ est sélectivement exprimée dans le muscle cardiaque et le muscle lisse (Ostrom *et al.* 2002).

II. Mécanismes de régulation de la contractilité des CMLV

Les cellules musculaires lisses vasculaires en modulant le tonus vasculaire, c'est-à-dire en se contractant ou en se relaxant, permettent le maintien d'un débit sanguin constant tout au long de l'arbre artériel. Par ailleurs, la structure de l'appareil contractile et les mécanismes initiant la contraction des CMLV diffèrent grandement de ceux du muscle cardiaque, puisque que la contraction vasculaire doit être tonique, soutenue et lente. L'appareil contractile des CMLV est constitué de filaments d'actine et de myosine qui à la différence du muscle cardiaque ne sont ni organisés en bandes distinctes ni régulés par la troponine. C'est l'état de phosphorylation de la chaine légère de myosine (MLC_{20}) qui détermine l'état de contractilité des CMLV. La MLC_{20} lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase de la chaine légère de myosine (*MLCK*) se lie à l'actine et l'énergie libérée par l'activité ATPase de la myosine alimente le glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine entrainant la contraction de la CMLV. A l'inverse, lorsqu'elle est déphosphorylée par la phosphatase de la chaine légère de myosine (*MLCP*), l'interaction actine-myosine est rompue et provoque la relaxation de la cellule (*Figure I3*). Il existe un ensemble de mécanismes qui vont directement ou indirectement modifier l'activité de la MLCP et la MLCK et ainsi moduler l'état de contractilité de la cellule (Webb 2003; Liu and Khalil 2018). Une représentation schématique de l'ensemble des acteurs impliqués dans les mécanismes de contraction/relaxation de la CMLV est présentée en *figure I4*.

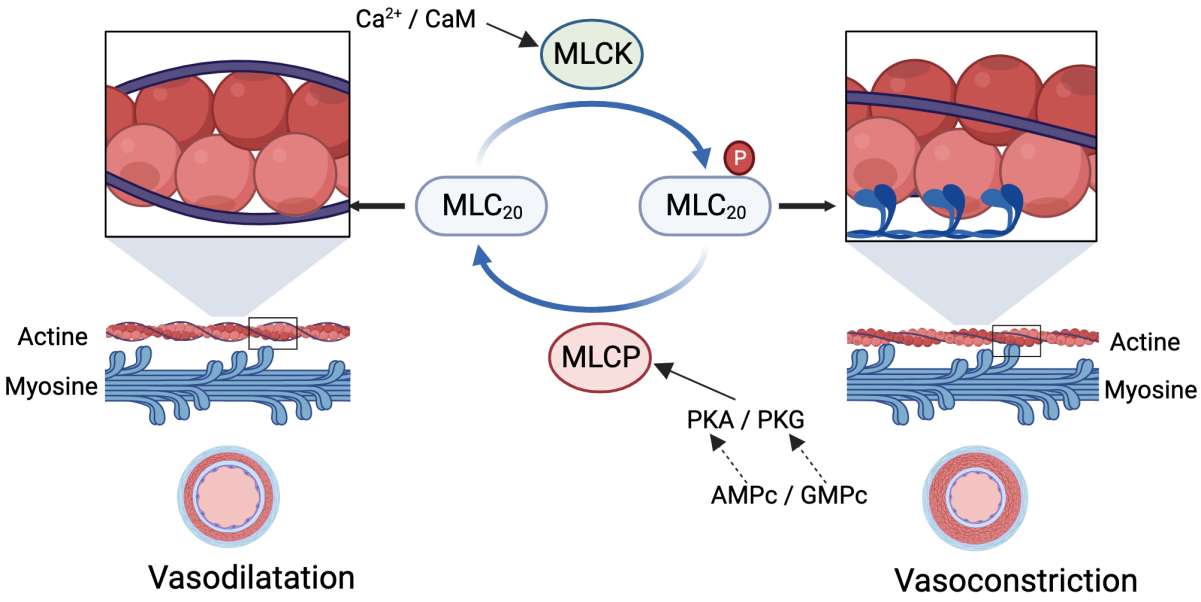


Figure I 3. Régulation de la phosphorylation de la MLC20

Ca^{2+}/CaM : complexe Ca^{2+}/calmoduline, **MLC20** : chaine légère de la myosine phosphorylable, **MLCK** : kinase de la chaîne légère de la myosine, **MLCP** : phosphatase de la chaîne légère de la myosine, **P** indique une phosphorylation.

II.1. Voies de contraction des CML

II.1.1. *Contraction dépendante du calcium*

En condition physiologique et en absence de tout stimulus, la concentration en calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ dans le cytosol de la CMLV est très faible (environ 100nM) , alors qu'elle est plus élevée dans le réticulum endoplasmique (RE) (10 à 15mM) et dans le milieu extracellulaire (1 à 2mM). Une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, est le principal signal déclencheur de la contraction. Le calcium s'associe à la calmoduline, ce qui active la MLCK qui à son tour phosphoryle la MLC20 et induit la contraction. Cette élévation de la concentration cytosolique en calcium peut être initiée par deux mécanismes distincts mais agissant en synergie : *l'initiation électro-mécanique* ou *la pharmaco-mécanique.*

a) Contraction suite à une initiation électro-mécanique

L'initiation électro-mécanique, repose sur un influx de calcium extracellulaire via les canaux calciques voltages dépendants ou VGCC (*voltage-gated calcium channels*) lors d'une dépolarisation de la membrane plasmique. Même si les CMLV ne génèrent pas de potentiel

d'action, leur potentiel de membrane (environ -45 mV) peut être dépolarisé (Vm max= -30 mV) ou hyperpolarisé (Vm max= -60mV) en réponse aux forces exercées par une variation de la PA et ainsi induire une contraction ou une relaxation (Harraz and Jensen 2021). Cette capacité des CMLV à s'adapter à un changement de pression intraluminale est appelée réponse myogénique et été mise en évidence par W.M. Bayliss en 1902 (Bayliss 1902). La modulation du potentiel de membrane est donc très importante dans la régulation du tonus vasculaire, puisqu'une seule dépolarisation de 3mV suffit à doubler l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendants de type L (*LTCC : L-type calcium channel*). Le potentiel de membrane est modulé par les canaux potassiques K^+ et chlore Cl^-, dont l'ouverture est contrôlée par le calcium intracellulaire, qui respectivement, vont conduire à une hyperpolarisation ou une dépolarisation de la membrane.

Cependant les principaux acteurs de la réponse myogénique et donc de l'influx de Ca^{2+} sont les canaux calciques voltages dépendants. L'influx calcique se fait principalement via les canaux voltage dépendants de type L Cav1.2, caractérisés par un seuil d'activation élevé (-30mV) et une inactivation lente (>500ms) (Knot and Nelson 1998). D'autres canaux voltage dépendants sont également exprimés par les CMLV et participent aussi à cet influx calcique, il s'agit des canaux de type T Cav3 (*T : Transient*) caractérisés par un seuil d'activation beaucoup plus faible et une activation/inactivation rapide. Plus de détails sur les canaux calciques seront donnés dans la partie IV.3 de l'introduction générale.

b) Contraction suite à une initiation pharmaco-mécanique

L'initiation pharmaco-mécanique, résulte de l'activation des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (*RCPG*) de la famille Gαq/11 par des agents vasoconstricteurs qui en se fixant sur ces récepteurs, activent la voie de la phospholipase C (PLC) et déclenche la libération de Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires du réticulum endoplasmique *(RE*). Plus précisément, la phospholipase C hydrolyse le phosphatidyl-inositol 4,5 bi-phosphate (*PIP_2*) en inositol 1,4,5 triphosphate (*IP_3*) et diacylglycérol (*DAG*). L'IP_3 se fixe aux canaux-récepteurs à l'IP_3 (*IP_3R*) sur le RE, qui sont organisés en tétramères (formant un canal fermé) qui liés à l'IP_3 changent de conformation et permettent la libération de calcium vers le cytosol. Le DAG quant à lui recrute la PKC (*protéine kinase C*) dans l'espace sous-membranaire qui va être activée par la fixation de

Ca^{2+}. La PKC va phosphoryler de nombreux substrats, dont les canaux calciques de type L et provoquer un influx de calcium dans la cellule (Harraz and Jensen 2021).

II.1.2. *Contraction par sensibilisation au calcium*

Un autre mécanisme majeur de régulation de la contraction indépendant de l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ a été mis en évidence en 2003 et a été nommé *sensibilisation de l'appareil contractile au calcium*. Ce mécanisme est décrit comme une augmentation de la contraction n'impliquant ni une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, ni une augmentation de la phosphorylation de la MLC_{20} (Kitazawa *et al.* 2003), mais impliquant l'inhibition de la MLCP (Somlyo and Somlyo 2003). La MLCP peut être inhibée par trois mécanismes (Kitazawa *et al.* 2003) :

- Par une activation de la Rho Kinase (*ROCK*) suite à sa liaison avec la petite protéine G RhoA : ROCK peut alors phosphoryler la sous unité régulatrice de la MLCP (*MYPT1 : Myosine phosphatase target subunit 1*) ou la MLC_{20} (sur le même site que la MLCK).
- Par une activation de la Rho Kinase (*ROCK*) indépendamment de sa liaison avec la protéine RhoA : ROCK est activée par l'acide arachidonique (*AA*).
- Par une activation de la PKC qui va phosphoryler la protéine CPI-17 (inhibiteur de l'activité de la MLCP) ou la sous unité régulatrice MYPT1.

II.2. Voies de relaxation des CMLV

La relaxation des CMLV résulte de l'arrêt d'un stimulus contractile, ou de l'action directe d'inhibiteurs des mécanismes de la contraction. En opposition avec le mécanisme de contraction, la relaxation requiert entre autres une activation de la MLCP et une diminution du niveau de calcium intracellulaire, généralement consécutives à une élévation des niveaux intracellulaires des nucléotides cycliques AMPc et GMPc. L'AMPc est produit suite à l'activation de RCPG couplé Gαs et le GMPc est produit suite à la libération de NO par les cellules endothéliales. Consécutivement, ces deux seconds messagers activent leur protéines kinases respectives PKA et PKG, qui phosphorylent de nombreux substrats et assurent au travers des trois mécanismes distincts suivants la relaxation des CMLV (Morgado *et al.* 2012a) : la diminution des niveaux intracellulaire de calcium, l'hyperpolarisation de la membrane plasmique et la diminution de la phosphorylation de la MLC_{20}.

II.2.1. *La diminution des niveaux intracellulaires de calcium*

L'activation de la pompe SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase*), située sur la membrane du RE, permet le repompage du calcium cytosolique libéré lors de la contraction vers le RE. La phosphorylation par la PKA ou la PKG lève l'inhibition exercée par le phospholamban (PLB) et active SERCA (Cornwell *et al.* 1991).

L'inhibition de la libération de calcium depuis le RE suite à la phosphorylation inhibitrice par la PKG principalement de la protéine IRAG associée au récepteur canal à l'IP3 (Lincoln *et al.* 1994).

L'augmentation de l'efflux calcique via la phosphorylation par la PKA, la PKG ou la PKC de la pompe calcique transmembranaire PMCA (*Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase*) et par l'activation de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX) par le GMPc (Marín *et al.* 1999).

La diminution de l'influx de Ca^{2+} extracellulaire par les canaux voltages dépendants de type L ou T suite à leur inhibition par la PKA ou la PKG (Liu *et al.* 1997).

II.2.2. *L'hyperpolarisation de la membrane plasmique*

L'activation de canaux potassiques K^+ par l'AMPc, le GMPc via la PKA et la PKG respectivement, entraine un efflux de Ca^{2+} qui hyperpolarise la membrane et provoque également la fermeture des canaux calciques voltage dépendants ce qui diminue d'autant plus le $[Ca^{2+}]_i$. Quatre types de canaux potassiques sont exprimés par les CMLV : les canaux potassiques voltage dépendants K_V (*Voltage gated channel*), les canaux potassiques activés par le Ca^{2+} et la dépolarisation BK_{Ca} (*Large conductance Ca^{2+}-activated channels*), les canaux potassiques sensibles à l'ATP K_{ATP} (*ATP-sensitive K^+ channels*) et les canaux potassiques rectificateurs entrants K_{IR} (Inward rectifier K^+ Channels) (Ko *et al.* 2008).

II.2.3. *La diminution de la phosphorylation de la MLC_{20}*

La diminution de la phosphorylation de la MLC_{20} est initiée soit par une inhibition de le MLCK soit par une activation de la MLCP. L'inhibition de la MLCK résulte d'une phosphorylation inhibitrice par la PKA de son domaine de liaison à la calmoduline, diminuant ainsi son affinité pour le complexe Ca^{2+}/CaM et donc son activation (Stull *et al.* 1993). Quant

à l'activation de la MLCP elle fait suite à une phosphorylation de la sous unité régulatrice MYPT1 par la PKG (Nakamura *et al.* 2007).

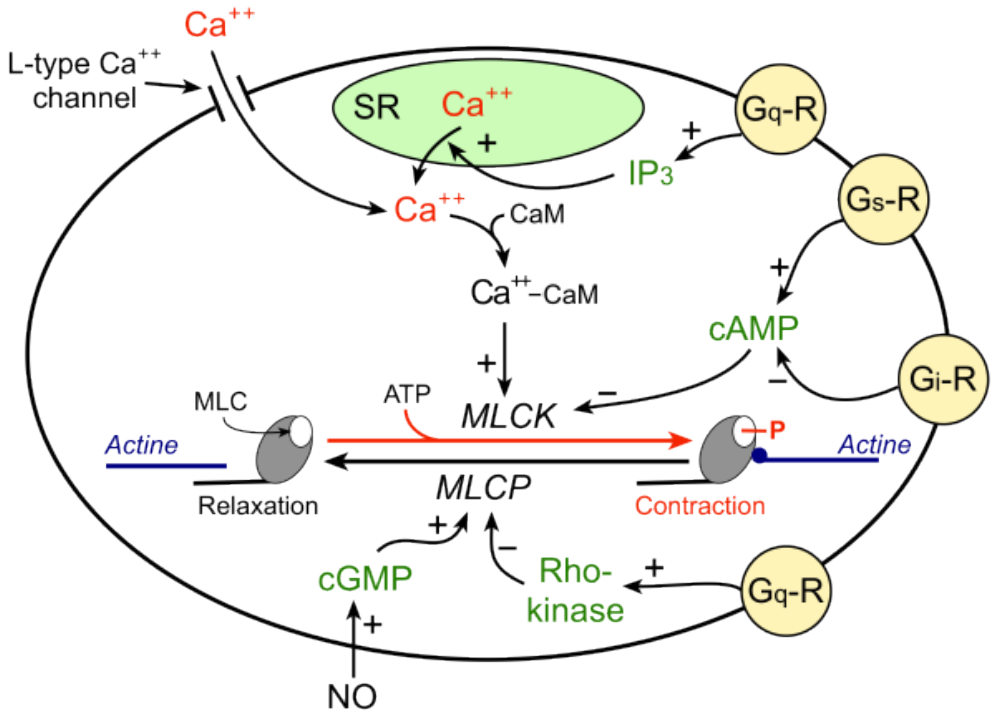


Figure I 4. Représentation schématique non exhaustive des acteurs impliqués dans la contraction et la relaxation des CMLV

III. Transition phénotypique des CMLV et remodelages vasculaires

III.1. Différents phénotypes des CMLV

Les CMLV possèdent une grande capacité d'adaptation, et contrairement à d'autres cellules contractiles elles peuvent changer de phénotype en réponse à des modifications de leur environnement, passant d'un phénotype quiescent et contractile à un phénotype migratoire et prolifératif (Ostrom *et al.* 2002). Cette capacité bénéfique et hors norme des CMLV devient souvent l'élément déclencheur de nombreuses pathologies vasculaires. Pendant longtemps la classification des CMLV a été réduite à deux états : contractile ou synthétique selon leur niveau d'expression des marqueurs contractiles (*Figure I5*).

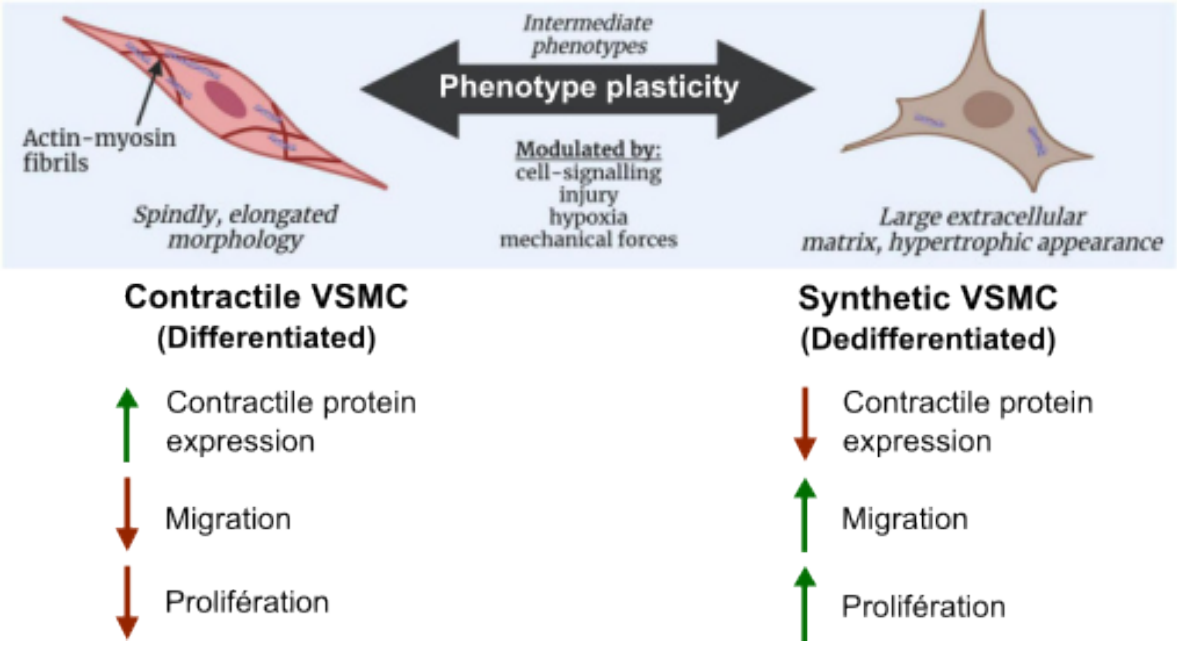


Figure I 5.Plasticité des CMLV : phénotype contractile et synthétique

D'après (Hayes *et al.*2022)

Parmi les facteurs contribuant à cette transition phénotypique (ou transdifférenciation) on retrouve les facteurs métaboliques (LDL, *low density lipoprotein*) et inflammatoires (IL1β, TNFα, etc), les facteurs de transcription (SRF, MYOCD) contrôlant l'expression des marqueurs contractiles, les facteurs de croissance tels que le TGFβ ou le PDGF-BB, les composants de la MEC ou encore le niveau intracellulaire d'AMPc.

Aujourd'hui, les phénotypes contractile et synthétique sont considérés comme les deux extrémités d'un spectre phénotypique dans lequel on peut distinguer 5 phénotypes que les CMLV acquièrent afin de s'adapter à leur environnement (Yap *et al.* 2021):

- **Mesenchymal like** : Caractérisé par une capacité à proliférer et à s'auto-renouveler associée à une réduction de l'expression des protéines contractiles.
- **Fibroblast-like** : Caractérisé par l'acquisition des propriétés fibroblastiques, à savoir des propriétés matrigéniques parmi lesquelles la capacité à produire des protéines de la MEC (collagène type 1α1, protéoglycanes, élastine) et qui interviennent dans la réparation des tissus.
- **Macrophage-like** : Caractérisé par une activité macrophagique (recrutement des cellules immunitaires et activité phagocytaires) et par l'expression de protéines de surface similaires (CD11b, CD68, LGALS3).
- **Osteogenic-like** : Caractérisé par une similitude avec les ostéoblastes et une expression de marqueurs ostéogéniques (RUNX2, SOX9, MSX2, osteopontine, Collagène type II et X, etc).
- **Adipocyte-like** : Caractérisé par l'acquisition de marqueurs adipocytaires tels que UCP1 ou PPARγ. Ce phénotype apparait souvent suite à la phagocytose de LDL oxydés (LDL-ox) par les CMLV, il est parfois considéré comme une évolution du phénotype macrophage-like.

Malgré leurs spécificités propres, ces différents phénotypes présentent tous une diminution d'expression des protéines contractiles.

III.2. Remodelages vasculaires de la physiologie à la pathologie

Les artères subissent des contraintes mécaniques exercées par le flux sanguin, mais peuvent également être agressées biochimiquement par des facteurs circulants, le tout causant des dommages vasculaires. En condition physiologique, après une lésion les CMLV changent spontanément de phénotype afin de permettre la réparation du vaisseau puis reviennent vers un phénotype contractile une fois la réparation terminée, ce processus est appelé remodelage vasculaire. Parfois, le contexte environnemental empêche ce retour à la normale et ce processus de transition phénotypique ou de remodelage vasculaire devient pathologique. De nombreux facteurs environnementaux peuvent contribuer à la transition phénotypique des CMLV (pour revue voir (Cao *et al.* 2022)) :

- Les facteurs métaboliques circulants tels que les LDL oxydés (oxydized *Low Density Protein ou LDL-ox*) et les ELDL (*Enzyme modified non oxydative LDL)* qui peuvent induire un phénotype ostéogénique et contribuer à la calcification vasculaire en augmentant respectivement l'expression de TLR4/NF-Kb, TGF-β et RUNX2 ou DMP-1, SPP1, SP7, et BMP2. Les LDL-ox et les ELDL peuvent également contribuer à l'acquisition d'un phénotype adipocyte-like. Les AGEs (*Advanced Glycation end-products*) peuvent aussi contribuer à la transition phénotypique des CMLV.
- Les facteurs de croissance tel que le PDGF-BB (*Platelet Derived Growth Factor BB*) ou les cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL1β (*Interleukine 1β*), qui sont d'ailleurs souvent utilisés pour induire la transdifférenciation des CMLV dans les études *in vitro*.
- Les molécules du système immunitaire en s'infiltrant dans la paroi des vaisseaux peuvent induire la transition vers un phénotype synthétique. Notamment via la liaison de CD137 (membre des récepteurs au TNFα) à la protéine NFATc1 ou via l'activation du système du complément (complément C3), qui inhibent l'expression des protéines contractiles des CMLV. On retrouve également l'inflammasome NLRP3 et sa capacité à induire la production d'IL1β.
- Les facteurs de transcription régulant l'expression des protéines contractiles, parmi lesquels on retrouve KLF4, RUNX2 ou encore SOX9. Le facteur KLF4 est le plus connu car il est impliqué dans la transformation des CMLV contractiles vers la plupart des phénotypes synthétiques aujourd'hui identifiés et de nombreuses études sont

menées à ce sujet (Yap *et al.* 2021). Par ailleurs, il a été démontré que KLF4 en modulant la transdifférenciation des CMLV joue un rôle clé dans le développement des plaques d'athérosclérose (Shankman *et al.* 2015).

L'implication de la transdifférenciation des CMLV sous l'influence des facteurs environnementaux est un mécanisme plus ou moins bien reconnu dans de nombreuses pathologies cardio- et neurovasculaires. Entre autres, on peut citer les anévrismes aortiques du syndrome de Marfan (Neptune *et al.* 2003), l'athérosclérose (Gueguen *et al.* 2016a; Bennett *et al.* 2016), l'hypertension systémique et pulmonaire (Hishikawa *et al.* 1994; Yang *et al.* 2005) ou les micro-angiopathies cérébrales (Tikka *et al.* 2009; Fouillade *et al.* 2012). Par ailleurs, un ou plusieurs phénotypes de CMLV peuvent être impliqués dans ces pathologies. Par exemple au cours du vieillissement, la calcification vasculaire est caractérisée par la présence de CMLV de phénotype osteogenic-like uniquement, alors que la formation de la plaque d'athérosclérose est initiée par des CMLV fibroblast-like et est ensuite entretenue par tous les autres phénotypes (Cao *et al.* 2022). De nos jours, il est donc devenu essentiel d'étudier et comprendre les mécanismes moléculaires ou génétiques initiant cette transdifférenciation. Plusieurs études s'intéressent par exemple aux régulations transcriptionnelles de ces transitions phénotypiques, et à l'aide d'analyse par RNAseq de multiples acteurs et donc cibles potentielles sont identifiés, le plus connu étant le facteur de transcription KLF4 évoqué précédemment (Yap *et al.* 2021). Au niveau signalisation, ce sont les voies AMP cyclique et calcique ainsi que leur effecteurs (AC, PDE, etc) qui commencent à être étudiées (Vallin *et al.* 2018; Reynolds *et al.* 2004; Rodenbeck *et al.* 2017; Nagel *et al.* 2006), ainsi que les facteurs de croissance tels que le TGF-β, le FGF, l'IGF-1 ou le PDGF (Owens *et al.* 2004b; Cai *et al.* 2015; Risinger *et al.* 2006).

Les études sur la transition phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires non seulement nous éclairent sur un nouveau mécanisme impliqué dans les maladies vasculaires, mais elles mettent également en lumière une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

IV. Réceptivité des CMLV et voies de signalisation AMPc et calcique

La cellule musculaire lisse vasculaire est le centre intégrateur des signaux environnementaux. Elle dispose de nombreux récepteurs lui permettant de transmettre le signal perçu et de moduler la réponse cellulaire de manière adéquate afin de s'adapter à son environnement. Parmi ces récepteurs, les plus importants sont les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G communément appelé RCPG, qui régulent les deux principales voies de signalisation permettant aux CMLV d'exercer leurs fonctions : il s'agit des voies AMPc et calcique.

IV.1. RCPG

IV.1.1. *Structure et activation*

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) font partie de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (R7TM). Chez l'Homme il existe cinq grandes familles de RCPG regroupant plus de 800 récepteurs. Dans notre étude, notre intérêt se porte sur les RCPG de la famille 1 puisqu'elle regroupe les principaux récepteurs hormonaux, exprimées dans les CMLV et impliqués dans les voies de signalisations étudiées (*Figure I 6*) (Bockaert and Pin 1999).

Les RCPG possèdent sept segments transmembranaires en hélices α (TM1 à TM7), connectés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Leur extrémité N-terminale est toujours extracellulaire et leur extrémité C-terminale est intracellulaire. Les RCPG sont activés par la liaison de ligands très différents, ainsi leurs modes de liaison seront tout aussi différents. Les ligands de la famille 1 sont de petite taille et se lient aux récepteurs au sein d'une poche « deep pocket » enfouie au milieu des segments transmembranaires (*Figure I 6*), mais les ligands des autres familles se lient soit à l'extrémité N-terminale soit aux boucles extracellulaires du récepteur (Bockaert and Pin 1999) .

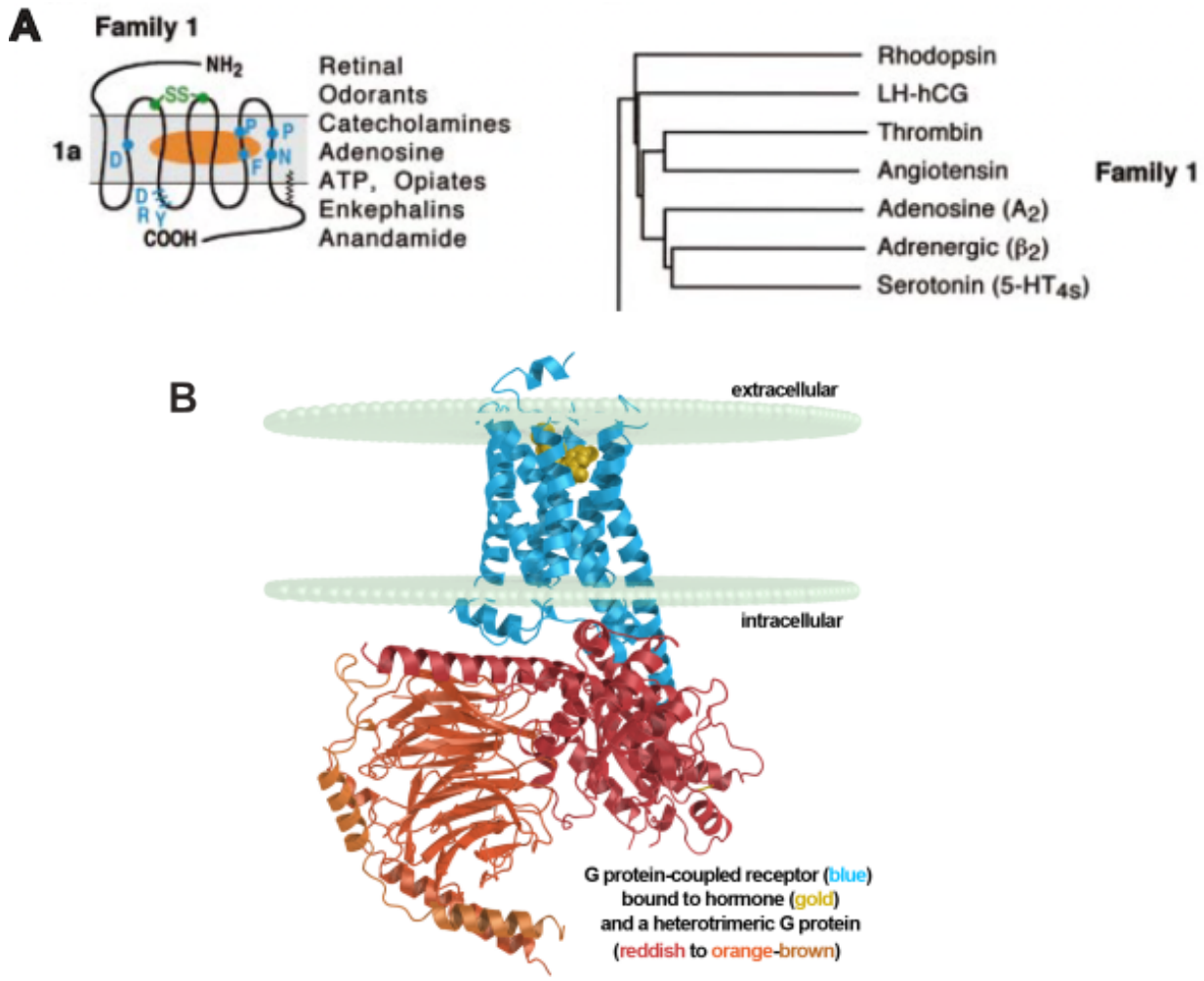


Figure I 6. Classification des RCPG de la famille 1

A.Les récepteurs de la famille 1 regroupent la majorité des RCPG, ici seule une partie de la famille 1 est présentée. En orange, est représentée le site de liaison des ligands pour cette famille. Adapté d'après (Bockaert and Pin, 1999) **B.** Structure d'un RCPG de la famille 1 inséré dans la membrane plasmique

Après la liaison du ligand au récepteur, les segments transmembranaires changent de conformation, ce qui modifie la structure intracellulaire du récepteur et permet le recrutement de protéines G hétérotrimériques se trouvant à proximité (Wang *et al.* 2004). La protéine G une fois activée assure la transduction du signal et active différentes voies de signalisation en aval du récepteur, d'où la dénomination RCPG. Le mode d'action classique des RCPG, qui est aussi celui des RCPG évoqués dans notre étude implique l'association d'un seul récepteur pour une protéine G, mais de nombreuses études ont démontrés que les RCPG pouvaient aussi agir en homo- ou hétérodimère à travers des interactions coil-coil de leur région TM6 (Maggio *et al.* 1993; Gusach *et al.* 2023). Ceci a d'ailleurs été démontré par l'utilisation d'un peptide correspondant au TM6 d'un récepteur β-adrénergique qui inhibe à

la fois la dimérisation et l'activation du récepteur (Hebert *et al.* 1996), cependant la signification fonctionnelle d'un tel mécanisme pour cette famille de récepteurs n'est pas encore établie (Kwon *et al.* 2022). En revanche, un fonctionnement en homo- ou hétérodimère est reconnu pour les récepteurs de la famille 3, tels que les récepteurs métabotropiques mGluR ou $GABA_B$ (Kniazeff and Pin 2012). Par ailleurs, une autre hypothèse propose que l'interaction entre le RCPG et la protéine G se fasse avant l'activation par le ligand et donc avec un RCPG inactif, mais peu de données sont disponibles sur la fonction de ce complexe inactif (Galés *et al.* 2005; Klein *et al.* 2000).

Les ligands, les RCPG, les protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs forment donc des assemblages macromoléculaires complexes et extrêmement efficaces dans l'initiation de l'activation de voies de signalisation sensibles et spécifiques.

IV.1.2. *Principaux effecteurs des RCPG*

a) La transduction du signal par les protéines G hétérotrimériques

Les protéines G hétérotrimériques, d'un poids moléculaire total de 90kDa, sont constituées de sous-unités α (45 kDa), β (35 kDa), et γ (10kDa) associées entre elles de façon covalente (Duc *et al.* 2015). La sous unité α agit seule alors que les sous unités β/γ agissent sous forme de complexe. L'ancrage à la membrane de ces sous unités se fait via leurs chaines lipidiques qui selon leurs modifications post-traductionnelles propres, rendent cet ancrage plus ou moins stable. La membrane plasmique n'étant pas homogène, certaines régions riches en cholestérol et sphingolipides et particulièrement dynamiques, appelées *radeaux lipidiques (ou rafts)*, sont plus propices aux interactions RCPG/protéines G/effecteurs.

Le mécanisme d'activation des protéines G repose sur l'échange GDP/GTP au niveau de leur sous-unité α (Hilger *et al.* 2018). Suite à cet échange, la sous unité α (liée au GTP) se dissocie du complexe $\beta\gamma$, et vont chacun interagir avec diverses effecteurs, tels que des enzymes ou des canaux ioniques afin d'assurer la transduction du signal. Cette activation des protéines est régulée par deux facteurs : les GEFs (GDP/GTP exchange factor) et un membre de la famille des RGS (Regulators of G protein signaling), les GAP (GTPase activating protein). Les RCPG, qui dans notre cas se comportent comme des GEF catalysent l'échange d'une

molécule de GDP par une molécule de GTP et les GAP augmentent l'activité GTPasique des protéines G. Il est cependant nécessaire que l'activation de Gα soit transitoire pour que la durée du signal transmis au niveau intracellulaire soit le reflet de la liaison du ligand au RCPG. Ainsi l'hydrolyse du GTP en GDP par la sous unité α conduit à son inactivation et à sa réassociation avec le complexe β/γ (Duc *et al.* 2015).

La sous unité α contient le site d'interaction du GDP/GTP et représente l'intermédiaire principale de la transduction du signal via les protéines G. Elle est à la fois responsable de la spécificité de l'interaction RCPG/protéines G et de l'interaction protéines G/effecteurs. Contrairement au large répertoire de RCPG existants chez l'Homme, seules 4 familles de protéines G hétérotrimériques ont été identifiées et classées selon la nature de leur sous unité α et des voies de signalisation activées (*Tableau 1*). Les sous unités α interagissent principalement avec deux effecteurs : les adenylyls cyclases (AC) et la phospholipase Cβ (PLCβ) qui vont respectivement activer les voies AMPcyclique et calcique (*Figure I7*).

Famille	Sous unité α	Effecteurs et voies de signalisation
Gs	αs αolf	Activation AC → ↗ AMPc
Gi	αi	Inhibition AC → ↘ AMPc
Gq	αq α11	Activation PLCβ : PIP2→ IP3 → IP3R → ↗ Ca^{2+} Activation PLCβ : PIP2 → DAG → activation PKC
G12	α12 α13	Activation RH-RhoGEF → RhoA

Tableau I 1. Classification des protéines G hétérotrimériques et rôle des sous-unités α

Données provenant des articles suivants (Duc et al. 2015 ; Jiang et al. 2022 ; Suzuki et al. 2009).

Les sous-unités β/γ une fois libérées peuvent d'une part interférer avec l'action des sous unités α activées et d'autre part stimuler leurs propres effecteurs. Leur rôle principal est de récupérer les sous unités α ayant hydrolysé leur GTP (α_{GDP}) ou de recruter des RGS afin d'accélérer leur inactivation. Néanmoins, ce complexe a aussi de nombreuses actions directes puisqu'il stimule : des protéines kinases (GRK, PI_3K, etc), certaines adenylyls cyclases, les canaux potassiques GIRK ou encore la PLCβ (Duc *et al.* 2015).

Un autre type de protéines G, n'interagissant pas directement avec les RCPG mais avec de nombreuses voies de signalisations activées par ces derniers, existe. Il s'agit des *protéines G monomériques* ou autrement appelées *petites protéines G* car elles sont de petite taille (20-40kDa) et ne sont composées que d'une seule sous unité, la sous unité α (Takai *et al.* 2001). Cette sous unité α est similaire à celle des protéines G hétérotrimériques sur le plan structurel et fonctionnel (liaison GDP/GTP et activité GTPasique), cependant l'activité GTPasique n'est pas toujours nécessaire à l'exercice de leurs fonctions. Leur cycle d'activation/inactivation est similaire aux protéines G et c'est aussi pour cela qu'elles sont considérées comme des interrupteurs moléculaires. Leur activation nécessite un signal en amont qui déclenche l'échange GDP/GTP, échange opéré par les GEF induisant un changement de conformation du site de liaison avec l'effecteur et ainsi permettant l'interaction avec l'effecteur (*Figure I7*). La forme liée au GTP est hydrolysée via l'activité GTPasique catalysée par les GAP, ce qui reconstitue la forme inactive liée au GDP et libère l'effecteur permettant la transduction du signal (Reiner and Lundquist 2018).

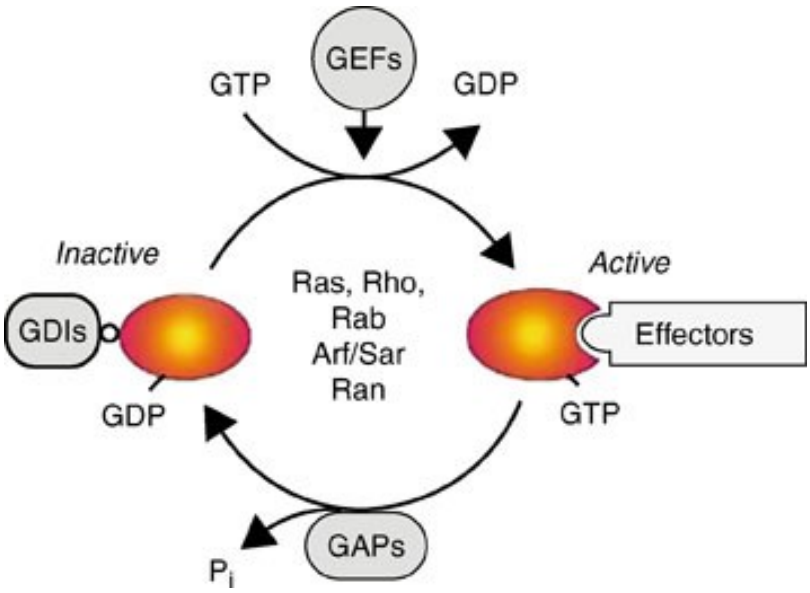


Figure I 7. Cycle d'activation/inactivation des petites protéines G

Les petites protéines G sont représentées en orange.

Plus de 100 petites protéines G ont été identifiées chez les eucaryotes, et certaines forment une superfamille dont les membres ont été classés selon leur structure en cinq familles : Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf et Ran. La majorité de ces petites protéines G sont localisées au niveau du cytosol et à la membrane plasmique, à l'exception des protéines Ran qui sont localisées

entre le cytosol et le noyau. Selon la famille de petites protéines G, l'interaction se fait sur différentes régions de la membrane assurant ainsi leur spécificité d'action (Takai *et al.* 2001). Les effecteurs de ces protéines varient selon la famille afin d'exercer leurs fonctions spécifiques (*Tableau I2*).

Famille	Fonction régulées	Effecteurs et voies de signalisation
Ras	Expression génique	▪ Raf protein kinase → MAPKK→ MAPK → Facteurs de transcription nucléaire ▪ PI3K
Rho, Rac, Cdc42	Expression génique Organisation du cytosquelette	▪ ROCK → MYPT1 (MLCP subunit) → sensibilité de la contraction Ca^{2+} ▪ PI3K ▪ Rac, Cdc42 → JNK →p38 MAPK
Rab	Trafic de vésicules intracellulaires	Rabphilin-3 / Rabaptin-5 /Rab8ip interaction avec SNARE
Sa1/Arf	Trafic de vésicules intracellulaires	COPII-coated vesicules
Ran	Transport nucléoplasmique durant les phases G1, S, G2	Ran-GTP interagit avec CRM1 ou Importinβ ou α

Tableau I 2. Principales fonctions et effecteurs des petites protéines G

Données provenant de (Takai *et al*. 2001).

b) La désensibilisation des récepteurs par les GRK et la β-Arrestine

La transduction du signal par les RCPG est certes essentielle, mais une stimulation excessive peut devenir délétère et toxique pour la cellule. C'est pour cette raison, que l'activation des récepteurs doit être limitée dans le temps par des mécanismes de désensibilisation. La désensibilisation consiste à réduire la réponse d'un récepteur à son ligand alors que le ligand est toujours présent. Le récepteur peut soit rester à la surface et ne plus répondre au stimulus, soit être internalisé pour être ensuite réadressé à la membrane ou dégradé. Les travaux menés sur les récepteurs β2-adrénergiques par Robert Lefkowitz (Prix Nobel de chimie 2012 avec Brian Kobilka) et son équipe depuis 1997 (Lefkowitz *et al.* 1998), ont enrichi notre compréhension de la désensibilisation et ont montré qu'elle était initiée par une phosphorylation du récepteur par une kinase activée en réponse aux catécholamines et indépendante de l'AMPc, nommée βARK au départ puis GRK2 (*GPCR kinase*).

Parmi les six GRK existantes, les GRK2 et GRK3 possèdent un domaine d'homologie à la pleckstrine (*domaine PH*) leur permettant de se lier aux sous unités β/γ et ainsi d'être transférer du cytosol vers la membrane plasmique pour phosphoryler les RCPG. Les phosphorylations par les PKA et PKC sont aussi possibles mais elles ne sont pas spécifiques des RCPG activés, elles touchent aussi les RCPG en absence d'agoniste. La désensibilisation est dite hétérologue lorsque qu'elle résulte d'une activité PKA/PKC et homologue pour une activité GRK. Suite à cette phosphorylation par une GRK, les β-arrestines 1 et 2 (ubiquitaires) reconnaissent le récepteur phosphorylé et provoque le découplage RCPG/protéine G ce qui conduit à la désensibilisation mais également à la mise en place d'autres voies soit de recyclage du récepteur (internalisation par les vésicules à clathrine), soit de dégradation par ubiquitination, soit d'activation des MAPK et d'autres protéines (Rajagopal and Shenoy 2018).

De cette manière, le signal initié par la liaison d'un ligand à un RCPG est limité à la fois par l'inactivation des protéines G et par les mécanismes de désensibilisation (*Figure I8*). Pour avoir lieu, ces mécanismes nécessitent cependant que tous les acteurs soient localisés dans la même région participant ainsi à la compartimentalisation du signal.

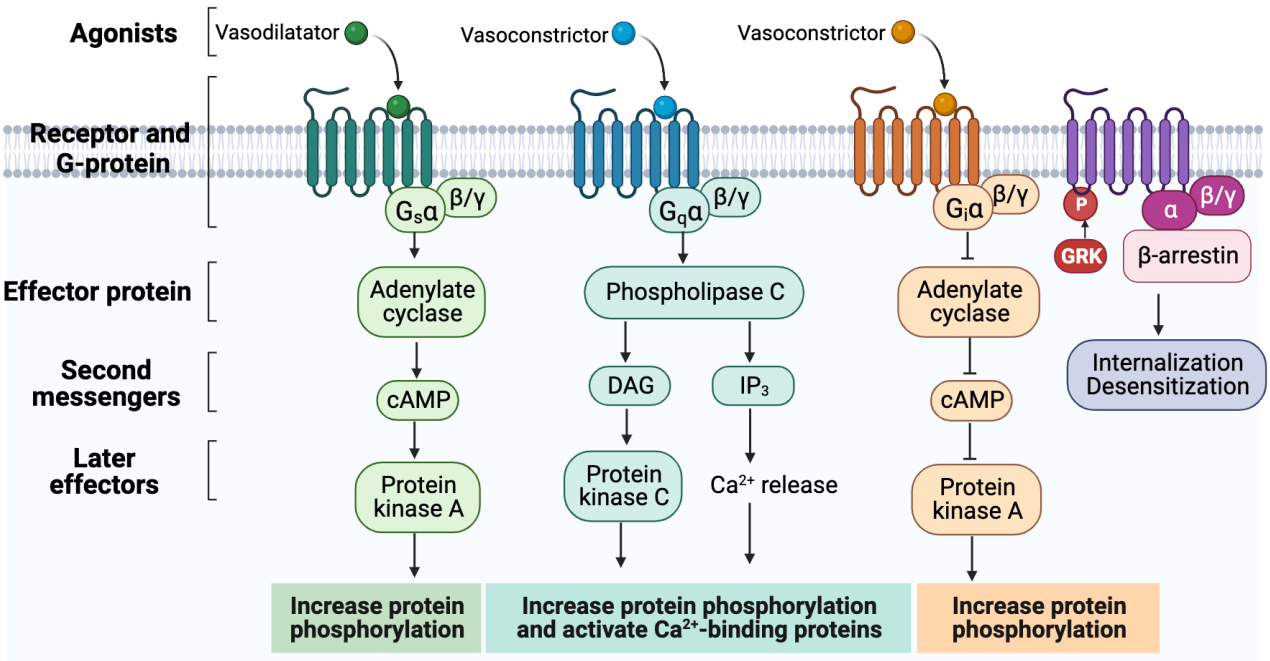


Figure I 8. Différentes signalisations des RCPG

IV.1.3. *Principaux vasomodulateurs dans les CMLV*

Comme énoncé précédemment, les RCPG sont activés par différents ligands, et une fois activés, la protéine Gα qui leurs est associée assure la transduction du signal et active les voies de signalisation adéquates menant soit à la vasoconstriction soit à la vasodilatation (Vaibhav Dhyani et al 2020). Les principaux agents vasomodulateurs impliqués dans la vasoréactivité des CMLV, ainsi que leurs récepteurs respectifs et les protéines G associées sont présentés dans le *tableau I3*.

Agonistes	Récepteurs	Sous unité Gα	2nd messager	Effets sur la tonicité	Références
Angiotensine II	AT1R	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	(Wynne *et al.*, 2009) (Fellner and Arendshorst, 2004)
	AT2R	Gαs	↗ AMPc	Vasodilatateur	
Endothéline I	ET_A	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	
Phénylephrine	α1-adrénergique	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	(Fan *et al.*, 2009)
β-agoniste ou Isoprotérénol	β2-adrenergique	Gαs	↗ AMPc	Vasodilatateur	(Zhai *et al.*, 2012)
Adrénaline	α1-adrénergique	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	(Vargas and Gorman, 1995) (Fauaz *et al.*, 2000) (Barbato et al., 2005)
	α2-adrénergique	Gαi	↘ AMPc	Vasoconstricteur	
	β2-adrénergique	Gαs	↗ AMPc	Vasodilatateur	
PGE2	EP1	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	(Gomez *et al.*, 2013) (Regan, 2003)
	EP3	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	
		Gαi	↘ AMPc	Vasoconstricteur	
	EP4	Gαs	↗ AMPc	Vasodilatateur	
	EP2	Gαs	↗ AMPc	Vasodilatateur	
PGI2	IP	Gαs	↗ AMPc	Vasodilatateur	(Tang and Vanhoutte, 2009)
Thromboxane A2	TP	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	(Tang and Vanhoutte, 2009)
Acétylcholine ou Oxotremorine	Muscarinique M1, M3	Gαq	↗ Ca^{2+}	Vasoconstricteur	(Tong *et al.*, 1997)
	Muscarinique M2	Gαi	↘ AMPc	Vasoconstricteur	

Tableau I 3. Principaux vasomodulateurs des CMLV et les voies de signalisation recrutées

↗ ou ↘ : Signifie augmentation ou diminution du niveau intracellulaire de second messager produite en réponse à l'activation du RCPG et de la nature de la protéine G associée.

IV.2. Signalisation adénosine 3',5'-monophosphate ou AMPc

Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, la voie adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ou AMPc joue un rôle crucial dans l'intégration des stimuli environnants, l'établissement des réponses cellulaires et les éventuels changements de phénotype qui en résultent. La spécificité des signaux transmis est assurée par la compartimentation subcellulaire, à la fois spatiale et temporelle, de l'AMPc. Cette compartimentation résulte de la diversité des protéines qui régulent la synthèse (Adenylyls Cyclases), la dégradation (Phosphodiestérases) et l'extrusion de l'AMPc (Multidrug Resistance Protein ou MRP), ainsi que de la diversité de ses effecteurs. Les principaux effecteurs de l'AMPc étant la protéine kinase A (PKA), les facteurs d'échange EPAC et les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG) (Sassone-Corsi 2012). Par ailleurs, la plupart de ces protéines existent dans la cellule sous différentes isoformes, avec des propriétés biochimiques et des mécanismes de régulation spécifiques. Ces isoformes sont codées par des gènes distincts et/ou résultent de l'utilisation de promoteurs alternatifs, d'épissages alternatifs ou de modifications post-traductionnelles des chaînes polypeptidiques (Cooper 2003; Beavo 1995; Skålhegg and Taskén 1997; Biel and Michalakis 2009; Bos 2006). L'interaction de tous les acteurs de la voie AMPc est finement régulée par des protéines d'échafaudages telles que les AKAP (*A kinase anchoring protein*) au sein de complexes macromoléculaires ou signalosomes, dans les différents compartiments cellulaires. Ce niveau supplémentaire de régulation permet la formation de nombreux microenvironnements favorables à la génération, à la transmission et à l'intégration de signaux AMPc spécifiques. De plus, la voie AMPc au travers de ses nombreux acteurs et régulateurs, interagit avec d'autres voies de signalisations ce qui contribue à diversifier d'autant plus les réponses cellulaires possibles. En effet, l'AMPc via la PKA peut également agir au niveau génique en régulant la transcription d'un grand nombre de gènes cibles. La PKA phosphoryle plusieurs facteurs de transcription, tels que CREB (*cAMP-response element binding-protein*), CREM (cAMP-response element modulator) ou ATF1, qui peuvent alors interagir avec des coactivateurs transcriptionnels (CBP, *CREB binding protein* et p300) capables de se lier aux éléments de réponse à l'AMPc (CRE) sur les gènes cibles. En résumé, l'AMPc est essentiel pour coordonner les réponses cellulaires, et son fonctionnement dépend d'une organisation complexe et spécifique au sein de la cellule.

IV.2.1. *L'AMPc*

L'AMPc est le premier second messager à avoir été identifié dans les années 1950 par Earl Wilbur Sutherland Jr et son équipe lors d'une étude sur le fonctionnement de deux hormones en particulier, le glucagon et (Sutherland and Wosilait WD 1956). Quelques années plus tard, ils parviennent à identifier l'enzyme responsable de la synthèse de l'AMPc, l'Adenylyl cyclase (Rall and Sutherland 1962).Au fil des années, il a été établi que l'AMPc assure la transduction du signal d'une multitude d'hormones.

Le niveau intracellulaire d'AMPc, est régulé par les AC pour sa synthèse, par les phosphodiestérases pour sa dégradation (*Figure I9*) et par les MRP pour son extrusion de la cellule.

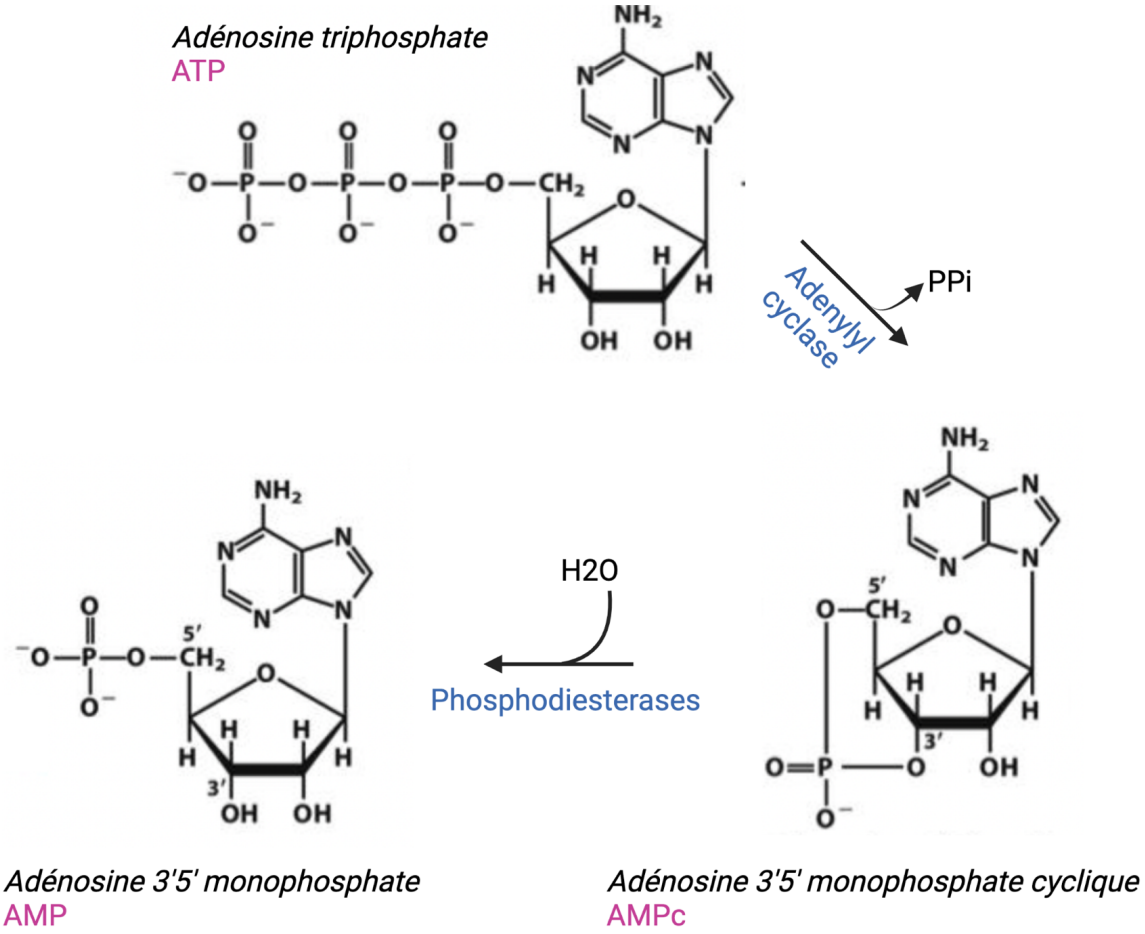


Figure I 9. Synthèse et Dégradation de l'AMPc

La synthèse d'AMPc est assurée par hydrolyse de la liaison phosphoanhydride entre les phosphates α et β de l'ATP libérant un ion pyrophosphate (PPi) et par la formation d'une liaison ester entre le phosphate α et la fonction alcool du carbone 3' du ribose de l'ATP. L'AMPc est ensuite dégradé en AMP par hydrolyse de la liaison ester reliant le phosphate α et le carbone 3' du ribose de l'AMPc.

IV.2.2. *Les Adenylyls Cyclases*

Les Adenylyl Cyclases (*AC*) catalysent la réaction de conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine-3',5'-monophosphate cyclique (*AMPc*). Chez les mammifères, les AC font partie d'une famille de 10 enzymes dont neuf sont transmembranaires (AC1-9) et une dite soluble de par sa localisation dans le cytosol (sAC ou AC10). Depuis le clonage de la première cyclase en 1989, la découverte des suivantes s'est accélérée et les AC ont été numérotée de 1 à 10 selon leur ordre de découverte.

a) Structure des ACs membranaires

Les AC1 à 9 partagent une structure générale commune avec une homologie globale d'environ 60% au sein d'une même espèce et sont très bien conservées entre différentes espèces avec une homologie de plus de 96%, mais elles diffèrent légèrement par leur taille (entre 1119 à 1353 aa) et essentiellement par leurs modes de régulation. Par ailleurs, leur structure complexe rappelle celle des de la famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC). Elles sont constituées d'un domaine N-terminal (Nter) cytosolique, de deux cassettes transmembranaires M1 et M2, chacune constituée de 6 segments transmembranaires (TM1-6 et TM7-12) reliés entre eux par 3 boucles extracellulaires et deux boucles intracellulaires et d'une région C-terminale intracellulaire (divisée en deux domaines : C2a et C2b). Les cassettes M1 et M2 sont reliées par une boucle intracytoplasmique (divisée en deux domaines : C1a et C1b) (*Figure I10*). Les cassettes M1 et M2 assurent l'ancrage à la membrane plasmique, les domaines C1a et C2a qui sont très bien conservés d'une isoforme à une autre, s'associent pour former le site catalytique et les domaines C1b et C2b sont des domaines régulateurs.

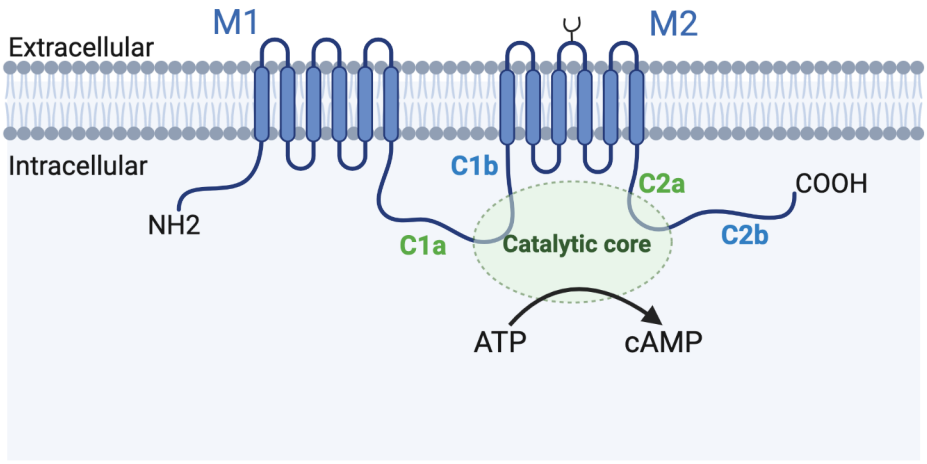


Figure I 10.Structure générale des AC membranaires

Il n'existe pas à ce jour de structure tridimensionnelle complète d'une adenylyl cyclase, mais une structure 3D du site catalytique constituée par le C1a de l'AC5 de chien et le C2a de l'AC2 de rat, seul ou lié à des ligands (ATP, Gαs, forskoline), a été réalisée par cristallographie aux rayons X à la fin des années 1990 (Tesmer *et al.* 1997). Elle a révélé que le site catalytique des AC est constitué par la dimérisation, en tête bêche, des fragments C1a et C2a de l'enzyme. Ces fragments partagent une architecture similaire constituée de 5 hélices α et de 8 feuillets β (*Figure I11 A*). Quant à l'interface du dimère C1a-C2a, elle contient une cavité spacieuse présentant deux sites de liaison pseudo-symétriques pour la forskoline (activateur des AC extrait de la plante *Coleus forskohlii*), l'ATP et 2 ions Mg^{2+}, réunissant ainsi tous les acteurs impliqués dans la production d'AMPc. Par ailleurs, les protéines Gαs et Gαi régulent l'activité des ACs en interagissant directement avec ce dimère C1-C2 (*Figure I11 B*). Il a été montré que les segments C1b et C2b ne sont pas nécessaires à l'activation opérée par Gαs (Yan *et al.* 2001), alors que l'effet inhibiteur de Gαi requiert la présence du domaine C1b (Scholich *et al.* 1997).

La cristallographie a également permis d'identifier en 2017 l'existence du domaine hélicoïdale (HD) et démontré qu'il est essentiel à la dimérisation des régions C1a et C2a donc à la conformation et à l'activité d'un site catalytique fonctionnel (Vercellino *et al.* 2017).

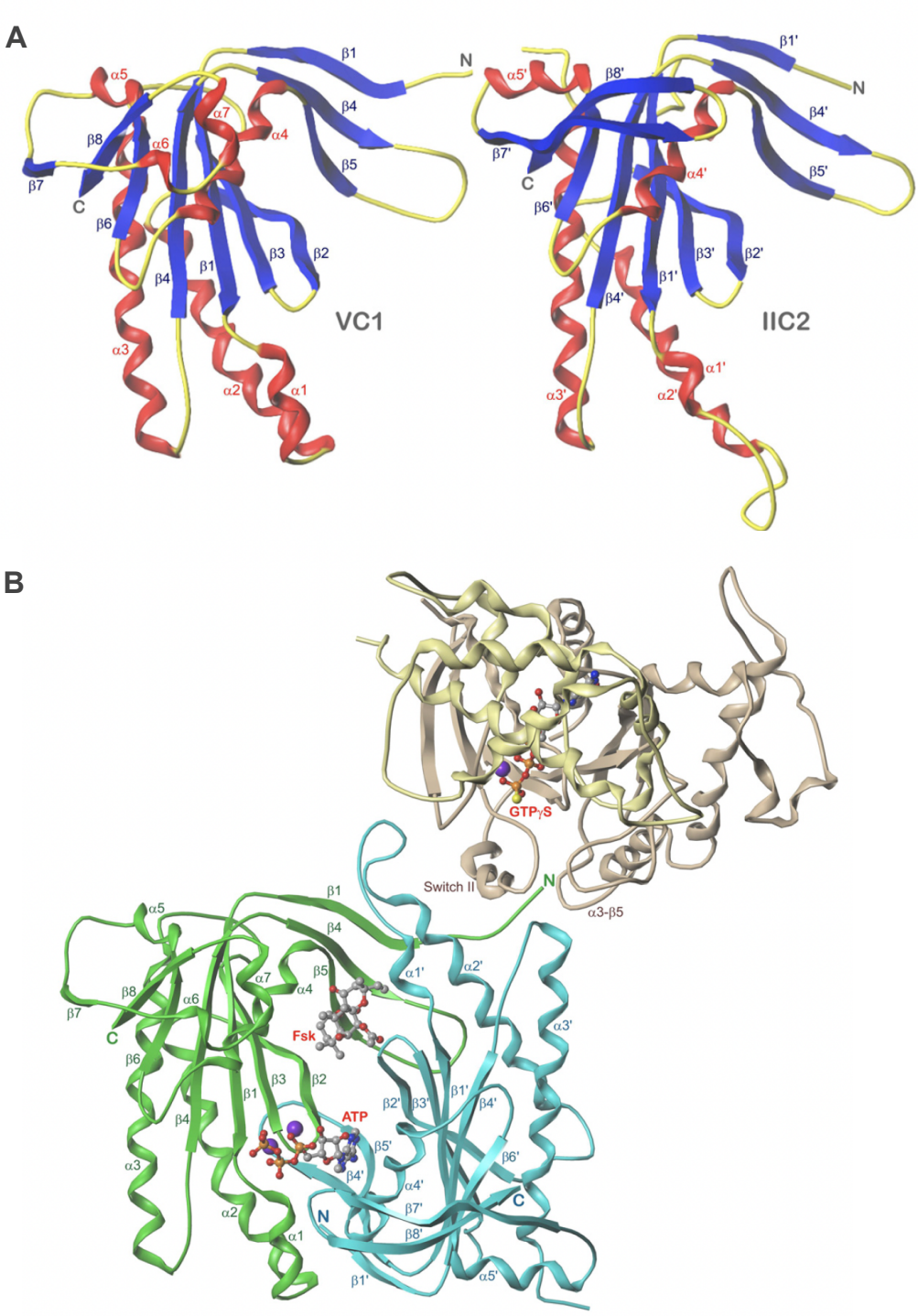


Figure I 11. Structure des domaines 5C1a et 2C2 et du site catalytique activé par Gαs

A. 5C1 et 5C2 en comparaison côte à côte. Rouge : hélices-α ; bleu : feuillets β ; jaunes : boucles et segments. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées pour chaque domaine. **B.** Le dimère 5C1-5C2 est complexé avec la forskoline, l'ATP et la sous unité Gαs complexée avec du GTP. Vert : 5C1 ; bleu : 2C2 ; Jaune/brun : Gαs. Couleur des atomes - gris : C ; bleu : N ; rouge : O ; violet : Mg^{2+}. D'après (Dessauer *et al.*, 2017)

En 2019, un premier modèle tridimensionnel partiel de l'AC9 bovine (*Taurus Borus*) liée à une protéine Gαs a été obtenu par cryo-microscopie électronique (Qi *et al.* 2019).Ce modèle a démontré que le positionnement des domaines hélicoïdaux HD1 et HD2, qui correspondent respectivement aux extensions cytosoliques des domaines transmembranaires TM6 et TM12 (*Figure I12A*), joue un rôle central dans la bonne conformation du site catalytique, et plus particulièrement au niveau des régions coiled-coil des domaines HD formés par les hélices h1.1, h1.2, h2.1 et h2.2 (*Figure I12B*). Cette publication a également démontré que les domaines TM1-TM5 et TM7-TM11 de l'AC9 se positionnent de façon symétrique autour du TM6 et du TM12 respectivement (*Figure I12C*). Cependant, ce modèle est incomplet puisque les domaines N-terminal et C1b sont absents, néanmoins Qi et al. ont suggéré que ces domaines imposeraient des contraintes nécessaires au positionnement correct des TM6 et TM12 et pourraient donc contribuer à l'assemblage fonctionnel et à la régulation de la cyclase. Cet article a été essentiel pour établir la structure complète d'une AC qui sera présentée dans la partie résultat de la partie 1 de ce manuscrit.

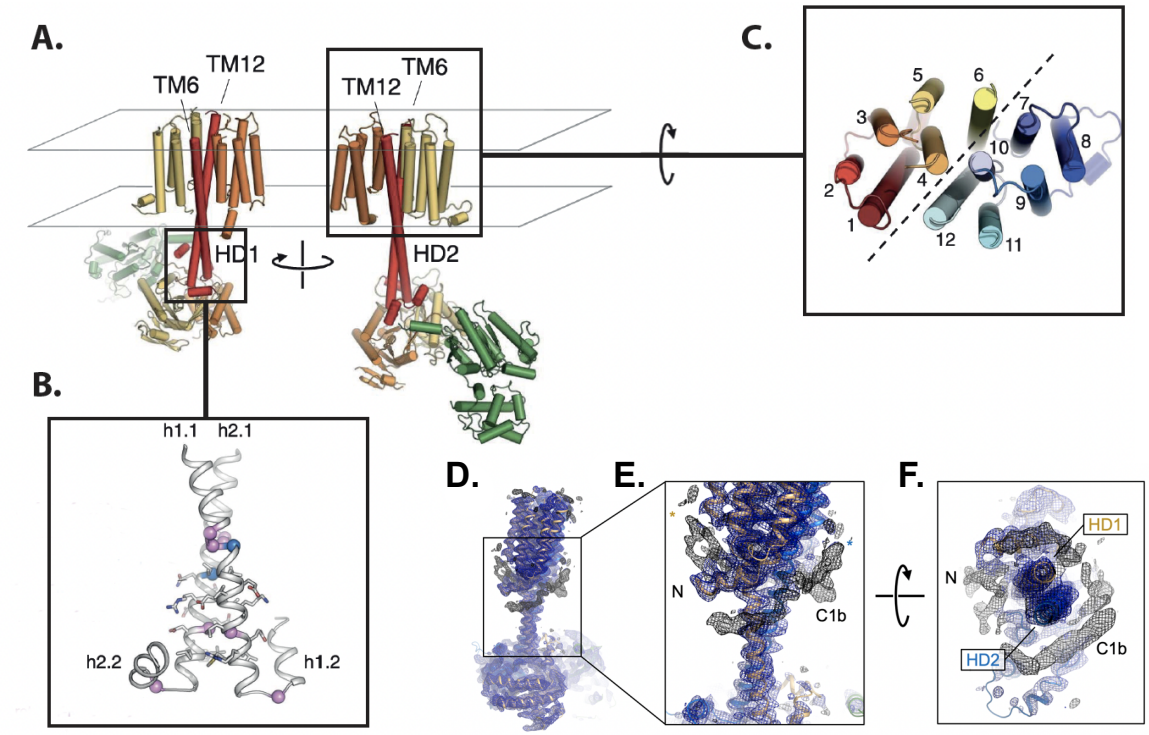


Figure I 12. Structure 3D de l'AC9 bovine

Modélisation montrant le positionnement en **(A)** des domaines transmembranaires TM6 et TM12 et de leurs prolongements cytosoliques respectifs par les domaines hélicoïdaux HD1 et HD2, en **(B)** des régions coiled-coil des domaines HD formées par les hélices h1.1, h1.2, h2.1 et h2.2. **(C)** Positionnement symétrique des domaines TM1-5 et TM7-11 autour des TM6 et TM12. **(D)** Densité non assignée du domaine N-terminal et du domaine C1b de l'AC9. Une vue latérale de la densité non assignée est présentée sous forme de maillage gris; la faible qualité de cette densité ne permet pas une interprétation et une construction atomique sans équivoque de ces régions. Les régions non assignées pourraient être reliées à la partie N-terminale du TM1 ("N") et à la partie N-terminale du TM7 ("C1b").**(E)** Le zoom sur la vue latérale de la densité non attribuée montre des éléments positionnés symétriquement sur deux côtés opposés de la région traversant la membrane de la protéine. **(F)** Vue depuis le cytosol de zones de densité non assignées (en gris) montrant que le domaine C1b, reliant le domaine C1a et le TM7, semble s'enrouler autour du domaine hélicoïdal. Il est possible que certaines interactions entre le HD et le domaine C1b se produisent dans cette région. D'après (Qi et al., 2019)

Les études menées au cours des vingt dernières années sur le fonctionnement des adenylyl cyclases au sein de systèmes d'expression hétérologues permettant l'expression des différents domaines des ACs, ont mis en évidence que la dimérisation d'ACs fonctionnelles étaient essentielle à i) leur export du RE vers la membrane plasmique et ii) leur activité catalytique. Deux types de dimérisation des AC ont alors pu être identifiées (*Figure I13*), les dimérisations intra- et intermoléculaires (Cooper and Crossthwaite 2006).

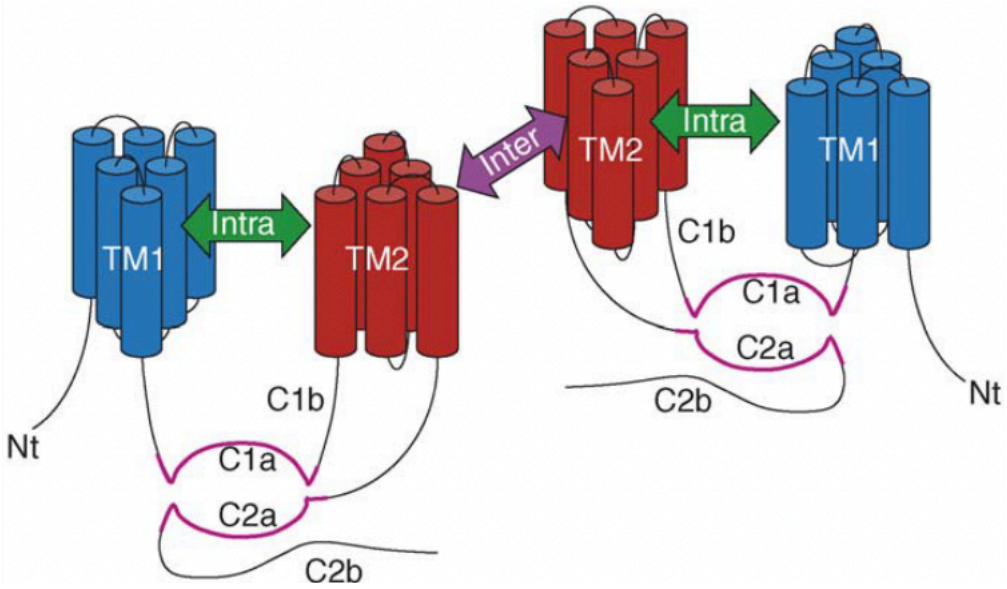


Figure I 13. Dimérisation intra- et intermoléculaire des Adenylyls Cyclases

D'après (Cooper and Crossthwaite, 2006)

Dimérisation intramoléculaire

Gu et ses collaborateurs ont mis en évidence en étudiant l'adenylyl cyclase 8 ou AC8, une interaction physique directe entre les deux cassettes transmembranaires M1 et M2. Ils ont montré que cette interaction est nécessaire pour l'export de l'AC8 vers la membrane plasmique. Les cassettes transmembranaires, lorsqu'elles sont exprimées seules (AC8M1 ou AC8M2) ou en combinaison avec les fragments C1 et C2 de l'AC8 (AC8M1-C1 et AC8M2-C2), ne sont pas détectables à la membrane plasmique et génèrent un signal intracellulaire. Cependant, lorsque les deux cassettes transmembranaires M1 et M2 de l'AC8 sont co-exprimées, elles sont détectées à la membrane plasmique. La suppression d'un ou plusieurs domaines transmembranaires d'une cassette empêche l'adressage des deux cassettes transmembranaires à la membrane plasmique (Gu *et al.* 2001b) . Ces résultats confirment donc l'existence d'une dimérisation intramoléculaire des AC et son rôle dans leur transport vers la membrane plasmique.

Une autre étude menée par Seebacher et ses collaborateurs, suggère que la dimérisation intramoléculaire des régions transmembranaires (TM1 et TM2) est nécessaire pour la formation d'un site catalytique fonctionnel. Ils ont construit des AC chimériques composées des domaines N-terminal, C1 et C2 de l'AC5, associés aux domaines transmembranaires de l'AC5 (5M1 et 5M2) ou de l'AC7 (7M1 et 7M2). Les résultats montrent que l'AC chimérique générée n'induit une activité catalytique que si les deux cassettes M1 et M2 proviennent de la même AC soit les combinaisons AC5M1-5M2 ou AC7M1-7M2. Lorsque

les cassettes proviennent de deux AC différentes, AC5M1-7M2 ou AC7M1-5M2, aucune activité catalytique n'est détectée (Seebacher *et al.* 2001). Venant appuyer ces résultats, il a également été mis en évidence que la co-expression des deux moitiés de l'AC8 (AC8Nt-M1-C1 + AC8M2-C2) et de l'AC5 (AC5Nt-M1-C1 + AC5M2-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 *et al.* 2001b; Hu *et al.* 2002).

Une autre dimérisation intramoléculaire essentielle pour l'activité enzymatique des AC est celle des sous-domaines C1a et C2a, qui s'assemblent pour former le site catalytique des AC. Ce processus a été identifié en premier par Tang et ses collaborateurs, qui ont montré que des mutations ponctuelles introduites dans les segments C1a ou C2a de l'AC1 suffisent à rendre l'enzyme catalytiquement inactive (Tang and Gilman 1995). Depuis, les études *in vitro* combinant des segments purifiés de ces domaines se sont multipliées et ont confirmé l'étude de Tang et al., en montrant par exemple, que l'association du segment C1a de l'AC1 et du segment C2 de l'AC2 permet de reconstituer un site catalytique fonctionnel dont l'activité est multipliée par 100 en présence de forskoline et de Gαs (Whisnant *et al.* 1996). Une autre étude de Sunhara et ses collaborateurs a également mis en évidence que cette dimérisation intramoléculaire peut aussi se faire entre des hétérodimères au travers de l'association du segment 5C1 et 2C2 dont l'activité est renforcée par l'interaction avec Gαs (Sunahara *et al.* 1997).

Dimérisation intermoléculaire

Plusieurs études réalisées ont mis en évidence une dimérisation intermoléculaire des AC via leurs cassettes transmembranaires qui aurait un rôle régulateur de l'activité catalytique de l'enzyme (Cooper and Crossthwaite 2006) :

Gu et ses collaborateurs ont démontré que l'expression d'une AC8 rendue catalytiquement inactive par une délétion dans le domaine C1a, diminue l'activité catalytique de l'AC8 pleine taille avec laquelle elle est co-exprimée. Sur le même principe ils ont également montré la dimérisation de l'AC6 pleine-taille avec des formes tronquées de l'AC6 (délétée de la cassette M2), 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 (Gu *et al.* 2002).

Baragali et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'hétérodimérisation des AC2 et AC5 potentialise la production d'AMPc induite par Gαs, comparée à celle de l'AC2 ou l'AC5 exprimée seule (Baragli *et al.* 2008). Cette étude réalisée dans le cœur de la souris et non pas en système d'expression hétérologue appuie la réalité physiologique du mécanisme d'hétérodimérisation des AC.

La dimérisation intramoléculaire tout autant que la dimérisation intermoléculaire des AC jouent un rôle important si ce n'est essentiel dans leur capacité à produire de l'AMPc, en inhibant ou en potentialisant leur activité.

b) Classification et Régulation

Grâce à l'analyse de leurs séquences, une classification phylogénétique (*Figure I14*) a été établie pour les neufs AC membranaires. Par la suite des études biochimiques et pharmacologiques menées *in vitro* ont suggéré diverses propriétés de régulations qui se sont avérées concordantes avec la répartition phylogénétique. En fonction de leurs structures et de leurs régulations par divers effecteurs, les adenylyls cyclases membranaires ont été classées en quatre groupes distincts, et un cinquième groupe a été défini pour l'AC soluble puisqu'elle est la seule cyclase à ne pas être activée par la sous unité Gαs des protéines G hétérotrimériques (*Tableau I4*). La multiplicité des AC et la diversité de leurs régulations sont certes des éléments de complexité mais ils permettent une finesse de régulation et une adaptation au type cellulaire et au contexte endocrinien.

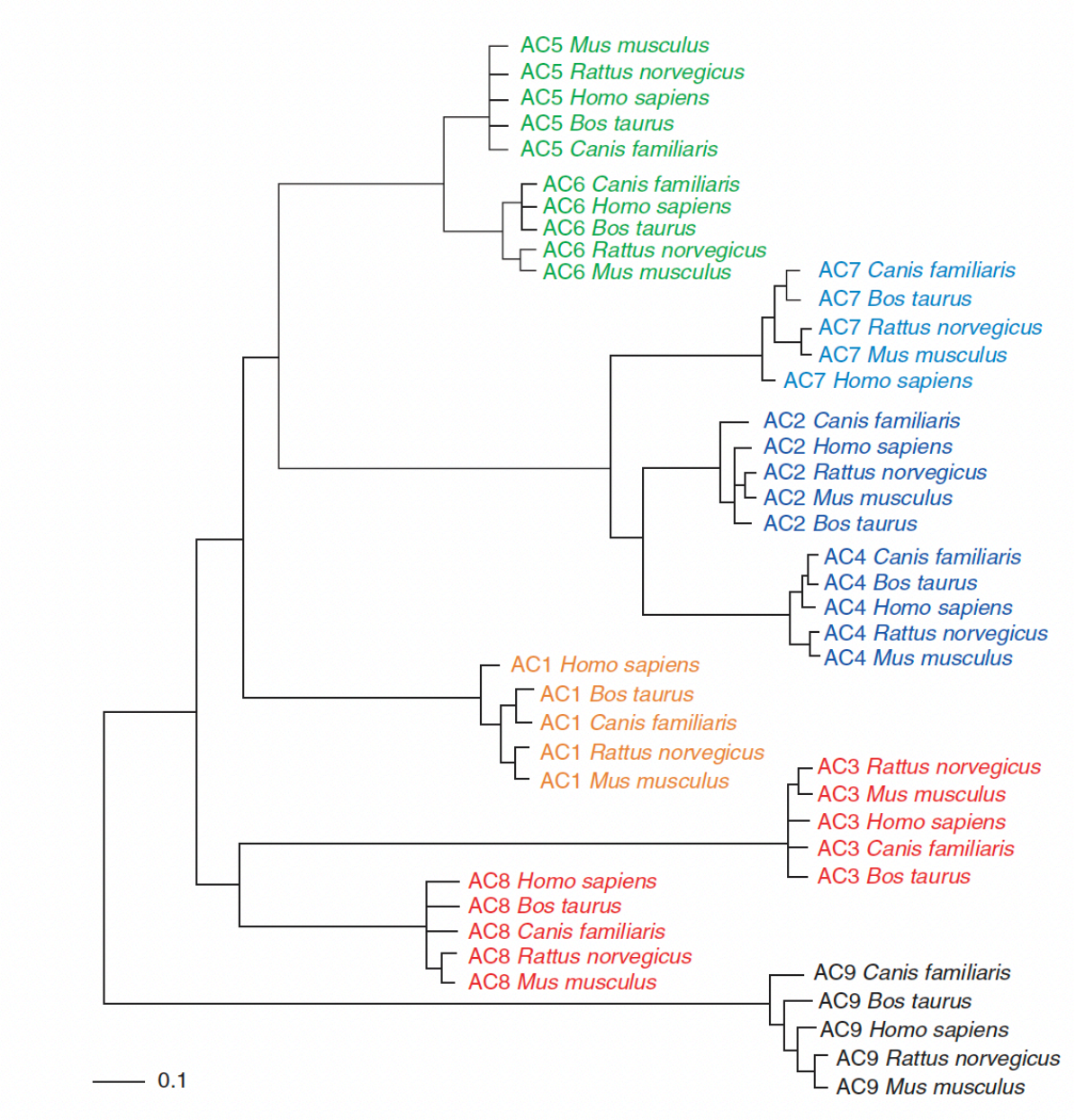


Figure I 14. Classification phylogénétique des AC membranaires

Établie par analyse des séquences des ACs de 5 espèces (Homme, Rat, Souris, Chien, Bœuf). La longueur de la branche est proportionnelle au nombre de substitutions par site. D'après (Halls and Cooper, 2011)

Les mécanismes de régulation menant soit à l'activation soit à l'inhibition des ACs peuvent être divisés en 4 catégories (Cooper 2003; Willoughby and Cooper 2007):

- **Directe par les sous unités α ou β/γ des protéines G hétérotrimériques (Gs et Gi)**

Au niveau des protéines G hétérotrimériques, il existe chez l'Homme 16 sous unités α, 5 sous unités β et 13 sous unités γ (Wootten *et al.* 2018). Toutes les cyclases sont activées par Gαs à l'exception de l'AC soluble, alors que les sous unités Gαi exercent un effet inhibiteur limité aux AC1, AC5 et AC6. Concernant les sous unités β/γ, elles exercent un effet inhibiteur ou activateur sur les ACs selon l'isoforme d'AC et surtout selon les sous-unités composants le dimère (Khan *et al.* 2013).

- **Directe ou indirecte par la voie calcique : $[Ca^{2+}]i$, Ca^{2+}/CaM, CaMK, Calcineurine**

Les régulations directes par le calcium libre ou lié à la calmoduline (CaM) activent ou inhibent les AC. D'ailleurs, la sensibilité des AC au complexe Ca^{2+}/CaM est différente, en effet si elle est prouvée pour l'AC1 et l'AC8, elle reste ambigüe pour l'AC3 (Choi *et al.* 1992). Les AC1 et AC8 voient leur activité augmentée par le calcium à des concentrations en Ca^{2+} inférieure à 1µM alors que l'activation de l'AC3 nécessiterait plus de 10µM de calcium et malgré cela son activité serait très faible. L'activation de l'AC3 par le calcium ne semble donc pas relever d'une réalité physiologique. Pour ce qui est du calcium libre, à de forte concentrations (>100µM) il inhibe toutes les AC alors qu'à faible concentration (environ 0,4µM) il régule négativement les AC5 et AC6 en se liant sur leur site catalytique à la place du Mg^{2+} nécessaire à l'activité catalytique (Guillou *et al.* 1999). Par ailleurs, l'activation de l'AC1 et l'inhibition de l'AC6 sont particulièrement médiées par le calcium capacitatif (Cooper *et al.* 1994). Les régulations indirectes par le calcium des AC se font via les CaMKinases (activées par la calmodulin suite à une élévation de $[Ca^{2+}]_i$) qui inhibent les AC3 et AC1 ou via la calcineurine (phosphatase activée par Ca^{2+}/CaM) qui inhibe l'AC9.

- **Directe par les protéines kinases des voies AMPc (PKA) et calcique (PKC)**

La protéine kinase A (*PKA*), activée par l'AMPc exerce un rétrocontrôle négatif sur les AC5, AC6 et AC8 en les phosphorylant au niveau de leur région C1b pour l'AC5 et l'AC6 (Beazely and Watts 2006) et sur la région N-terminale pour l'AC8. La PKA et ses cyclases cibles sont souvent regroupées au sein de complexes macromoléculaires de signalisation par les protéines d'échafaudages AKAP179/150. La protéine kinase C (*PKC*), généralement activée par le DAG, régule six des neufs AC membranaires mais selon les AC, cette régulation peut

être spécifique d'une ou plusieurs isoformes de PKC, comme l'ont montré Kawabe et ses collaborateurs pour l'AC5 et la PKCζ par exemple (Kawabe *et al.* 1996).

- **Directe par d'autres facteurs tels que les RGS (*Regulators of G protein signaling*) ou les petites protéines G**.

Les protéines RGS en se liant aux sous-unités Gα-GTP activées, accélèrent l'hydrolyse du GTP (activité GAP), ce qui entraîne une inactivation plus rapide des sous-unités Gα-GTP et Gβγ. Cette modulation négative contribue à contrôler l'ampleur et la durée des réponses cellulaires initiées par les RCPG. L'inhibition par les RGS est une régulation particulière de l'AC3 dans l'épithélium olfactif uniquement et de l'AC5 et l'AC6 en système d'expression hétérologue par une interaction directe avec le domaine C1 des enzymes (Salim *et al.* 2003).

Ces différentes modalités de régulations des AC sont présentées dans le *tableau I4*.

Groupe	Isoforme	Régulation par les protéines G hétérotrimériques			Régulation par le calcium Directe ou Indirecte		Régulation par les protéines kinases		Autres régulations	
		Gαs	Gαi	Gβ/γ	Stimulation	Inhibition	Stimulation	Inhibition		
1	AC1	Stimulées	Inhibée	Inhibées	Ca^{2+}/CaM	CaMKIV	-	-	-	
	AC3		-		?	CaMKII			Inhibée par RGS1, 2 et 3	
	AC8				Ca^{2+}/CaM			PKA	-	
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, -ζ PKA		Stimulées par Raf1
4	AC9	Stimulées	-	-	CaMKII	Calcineurine	-	PKC	-	
5	AC soluble	-	-	-	-	-	-	-	Stimulée par le bicarbonate	

Tableau I 4. Classification par groupe des AC en fonction de leurs modalités de régulation

Les informations présentées sont compilées à partir des revues de (Cooper, 2003) et (Halls and Cooper, 2011)

c) Distribution tissulaire des AC

Les différentes isoformes d'AC ne sont pas également réparties dans les tissus, en effet la distribution des AC est très hétérogène. Certaines adenylyl cyclases comme l'AC4, l'AC5 et l'AC6 sont très ubiquitaires alors que d'autres sont plus spécifiques. Bien que l'expression de l'AC1 ait été pendant longtemps considérée comme spécifique du cerveau elle est également retrouvée dans le cœur, les muscles squelettiques, et beaucoup d'autres tissus (Dessauer *et al.* 2017). La nature des expériences réalisées pour étudier la distribution tissulaire des AC, à savoir la PCR, le northern blot ou l'hybridation *in situ*, font qu'elles ne reflètent qu'en partie la réalité de l'expression protéique des AC dans les tissus. De plus, certaines études ont été réalisées sur tissus entier et d'autres sur des préparations cellulaires ce qui peut justifier les différences de résultats dans la littérature. L'étude de ces protéines a été rendue d'autant plus compliqué en raison du manque d'anticorps spécifiques. Cependant, en combinant les résultats d'études transcriptomiques et les études d'invalidation/surexpression dans les modèles murins, la distribution et l'implication dans les fonctions physiologiques des ACs ont pu être établies et sont présentées dans le *tableau I5*. Les fonctions des AC sont sans doute plus étendues que celles listées et compte tenu de la similarité dans la régulation de certaines ACs du même groupe, il ne serait pas surprenant qu'elles puissent agir en synergie ou même se compenser.

Dans les Cellules Musculaires Lisses Vasculaires, les principales adenylyls cyclases exprimées sont les AC3, AC5 et AC6. Elles sont préférentiellement mais pas exclusivement situées dans les domaines riches en cavéoline (Ostrom *et al.* 2012).

Groupe	Isoforme	Distribution tissulaire	Modèle murins		Fonctions physiologiques (Souris et Homme)
			Invalidation	Surexpression	
1	**AC1**	Cerveau, Médullo-surrénale	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Apprentissage, mémoire, plasticité synaptique, réponse aux opiacés, sensibilité à l'alcool, réponse à la douleur
	AC3	Épithélium olfactif, pancréas, cerveau, cœur, muscle lisse, poumons	Oui	Non	Olfaction, fonction spermatique, mémoire contextuelle, réponse à la peur
	AC8	Cerveau, poumons, pancréas, testicules, surrénales	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Apprentissage, mémoire, plasticité synaptique, dépendance à l'alcool, anxiété, trouble dépressif, homéostasie du glucose
2	**AC2**	Cerveau, poumons, 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 opiacés et alcool, réponse immunitaire
4	**AC5**	Cœur, striatum, rein, foie, poumons, testicules, surrénales, muscle lisse, tissus adipeux brun	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Régulation de la contraction cardiaque, coordination motrice, dyskinésie, sécrétion de rénine, réponse à la douleur et au stress
	AC6	Cœur, rein, foie, poumons, cerveau, testicules, surrénales, muscle squelettique et lisse, tissus adipeux brun	Oui	Oui *Cardiaque ou cérébrale*	Régulation de la contraction cardiaque et sensibilité au calcium, fonction rénale
5	**AC9**	Ubiquitaire	Oui *Données non publiées*		Fonction cardiaque, bronchoconstriction

Tableau I 5. Distribution tissulaire et fonctions physiologiques de AC membranaires

Les distributions tissulaires ont été obtenues par études des ARNm (Ludwig and Seuwen, 2002) et les fonctions physiologiques par étude *in vivo* sur modèle murin (Dessauer *et al*., 2017).

IV.2.3. *Les Phosphodiestérases*

Les phosphodiestérases (PDE) sont responsables de l'hydrolyse de l'AMPc en AMP (ou du GMPc en GMP) et contribuent ainsi à l'interruption du signal de la voie AMPc et à la compartimentation spatio-temporelle du signal (*Figure I9*).

a) Structure et classification

Chez les mammifères, plus d'une centaine d'isoformes de phosphodiestérases ont été identifiées. Elles sont codées par 21 gènes différents et divisées en 11 familles (PDE1 à PDE11) (Beavo 1995) (*Figure I15*). Chaque gène codant une PDE est à l'origine de plusieurs variants générés par des sites d'initiation de transcription différents ou par épissage alternatif, qui déterminent les propriétés de localisation subcellulaire, d'activité enzymatique ou encore de régulation allostérique. Ces familles sont établies sur la base d'homologies de séquence protéiques, de spécificité pour l'AMPc ou le GMPc, de leur sensibilité aux inhibiteurs et de leurs propriétés de régulation (Bobin *et al.* 2016). On distingue ainsi trois groupes de PDE : celles qui hydrolysent uniquement l'AMPc (PDE4, PDE7 et PDE8), celles qui hydrolysent uniquement le GMPc (PDE5, PDE6 et PDE9) et enfin celle qui hydrolysent à la fois le GMPc et l'AMPc (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 et PDE11) (Omori and Kotera 2007 ; Francis *et al.* 2011). Les PDE hydrolysant les deux seconds messagers présentent tout de même une affinité plus haute pour l'un ou l'autre, ce qui serait lié à la capacité de la glutamine à changer d'orientation et ainsi s'adapter à l'AMPc ou au GMPc (Zhang *et al.* 2004). Les PDE présentent une structure générale commune, constituée d'un domaine régulateur dans la région N-terminale, d'un domaine catalytique et d'un domaine C-terminal. Le domaine catalytique des PDE est relativement conservé entre les familles de PDE (25-52% d'homologie de séquence), contrairement au domaine régulateur qui est très variable, déterminant ainsi l'activité catalytique, la dimérisation et l'adressage subcellulaire de l'enzyme (Conti and Beavo 2007). Dans la suite de cette partie j'aborderai plus en détail la structure et la régulation des PDE exprimées et responsables de l'hydrolyse de l'AMPc dans les CMLV : les PDE1, PDE3 et PDE4 (Lugnier *et al.* 1986). La PDE5 est responsable de l'hydrolyse du GMPc dans les CMLV mais elle ne sera pas détaillée dans cette étude.

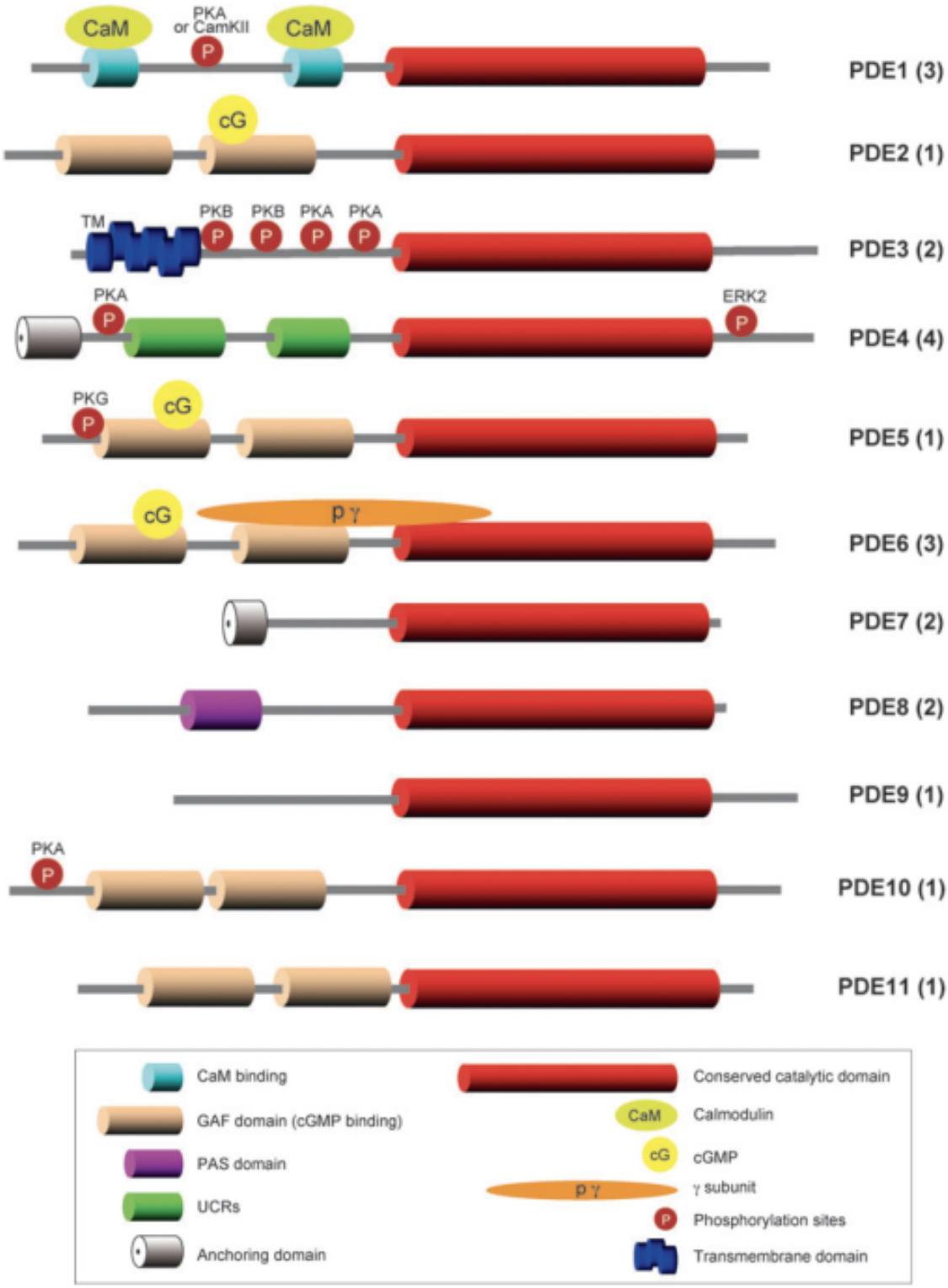


Figure I 15. Structure des PDE

Le nombre entre parenthèse représente le nombre de gènes codant par famille de PDE. Les sites de phosphorylation sont marqués par un P dans un cercle rouge. Abbreviations: CaM,calmodulin; CamKII, calmodulin-regulated kinase II; cG, cGMP; ERK2, extracellular signal-regulated kinase 2; pγ, PDE γ subunit; GAF, cGMP-activated PDEs, adenylyl cyclase, and Fh1A; PAS, period, aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), and single minded; PKA, protein kinase A; PKB, protein kinase B; TM, transmembrane domain of PDE3; UCRs, upstream conserved regions. D'après (Conti and Beavo, 2007)

b) *La phosphodiestérase 1*

La PDE1 est la seule PDE activable par le calcium lié à la calmoduline ce qui la positionne à l'interface entre les voies AMPc, GMPc et Calcium. Son domaine régulateur contient deux sites de liaison pour la calmoduline (CaM) (*Figure I15*) et le changement de conformation induit par la liaison du complexe Ca^{2+}/CaM stimule l'hydrolyse des nucléotides cycliques. Lorsque la concentration intracellulaire en calcium augmente, la PDE1 devient l'enzyme prédominante dans l'hydrolyse de l'AMPc. Trois gènes codant trois isoformes de PDE1 ont été identifiées : PDE1A, PDE1B et PDE1C. Par ailleurs, une dizaine de variants de ces isoformes existent. Les PDE1A et PDE1B hydrolysent préférentiellement le GMPc alors que la PDE1C hydrolyse l'AMPc et le GMPc avec des affinités similaires (*Tableau I6*). Des expériences de RT-qPCR et d'hybridation *in situ* ont montré que la PDE1A est prédominante dans les CMLV chez l'Homme ou le rat, que la PDE1B est quasi inexistante et que la PDE1C n'est exprimée qu'en cas de lésion (Khammy *et al.* 2017). En effet, dans les CMLV contractiles la PDE1A est majoritaire mais lorsque les CMLV basculent vers un phénotype synthétique cela s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la PDE1C et contribue à l'acquisition des propriétés migratoires et prolifératives (Cai *et al.* 2015 ; Rybalkin *et al.* 2002). La présence de la PDE1C est donc un marqueur de prolifération dans les CMLV et elle est d'ailleurs retrouvée dans les lésions athérosclérotiques, où l'expression des PDE3 et PDE4 est diminuée (Rybalkin *et al.* 2002). Quant à la PDE1A son activation bloque la relaxation des CMLV GMPc-dépendante (Nagel *et al.* 2006).

c) *La phosphodiestérase 3*

La structure de la PDE3 est assez unique, elle possède plusieurs sites de phosphorylation pour la PKA ou la PKB régulant son activation et six hélices hydrophobiques à son extrémité N-terminale correspondant à des domaines transmembranaires (Conti and Beavo 2007) (*Figure I15*). La PDE3 est codée par deux gènes, PDE3A et PDE3B qui ont respectivement trois et un variants. Ces variants diffèrent par le nombre de sites de phosphorylations et par la présence ou non des segments hydrophobes sur le domaine N-terminal (*NHR1 et NHR2*) assurant l'adressage de la PDE3 à la membrane plasmique. L'isoforme longue PDE3A1 affiche deux domaines NHR1 et NHR2 lui conférant une localisation exclusivement membranaire et 3 sites de phosphorylation pour les PKA et B (Shakur *et al.* 2000). La PDE3A2, plus petite,

possède uniquement le domaine NHR2 et deux sites de phosphorylation pour la PKA. Elle peut adopter une localisation membranaire mais aussi cytosolique. La PDE3A3 ne possède ni domaines NHR, ni site de phosphorylation, sa localisation est donc exclusivement cytosolique (Choi *et al.* 2001). La PDE3B1 est une isoforme longue présentant une structure similaire à celle de la PDE3A1, sa localisation est aussi membranaire et elle peut être phosphorylée par la PKA, la PKB et la PI3K (Omori and Kotera 2007). La PDE3A est l'isoforme retrouvée majoritairement dans les CMLV. Elle possède une très haute affinité pour l'AMPc et le GMPc (*Tableau I6*) mais la vitesse maximale d'hydrolyse du GMPc par la PDE3 est très faible ce qui suggère que le GMPc agit comme un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'AMPc (Degerman *et al.* 1997). La PDE3 est la principale PDE chargée d'hydrolyser l'AMPc dans les CMLV contractiles (Hubert *et al.* 2014a), mais cette activité diminue au profit d'une activité PDE4 lorsque les CMLV adoptent un phénotype synthétique ou qu'elles sont mises en culture (Zhai *et al.* 2012a).

d) La phosphodiestérase 4

La PDE4 est codée par 4 gènes (PDE4A, PDE4B, PDE4C et PDE4D) et plus d'une vingtaine de variants sont produits par épissage alternatif et par utilisation de plusieurs sites d'initiation de la transcription (Houslay *et al.* 2007). Les PDE4 se distinguent des autres PDE par la présence de deux domaines très conservés UCR 1 et 2 (*Upstream Conserved Region*) (*Figure I15*), intervenant dans la régulation de l'activité enzymatique, la dimérisation des PDE4 et l'adressage subcellulaire en interagissant avec les protéines d'échafaudages AKAPs (Richter and Conti 2002; Omori and Kotera 2007). Les formes longues de PDE4 portent les domaines UCR1 et UCR2, les formes courtes uniquement le domaine UCR2 et les formes super-courtes, une forme tronquée du domaine UCR2. La phosphorylation par la PKA d'une sérine dans le domaine UCR1 stimule l'activité des formes longues de la PDE4 en rompant l'interaction des UCR1 et UCR2, permettant alors l'association de UCR2 avec le domaine catalytique (Lim 2019; MacKenzie *et al.* 2002). Un autre site de phosphorylation sur le domaine C-terminal de toutes les PDE4 sauf la PDE4A est disponible pour la protéine ERK (*extracellular signal-regulated kinases)*. La phosphorylation par ERK exerce un effet inhibiteur sur l'activité des formes longues, et un effet activateur sur celle des formes courtes (Baillie *et al.* 2000). La PDE4 hydrolyse spécifiquement l'AMPc avec une affinité

moyenne (*Tableau I6*). Les isoformes majoritairement exprimées dans les CMLV de rats en culture sont les PDE4A, B et D et parmi elles l'activité de la PDE4D est majoritaire. L'une des voies de production majeure d'AMPc dans les CMLV est régulée par la PDE4, en effet la production d'AMPc en réponse à une stimulation des récepteurs β-adrénergiques par de l'isoprotérénol est régulée par la PDE4 principalement (Zhai *et al.* 2012a). De plus l'interaction de la PDE4 avec les AKAP ou encore les β-arrestines contribue à la désensibilisation des récepteurs β-adrénergiques (Fertig and Baillie 2018). Une dérégulation de l'activité PDE4 ou PDE3 dans les CMLV est impliquée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, on peut citer en autres l'hypertension systémique (Fan *et al.* 2022; Bobin *et al.* 2016).

Famille	Gène	Substrats	Km (µM)	Régulation	Distribution
PDE1	**PDE1A**	AMPc	73-120	Stimulée par Ca^{2+}/CaM	Cerveau, CMLV, Cœur, Testicules
		GMPc	2,5-5		
	PDE1B	AMPc	10-24		
		GMPc	1,2-5,9		
	PDE1C	AMPc	0,3-1,2		
		GMPc	0,6-2,2		
PDE3	**PDE3A**	AMPc	0,02-0,15	Stimulée par PKA/PKB Inhibée par GMPc	CMLV, Cœur, Tissu adipeux, plaquettes
		GMPc	0,18		
	PDE3B	AMPc	< 1		
		GMPc	< 1		
PDE4	**PDE4A**	AMPc	2,9-10	Stimulée par le PKA Stimulée par ERK formes courtes) Inhibées par ERK (formes longues)	Ubiquitaire
	PDE4B				
	PDE4C				
	PDE4D				

Tableau I 6. Principales PDE exprimées dans les CMLV et leurs propriétés

Adapté d'après (Omori and Kotera, 2007)

IV.2.4. *Les MRP*

Un autre mécanisme complémentaire aux PDE permet de diminuer le niveau intracellulaire d'AMPc en le faisant sortir de la cellule, il s'agit des *Multidrug resistance proteins* ou MRP, appartenant à la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding Cassette*). Ce sont les formes courtes des canaux MRP (*MRP 4, 5 et 8*) qui sont impliquées dans l'extrusion de l'AMPc ou du GMPc (Chen *et al.* 2001; Sassi *et al.* 2008; Guo *et al.* 2003; Sodani *et al.* 2012). L'extrusion de l'AMPc par les MRP n'est active que quand sa production est excessive, de l'ordre de 1mM de nucléotides cycliques (Borst *et al.* 2007). Aussi, son activité n'est donc

détectable expérimentalement que lors d'une activation prolongée des AC. De plus, ni la surexpression ni l'inhibition de ces transporteurs n'affectent significativement les niveaux d'AMPc ou de GMPc globaux (Sodani *et al.* 2012), ce qui suggère que ces régulations par les MRP se produisent dans des microdomaines.

IV.2.5. *Les effecteurs de l'AMPc*

La transduction du signal AMPc s'effectue au travers de trois voies d'action médiées par la protéine kinase A (*PKA*), les facteurs d'échanges de nucléotides guanyliques activés par l'AMPc (*Epac*) ou les canaux ioniques activés par les nucléotides cycliques (*CNG*).

a) PKA

La PKA est le principal effecteur de l'AMPc. C'est une enzyme qui permet la phosphorylation des protéines cibles sur leur résidus sérine ou thréonine (sérine/thréonine kinase). C'est un tétramère constitué par deux sous unités régulatrices (R) et deux sous unités catalytiques (C) maintenues dans une conformation inactive par les sous unités R. La PKA est activée par la liaison de 2 molécules d'AMPc sur chaque sous unités R, ce qui induit un changement conformationnel permettant la dissociation des sous unités C monomériques et les rendant capable d'aller phosphoryler leurs substrats cytosoliques (MLCK, AC, PDE, récepteurs, canaux ioniques, etc) ou nucléaires (CREB- *CRE binding protein* et séquences CRE-*cAMP-responsive elements*) (Taylor *et al.* 1992). L'activité catalytique de l'enzyme peut être inhibée par un inhibiteur des protéines kinases (PKI), qui peut aussi servir de protéine chaperonne en stimulant l'export nucléaire de la sous unité C et ainsi limiter l'action nucléaire de la PKA.

Les PKA sont classées en deux groupes, les PKA de type I ou de type II selon la nature de leurs sous unités R, respectivement RI ou RII (Skålhegg and Taskén 1997). Les deux types de PKA diffèrent par leur sensibilité à l'AMPc, la PKA-I (constante d'activité K_{act} = 50-100nM) est quatre fois plus sensibles à l'AMPc que la PKA-II (K_{act} = 200-400nM) (Pidoux and Taskén 2010), et par leur distribution cellulaire, la PKA-I est soluble et cytosolique alors que la PKA-II est retrouvée dans les compartiments subcellulaires grâce à son interaction avec les protéines d'ancrage de la PKA (AKAP). Cependant certaines AKAP sont capables de lier la PKA-I et -II, tandis que d'autres sont spécifiques de la PKA-I. Quatre isoformes de sous unités

R (RIα, RIβ, RIIα et RIIβ) et 4 isoformes de sous unités C (Cα,Cβ, Cγ, PRKX) ont été identifiées, ainsi différentes combinaisons de sous unités R et C sont possibles ce qui génère plusieurs PKA différentes. Cette diversité des PKA contribue à la diversité et à la spécificité des réponses cellulaires de l'AMPc (Taskén and Aandahl 2004).

b) Epac

Les facteurs d'échange Epac (*Exchange protein directly activated by cAMP*) ou cAMP-GEF (cAMP-guanine nucleotide exchange factor) découverts à la fin des années 1990, constituent une autre voie de transduction du signal AMPc (Kawasaki *et al.* 1998; de Rooij *et al.* 1998). Il existe deux isoformes de la protéine Epac : Epac1 et Epac2. La protéine Epac1 est ubiquitaire mais avec une expression accrue dans le rein tandis que l'expression de la protéine Epac2 est plus spécifique du système nerveux central, des glandes surrénales et du pancréas. Les protéines Epac sont composées de deux domaines : un domaine régulateur sur la moitié N-terminale de la protéine et d'un domaine catalytique sur la moitié C-terminale. Dans sa conformation initiale, la sous unité régulatrice exerce un effet auto-inhibiteur sur la sous unité catalytique qui est constitutivement active. La liaison de l'AMPc sur la sous unité régulatrice d'Epac induit un changement de conformation qui démasque le site catalytique en C-terminal de la protéine, le rendant accessible aux petites protéines G. Ainsi, la liaison à l'AMPc lève l'inhibition de l'activité GEF d'Epac, permet l'échange GDP/GTP et active les petites protéines G de la famille Ras : Rap1 et Rap2 (Bos 2006).

Les protéines Epac et PKA sont les principaux effecteurs de l'AMPc et malgré des voies de transduction indépendantes, ils régulent souvent les mêmes fonctions physiologiques (prolifération, adhérence cellulaire, sécrétion etc). De plus, leurs liaisons à diverses protéines d'échafaudage assurent la compartimentation spatiale et la régulation temporelle de leur activité et ainsi la spécificité des signaux AMPc transmis (Breckler *et al.* 2011).

c) CNG

Les canaux CNG (*Cyclic Nucleotides gated channel*) sont des canaux ioniques non sélectifs activés par la liaison des nucléotides cycliques AMPc et GMPc. Ils sont perméables aux cations Na^+, K^+ et Ca^{2+} (Kaupp and Seifert 2002). Les CNG sont formées par quatre sous unités organisées autour d'un pore central assurant le passage des ions. Chaque sous unité

comporte six domaines transmembranaires reliés à un domaine N-terminal et un domaine C-terminal cytosoliques. L'ouverture du canal est déclenchée par la liaison d'une molécule d'AMPc au niveau d'un site spécifique sur le domaine C-terminal. Si le canal peut lier jusqu'à 4 molécules d'AMPc, une seule suffit à l'activer. Deux catégories de sous unités composent le canal, les CNGA (4 membres) et les CNGB (2 membres). Selon la nature des sous unités composants le tétramère, la perméabilité et l'affinité pour les nucléotides cycliques varient. Leur activité est modulée d'une part par la concentration en nucléotides cycliques et d'autre part par le Ca^{2+} qui en se liant à l'intérieur du pore bloque le passage des autres cations monovalents (Kaupp and Seifert 2002; Biel and Michalakis 2009).

IV.3. Signalisation Calcique

Le niveau de calcium au sein d'une cellule contractile doit être finalement régulé, et ce processus est appelé homéostasie calcique. De nombreux mécanismes participent au maintien de la concentration basale de calcium intracellulaire aux alentours de 100nM. La présence de calcium extracellulaire à une concentration beaucoup plus élevée (2mM) est très importante car il permet à la contraction initiée d'être amplifiée et maintenue dans le temps.

IV.3.1. *Rôle du calcium dans les CMLV*

Le calcium est un élément crucial pour l'équilibre et les fonctions multiples de la CMLV. Sa fonction principale est de réguler la contraction, ce qui a été déjà présenté en partie II de l'introduction. Par ailleurs, la régulation de la fonction contractile par le calcium est souvent associée à la formation d'un complexe Ca^{2+}-calmoduline. La calmoduline (CaM) étant une petite protéine servant d'amplificateur du signal calcique. Sa liaison au calcium change sa conformation et lui donne la capacité de s'associer à ses protéines cibles (telle que la MLCK), levant ainsi leur auto inhibition et modifiant leur site actif.

Le calcium a pourtant d'autres rôles dans la CMLV : entre autres i) il assure la rigidité des CMLV et leur adhérence à la MEC (Zhu *et al.* 2019), ii) il contrôle la migration (Espinosa-Tanguma *et al.* 2011) et la prolifération (Potier *et al.* 2009).

IV.3.2. *Régulateurs de l'homéostasie calcique*

Les quatre mécanismes impliqués dans le contrôle de la $[Ca^{2+}]_i$ sont l'influx, l'efflux, la libération depuis les stocks et le recapture du calcium vers les stocks. Le flux de Ca^{2+} vers (influx) et hors (efflux) du cytoplasme est rendu possible, respectivement, par des récepteurs canaux perméables au Ca^{2+} et des transporteurs actifs qui permettent le mouvement du Ca^{2+} contre le gradient de concentration. Des récepteurs et pompes localisés à la membrane des lieux de stockage intracellulaires de Ca^{2+} permettent la libération de Ca^{2+} (vers le cytoplasme) et la recapture (dans le stock). Le réticulum endoplasmique (RE) est la principale réserve intracellulaire de Ca^{2+}, même si les mitochondries jouent également un rôle dans le stockage du Ca^{2+}. L'action en synergie de ces multiples mécanismes cellulaires (canaux d'entrée de Ca^{2+}, transporteurs d'efflux, pompes et récepteurs permettant la libération et pompes de recapture) est indispensable pour l'homéostasie du Ca^{2+} (Clapham 2007). Dans cette partie, les différents acteurs de cet équilibre calcique sont présentés sur la *Figure I16* (Clapham 2007; Liu and Khalil 2018).

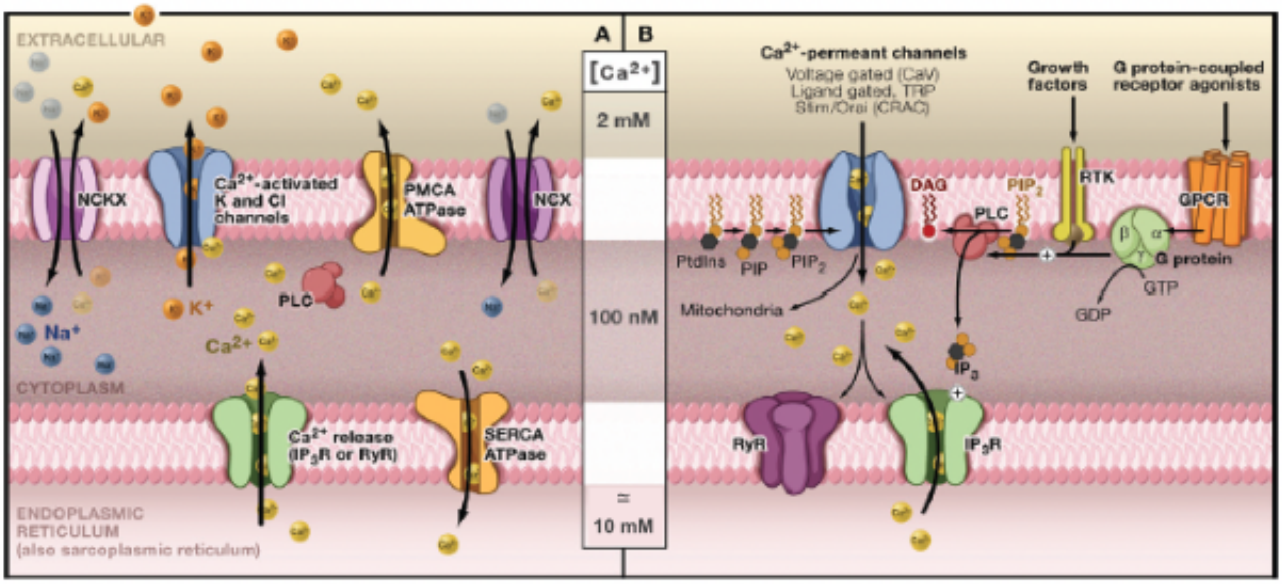


Figure I 16. Représentation des acteurs du maintien de l'homéostasie calcique

Schéma adapté depuis (Clapham, 2007)

a) Influx calcique

Les canaux calciques voltages dépendants (VGCC ou VOC) sont activés en réponse à une dépolarisation de la membrane calcique et forment la première voie d'entrée de calcium dans la cellule. Deux types de VGCC sont exprimés par les CMLV, les canaux voltage dépendants de type L (*LTCC ou L type Cav 1.2*) et les canaux calciques de type T (*TTCC ou Cav 3.x*). Les canaux Cav 1.2 sont activés par une forte dépolarisation (-30mV) et s'inactivent lentement alors que les canaux Cav 3 sont activés par de plus faibles dépolarisations (-60 à -50mV) et s'inactivent rapidement. La fonction des Cav3 varie selon l'isoforme : les Cav 3.1 et 3.3 contrôlent le tonus myogénique alors que les Cav 3.2 exercent un contrôle négatif sur la relaxation en activant les canaux potassiques BK_{Ca} (VanBavel *et al.* 2002), canaux potassiques activés par la dépolarisation et le Ca^{2+}.

Les canaux calciques contrôlés par des récepteurs (ROC) sont comme leur nom l'indique activés par la stimulation d'un récepteur et recrutent d'autres voies d'influx calcique que celles activées par la dépolarisation membranaire. Trois voies de signalisation conduisent à l'ouverture de ces canaux : soit i) le récepteur et le canal sont une seule et même molécule donc la liaison d'un agoniste les active (canaux ionotropiques), soit ii) une hormone se lie à un RCPG et le couplage via une protéine G (sous unité $G\alpha$ ou β/γ) entraine l'ouverture du canal, soit iii) un second messager de ces récepteurs (AMPc, GMPc) les active directement ou une de leur kinases respectives (PKA, PKG) les phosphoryle.

Les canaux calciques dépendants des stocks (SOC) sont sensibles à la concentration en calcium dans le RE et lorsque ces stocks deviennent insuffisants suite à une libération de calcium, les SOCs s'activent. Ce sont des canaux dits « capacitatifs » car ils redonnent à la cellule sa capacité à produire une signalisation complète et efficace par un processus appelé entrée capacitative de calcium (*CCE : Capacitative Calcium Entry*) (Earley and Brayden 2015). Plus précisément la molécule STIM1 (*Stromal Interacting Molecule 1*) sert de senseur calcique au niveau des stocks intracellulaires et lorsqu'une déplétion a lieu, STIM 1 est relocalisée à la membrane plasmique où elle recrute soit le canal TRPC1 (Roos *et al.* 2005) soit Orai (Navarro-Borelly *et al.* 2008) et provoquent l'entrée de calcium extracellulaire. La Thapsigargine, un inhibiteur de la pompe SERCA (présentée dans la *partie IV.3.2c*), en

empêchant la recapture du calcium appauvrit les stocks intracellulaires et forcent l'activation du système STIM1 et Orai. Ainsi elle est souvent utilisée pour montrer l'implication des SOCs dans l'influx calcique.

Les canaux cationiques non sélectifs TRP (*Transient Receptor potential*) sont aussi présents dans les CMLV et représentent la première voie d'influx de calcium non voltage dépendante. Malgré leur dénomination « non sélectifs » (perméables au Ca^{2+}, Na^{+}, Mg^{2+}), ces canaux peuvent avoir des affinités ou être inhibés par l'un ou l'autre de ces cations. On dénombre six familles de TRP (*TRPC, TRPV, TRPM, TRPA et TRPL*) avec des fonctions et modes d'activation différents. Leur niveau d'expression varie en fonction du vaisseau, par exemple pour les TRPC : TRPC1 et TRPC6 sont les isoformes majoritaires et sont retrouvés dans tous les vaisseaux alors que TRPC3 est fortement exprimé dans les artères cérébrales et rénales, et TRPC4 est moins exprimé dans l'aorte, les artères cérébrales ou mésentériques, mais d'une façon générale tous les types de TRP sont retrouvés dans les vaisseaux. Ces canaux sont activés après une stimulation des ROCs ou des SOCs, ils sont d'ailleurs parfois considérés à tort comme des SOCs, alors qu'ils ne sont pas capables de détecter et d'être activés par une déplétion des stocks calciques (Earley and Brayden 2015).

Enfin quelques canaux sensibles à un stress mécanique, les stretch activated Ca^{2+} channel sont exprimés dans les CMLV. Au cours de l'autorégulation du débit sanguin, une élévation de la pression intravasculaire entraine un étirement de la paroi vasculaire, qui est détecté par les stretch activated Ca^{2+} channel. Ces canaux activés, permettent alors l'entrée de calcium extracellulaire et favorisent la contraction. Les TRPC6, TRPV2 et TRPV4 font partie de ce type de canaux (Liu and Khalil 2018).

b) Libération de calcium depuis les stocks intracellulaires

Le principal compartiment de stockage du calcium dans la cellule est le réticulum endosplasmique (environ 10-15 mM de calcium), puis on retrouve la mitochondrie (Sanders 2001). La libération de calcium depuis les stocks intracellulaires fait suite à une stimulation des RCPG par un agent vasoconstricteur (Angiotensine II, Endothéline I, Phényléphrine, etc).

Deux types de récepteurs canaux situés à la membrane du RE sont en charge de cette libération : le récepteur à l'IP_3 (IP_3R) et le récepteur à la Ryanodine (RyR).

Le récepteur à l'IP_3 est un récepteur canal tétramérique de 300kDa activé par sa liaison à l'IP_3. L'IP_3 est produit suite à une activation de la voie $G\alpha q$ conduisant à l'hydrolyse par la PLCβ du phosphatidyl inositol 4,5 bi-phosphate (PIP_2) en diacyl glycérol (DAG) et inositol 1,4,5 tri-phosphate (IP_3) à la membrane plasmique. L'IP_3 grâce à son caractère hydrophile se lie à l'IP_3R exprimé à la surface du RE, alors que le DAG, en raison de ses deux résidus d'acides gras, reste ancré à la membrane et active la PKC. Pour une molécule d'IP_3, le récepteur libère 3 ions Ca^{2+}, ce qui fait augmenter la $[Ca^{2+}]_i$. L'ouverture du canal est potentialisée par une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ à environ 300nM mais le calcium exerce également un rétrocontrôle négatif sur l'activation de l'IP_3R lorsque les concentrations sont trop élevées. Sous l'action de phosphatases, l'IP_3 va être retransformé en Inositol (IP_3->IP_2->IP->inositol) qui va être réassocié au DAG pour reformer du phosphatidyl inositol (PI) à la membrane plasmique. Le métabolisme des inositol phosphates participe donc également à la régulation de cette libération de calcium depuis les stocks (Harraz and Jensen 2021).

Les récepteurs à la ryanodine (RyR), activés par la caféine ou le calcium cytoplasmique sont souvent associés à des mécanismes de Calcium-Induced Calcium-Released (CICR) dans le muscle cardiaque et squelettique alors que dans la CMLV son rôle est moins clair. Les isoformes RyR2 et RyR3 sont exprimées dans les CMLV. Cependant l'existence d'un mécanisme CICR dans la CMLV est très controversé puisqu'il nécessite une $[Ca^{2+}]_i$ supérieure à 3 µM au voisinage du RE, ce qui même au pic d'excitabilité des CMLV est difficile à atteindre (Liu and Khalil 2018; Clapham 2007). Un influx calcique depuis la mitochondrie est plus rare mais peut se produire au travers d'antiport Ca^{2+}/H^+ ou Ca^{2+}/Na^+ (Puskin *et al.* 1976).

c) Recapture du calcium vers les stocks intracellulaires

En condition physiologique, le réticulum endoplasmique joue un rôle majeur dans le maintien du niveau basal de calcium dans l'espace cytosolique alors que la mitochondrie intervient dans la régulation des très fortes concentrations calciques. En effet, l'affinité de la recapture du calcium par le RE est plus grande (Km = 1µM) que celle de la mitochondrie (Km = 10-17µM), ce qui justifie que la mitochondrie ne recapture le calcium que lorsque sa

concentration dépasse les 5µM dans la cellule et c'est ce qui en fait un lieu de stockage secondaire (Somlyo and Somlyo 2002; Yamamoto and van Breemen 1986).

La recapture du calcium se fait au niveau du RE par **SERCA une pompe Ca^{2+}/ATPase**. Les isoformes SERCA 2b et SERCA 3 sont exprimées dans les CMLV et ont une forte affinité pour le calcium (Km = 0,2 – 0,6µM) (Liu and Khalil 2018). La pompe SERCA est constitutivement inhibée par le phospholamban (PLB), et seule la phosphorylation par la PKA ou la PKG du PLB permet de lever cette inhibition. Une fois activées, les pompes SERCA utilisent l'énergie d'une molécule d'ATP pour faire entrer 2 ions Ca^{2+} dans le RE et ces ions calcium sont séquestrés (tamponnés) par la calréticulin et la calsequestrine dans le RE.

Le rôle de la **mitochondrie** dans la régulation calcique n'est pas complètement élucidé mais il a été démontré que l'entrée de calcium se fait via à un uniport Ca^{2+} guidé par un potentiel de membrane très négatif (crée par la libération de protons depuis la chaine mitochondriale) (Kirichok *et al.* 2004). A la différence du RE, cette recapture ne se fait qu'à de fortes concentrations, elle prend donc le relai quand le RE est saturé. De plus, de par sa proximité avec le RE, elle pourrait empêcher l'IP_3R de s'inactiver après une libération de calcium, en absorbant le surplus et ainsi préserver sa sensibilité (Sanders 2001).

d) Efflux calcique

Enfin, pour arrêter l'influx calcique au cours d'évènements excitateurs la cellule doit en plus de la recapture, faire sortir l'excédent de calcium du cytoplasme et restaurer l'homéostasie. Les efflux sont réalisés par la **pompe Ca^{2+}/ATPase PMCA** (*Plasma membrane Ca^{2+}/ATPase*) et **l'échangeur Na^+/Ca^{2+} NCX** (*Na^+/Ca^{2+} exchanger*) contre le gradient (Sanders 2001).

La pompe PMCA, tout comme la pompe SERCA utilise l'énergie d'une molécule d'ATP pour faire sortir un ion Ca^{2+}.

L'échanger NCX, permet d'échanger un ion Ca^{2+} contre 3 ions sodium Na^+. Elle fonctionne contre les gradients transmembranaires de sodium et de calcium, ainsi qu'avec le potentiel de membrane.

e) Compartimentalisation du signal calcique

Tous les mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique évoqués précédemment régulent les mouvements du calcium à l'intérieur de la cellule, mais les signaux calciques à l'origine de ces mouvements sont parfois très localisés créant une compartimentalisation du signal (*Figure I17*).

Ils ont été classifiés en 4 types de signaux (Brozovich *et al.* 2016) :

- **Ca^{2+} sparklet** : Augmentation locale de la $[Ca^{2+}]i$ résultant d'un influx calcique depuis un ou plusieurs L type calcium channel (LTCC). L'effet des sparklets sur la contractilité dépend du nombre de LTCC et de la persistance du signal.
- **Ca^{2+}sparks** : Libération de calcium importante et restreinte aux RyRs, qui comme pour les sparklets n'a pas d'effet direct sur la contractilité. Ces sparks peuvent activer les PMCA et les BK_{Ca} et ainsi induire l'hyperpolarisation de la membrane mais en activant des canaux chlore dépendants ils pourraient également augmenter l'influx calcique à travers les LTCC.
- **Ca^{2+} Waves** : Augmentation du calcium par vagues dont la première est déclenchée par une libération de calcium intracellulaire depuis les stocks via les IP_3R et les RyRs, suivie d'une deuxième vague de calcium extracellulaire à travers les canaux activés par le calcium à la membrane.
- **Calcium Capacitative entry (CCE)** : Entrée de calcium via les SOCs grâce à l'interaction de STIM1 et Orai à la membrane plasmique.

Cette compartimentalisation est essentielle car elle évite toute contraction aléatoire et dérégulée de la cellule.

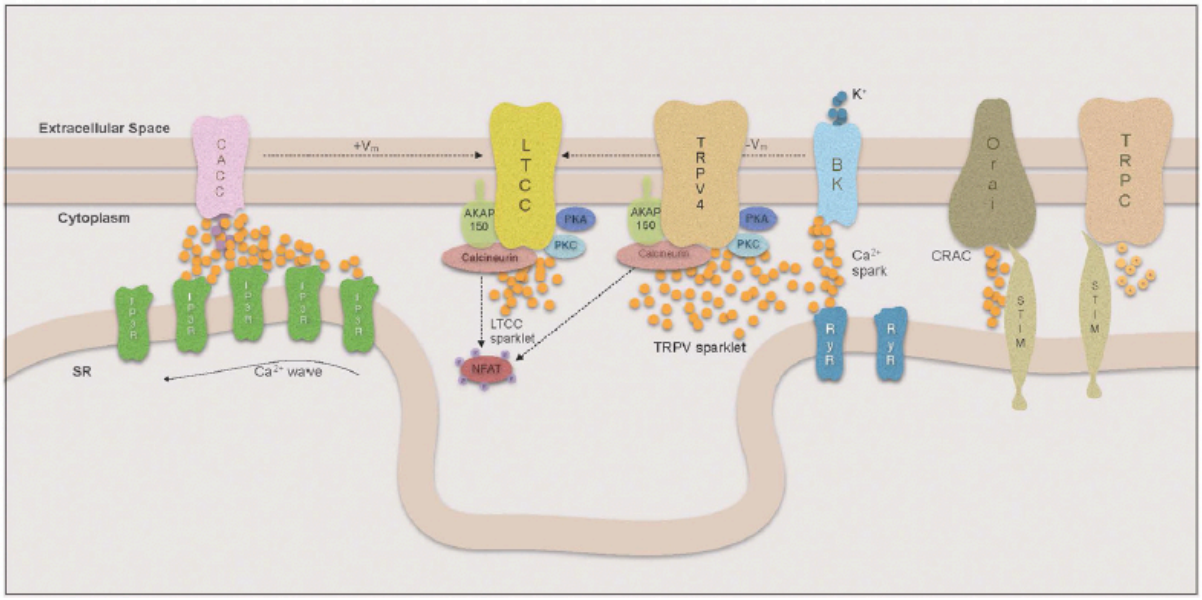


Figure I 17. Compartimentalisation du signal calcique

D'après (Brozovich *et al.*, 2016)

IV.4. De multiples interactions au cœur de la signalisation RCPG

L'AMPc et le calcium (Ca^{2+}) sont avec certitude les deux principaux seconds messagers qui contrôlent l'homéostasie cellulaire. Même si, l'oxyde nitrique (NO) et le GMPc peuvent remplir des fonctions essentielles dans plusieurs situations physiologiques, l'AMPc et le Ca^{2+} sont les seuls seconds messagers réellement ubiquitaires et omniprésents d'un point de vue fonctionnel. La communication entre ces deux voies débute au niveau des RCPG, du ligand activateur et de la nature des sous unités de la protéine G recrutée, qui vont alors orienter la réponse cellulaire vers une de ces voies (Vaibhav Dhyani et al 2020).

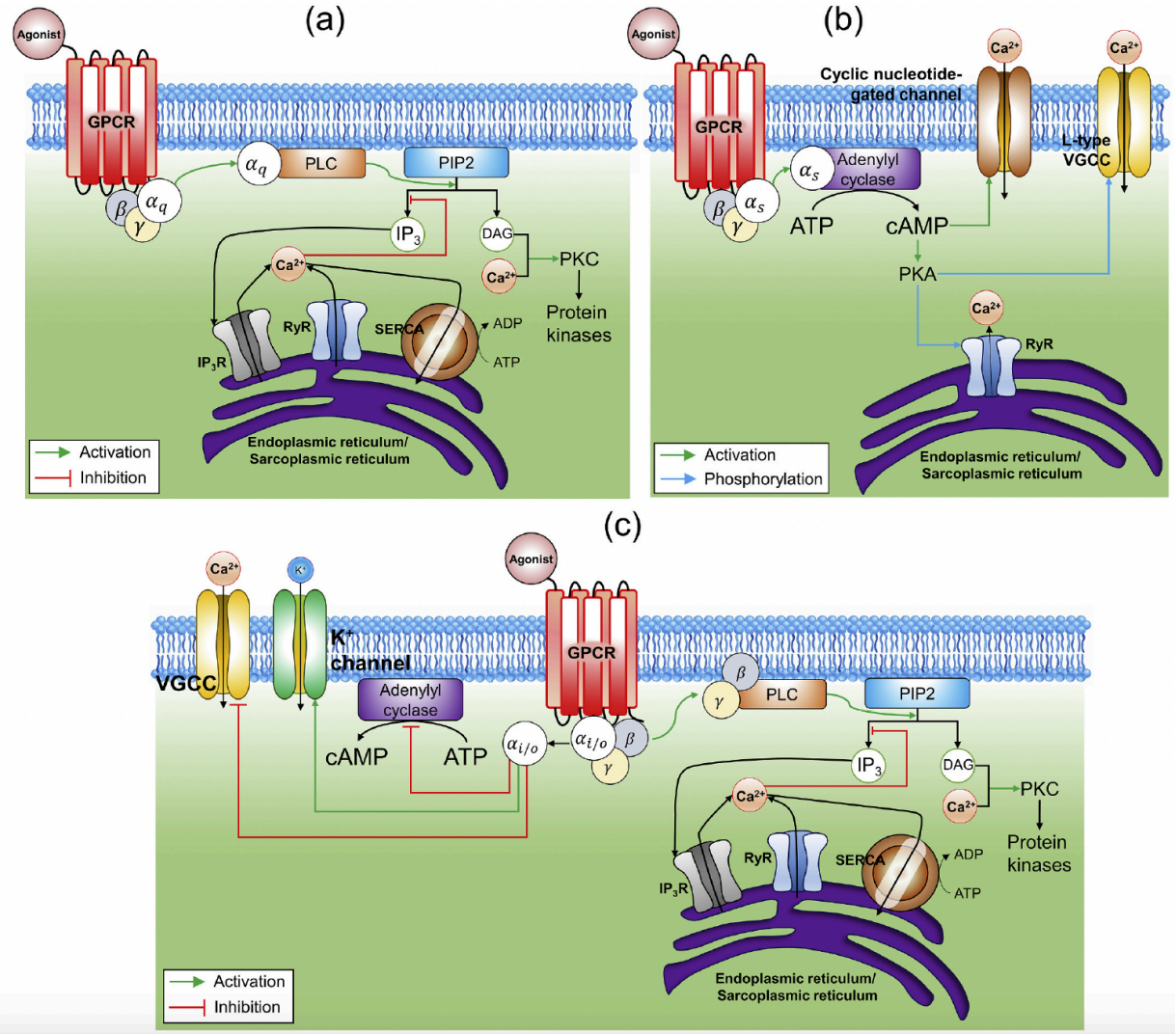


Figure I 18. Voies de signalisations et mécanismes moléculaires contrôlant les niveaux d'AMPc et de Calcium dans les CMLV

D'après (Vaibhav Dhyani *et al,* 2020)

Ces deux voies interagissent en permanence au travers de leurs seconds messagers ou des effecteurs en aval, et l'interaction qui en résulte est soit activatrice, soit inhibitrice. Entre autres, le calcium et les acteurs de sa signalisation peuvent moduler l'activité des Adenylyls Cyclases ou des PDE, régulant alors le niveau d'AMPc intracellulaire. Il a d'ailleurs été montré que des hormones stimulant la voie calcique et l'augmentation de calcium intracellulaire peuvent inhiber la production d'AMPc par le biais des AC (Boyajian *et al.* 1991; Garritsen *et al.* 1992) Tandis que l'AMPc à travers ses protéines kinases inhibe les canaux calciques en charge de l'influx calcique et active la recapture du calcium vers les stocks par SERCA, le tout résultant en une diminution du niveau de calcium intracellulaire. Certaines protéines sont par nature à l'interface entre les deux voies car elles sont activées par l'une et inhibées par

l'autre. On peut citer : i) la PDE1, activée par le calcium et qui dégrade l'AMPc, ii) l'AC1 ou l'AC8 activées par le calcium également mais qui produisent de l'AMPc, iii) les canaux calciques de type ROC pouvant être activés par phosphorylation par la PKA, elle-même activée par l'AMPc.

D'un point de vue fonctionnel ces deux voies exercent souvent des effets opposés. Si l'on prend l'exemple du contrôle de la contractilité des CMLV et plus précisément de l'état de phosphorylation de la MLC_{20}, l'AMPc est vasodilatateur alors que le calcium est vasoconstricteur. De même pour le maintien de l'état différencié et contractile des CMLV, l'AMPc favorise un phénotype contractile et quiescent tandis que le calcium favorise la migration donc un phénotype synthétique (Espinosa-Tanguma *et al.* 2011). Enfin, que l'équilibre entre ces deux voies soit dérégulé ou que seule l'une des deux voies le soit, cela conduit au développement de nombreuses pathologies vasculaires.

OBJECTIFS DES PROJETS DE THESE

Les objectifs de ce projet sont d'identifier et d'étudier les altérations des cellules musculaires lisses vasculaires impliquées dans le développement de l'Athérosclérose et la Resténose post-angioplastie et dans la Maladie d'Alzheimer (MA) et les Angiopathies Amyloïdes Cérébrales (AAC). Ces altérations vasculaires peuvent résulter d'une altération phénotypique des CMLV dans l'athérosclérose ou d'une altération de la contractilité des CMLV dans la MA/AAC. Parmi les nombreux mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces pathologies, les voies AMP cyclique et calcique jouent un rôle central.

PARTIE 1 : PROJET AC8E et Athérosclérose

L'AMPc, à travers ses propriétés anti-inflammatoires, anti-migratoires et anti-prolifératives, permet le maintien de l'état différencié des CMLV. Ainsi, une diminution du niveau d'AMPc favorise la transdifférenciation des CMLV et contribue ainsi aux remodelages vasculaires pathologiques tels que l'Athérosclérose et la resténose post-angioplastie (Gueguen *et al.* 2010b). Depuis une quinzaine d'années, l'équipe d'Isabelle Limon s'intéresse plus particulièrement à une Adenylyl Cyclase, l'AC8, dont l'expression est induite dans les CLMV en contexte inflammatoire (Gueguen *et al.* 2010b; Keuylian *et al.* 2012). Plus récemment, l'équipe a démontré par une approche d'imagerie de biosenseurs, permettant de mesurer en temps réel et sur cellules vivantes, que l'expression de cet AC8 était associée à une diminution de la production d'AMPc et favorisait la transition phénotypique des CMLV. Le clonage de l'AC8 exprimée dans les CMLV inflammatoires a révélé l'existence d'une nouvelle famille de variants de l'AC8, issus d'un épissage alternatif et se comportant en dominants négatifs (Vallin *et al.* 2018). Au cours de ma première partie de thèse, j'ai poursuivi les travaux de Yohan Legueux-Cajgfinger visant à caractériser le mode de fonctionnement de l'AC8E, le principal variant de l'AC8 exprimé dans les CMLV transdifférenciées en conditions inflammatoires. L'objectif de ce travail a été de :

i) Étudier *in vitro*, la capacité de cet AC8E à former des hétérodimères avec les adenylyls cyclases des autres familles et à inhiber leur activité.

ii) Identifier les domaines d'interaction potentiels entre l'AC8E et d'autres cyclases par une approche de criblages de domaines d'interaction (PEPscan).

iii) Construire un modèle 3D prédictif de l'AC8E, en collaboration avec l'UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Université de Reims Champagne Ardenne, afin de comprendre les différences structurelles et donc potentiellement fonctionnelles entre l'AC8 pleine taille et l'AC8E.

iv) Valider par des approches *in vitro*, les données obtenues à partir des modèles 3D.

v) Développer une stratégie de peptides interférents, afin d'établir une preuve de concept thérapeutique pour limiter les effets de l'AC8E sur les remodelages vasculaires pathologiques.

Comme je le développerai dans ce manuscrit, trois des cinq objectifs (i, iii et iv) ont donné des résultats exploitables et ont conduit à une publication soumise à BBA : Mol Cell Research, et actuellement en révision, dans laquelle je suis co-premier auteur. Cependant, malgré des résultats prometteurs obtenus par Yohan Legueux-Cajgfinger sur l'identification des régions impliquées dans la formation des hétérodimères AC8E/AC, la stratégie de peptides interférents que j'ai menée n'a pas donné de résultats satisfaisants et sera présentée en supplément de l'article soumis.

PARTIE 2 : PROJET Altération de la vasoréactivité des CMLV dans la Maladie d'Alzheimer et les AAC

Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer et des Angiopathies Amyloïdes Cérébrales, les dépôts de peptides amyloïdes β conduisent à une altération de l'intégrité de la paroi vasculaire cérébrale entrainant une modification du tonus vasculaire (hypoperfusion) et des accidents vasculaires de type micro-hémorragiques, impliqués dans l'altération des fonctions cognitives. La tonicité vasculaire est régulée par l'état de contractilité des CMLV dépendant de l'état de phosphorylation de la MLC20 qui est sous le contrôle d'un équilibre entre deux seconds messagers : l'AMPc et le calcium. L'objectif de cette deuxième partie de ma thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'altération de la tonicité vasculaire associée aux dépôts amyloïdes. Pour réaliser cette étude, nous avons :

i) Étudié *in vitro* sur des cultures primaires de CMLV aortiques traitées ou non au peptide amyloïde β, les dynamiques de production d'AMPc par imagerie dynamique de biosenseurs et de calcium à l'aide d'une sonde chimique.

ii) Évalué l'implication de différents acteurs moléculaires dans les altérations observées par des approches pharmacologiques et moléculaires.

iii) Étudié *ex-vivo* les effets du peptide amyloïde sur la réactivité vasculaire des artères basilaires de rat à l'aide d'un wire-myographe.

iv) Développé un modèle de culture primaire de CMLV cérébrales de rat pour confronter les différences observées entre l'étude *in vitro* sur les CMLV aortiques (i et ii) et *ex vivo* sur les artères basilaires (iii).

Les résultats de cette étude seront présentés dans une seconde partie du manuscrit et conduira ultérieurement à la soumission d'un article en cours d'écriture, mais qui nécessite des expériences complémentaires.

MATERIELS & METHODES

I. Techniques conventionnelles

Au cours de ce travail de thèse, j'ai utilisé de nombreuses approches expérimentales mise au point dans le laboratoire avant mon arrivée et qui sont décrites dans le matériel et méthode de l'article soumis, ou dans des articles antérieurs de l'équipe (Gueguen *et al.* 2010b; Vallin *et al.* 2018; Vromman *et al.* 2013a; Blaise *et al.* 2012). Ces approches concernent la culture primaire d'aorte de rat et des cellules HEK, les techniques de transfection, de PCR quantitative (qPCR), de co-immunoprécipitation (IP), de Western Blot (WB) et d'immunofluoresence (IF). Les anticorps utilisés pour les WB, IP et IF sont listés dans le *Tableau S2*. Les agents pharmacologiques utilisés proviennent de Tocris Bioscience, Bristol, UK ou de Cayman Chemical, Michigan, USA ou de Lundbeck France et sont présentés dans le *Tableau S3*.

II. Culture Cellulaire

II.1. Milieux de culture

Au cours de ce travail de thèse, j'ai utilisé trois types de cultures cellulaires. Des cultures primaires de CMLV d'aorte de rats (rAoCMLV), des cellules HEK (Human Epithelial Kidney) et enfin des cultures primaires de CMLV de vaisseaux cérébraux (rBCMLV) que j'ai mis au point au laboratoire.

Les HEK sont maintenues en culture dans un milieu DMEM complet (4,5g/L glucose, 4mM Glutamax, 100 U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (FCS). Les rAoCMLV et rBCMLV sont cultivées dans un milieu DMEM (4,5g/L glucose, 4mM Glutamax, 100 U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine) avec respectivement 10% et 20% de FCS. La veille de tout traitement, les cellules sont mises à jeun dans leur milieu de culture respectif déplété en sérum (HEK et aoCMLV) ou appauvri en sérum (1% FCS pour les rBVSMC).

II.2. Culture primaire de CMLV cérébrovasculaires

II.2.1. *Mise au point de la culture primaire*

Le protocole mis au point pour la production de la culture primaire de CMLV cérébrovasculaires (rBCMLV) a été adapté de celui utilisé par *Diglio, et al en 1986* (Diglio *et al.* 1986) et utilise les différentes solutions suivantes :

	Réactifs	Concentration finale
Solution de séparation	HBSS (Ca^{2+}/Mg^{2+} free)	-
	Dextran MW : 70000-80000	15%
	SVF	5%
	Volume final solution	
Solution de dissociation	DMEM 1g/L glucose	-
	Elastase type III (4U/mg)	0,125 mg/ml = 11,25 U/mg
	Soybean trypsin inhibitor (type I-S)	0,375 mg/ml
	CaCl2 (1mM)	0,2 mM
	HEPES buffer (pH 7,2-7,3)	15 mM
	Collagenase (CLS Type I)	1 mg/mL
	BSA (Fraction V)	2 mg/ml
	Volume final solution	

Tableau M 1.Composition des solutions pour la culture primaire de CMLV cérébrovasculaires

Pour une préparation 6 rats Wistar mâles âgés de 5 semaines (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isles, France) ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (300mg/kg). Les rats sont décapités à l'aide d'une guillotine et la tête est placée sur glace. Le cerveau est extrait de la boite crânienne, le cervelet est retiré puis le cerveau est placé dans du HBSS (Ca^{2+}/Mg^{2+} free) à 4°C.

Nettoyage des hémisphères

Sous loupe binoculaire, les hémisphères cérébraux sont séparés afin de retirer la matière blanche à l'aide d'un scalpel et de retirer les méninges à l'aide de deux pinces droites. Une fois nettoyés, les hémisphères sont placés dans du HBSS (Ca^{2+}/Mg^{2+} free) à 4°C.

Broyage, Homogénéisation et récupération des micro vaisseaux

Les 12 hémisphères cérébraux sont ensuite émincés à l'aide d'une lame de rasoir et déposés dans un broyeur de tissus en verre (Set KIMBLE dounce Potter-Elvehjem PTFE pestle 0,0030-0,0060 in and glass tube 50mL) de 50mL contenant 20mL de HBSS dans la glace. Le tout est homogénéisé en faisant une vingtaine d'aller-retours avec le piston en rotation à 350 rpm (à l'aide d'une visseuse dont la vitesse a été calibrée à l'aide d'un tachymètre). L'homogénat est ensuite transféré dans un falcon de 50mL et centrifugé (3000xg, 10min). Le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans environ 35mL de solution de séparation (*Tableau M1*) avant d'être centrifugé à nouveau (3000xg, 10min). Le surnageant est jeté et le culot obtenu, constitué principalement de microvaisseaux, est resuspendu dans 25mL de HBSS (Ca^{2+}/Mg^{2+} free) à 4°C avant d'être filtré avec un tamis cellulaire en nylon (maillage 150 µM) et ce qui est resté sur le filtre (microvaisseaux) est récupéré et resuspendu dans du HBSS puis centrifugé (3000xg, 15min). Enfin la pureté de la préparation est vérifiée au microscope à contraste de phase où un mélange d'artérioles et d'artères doit être observé.

Digestion enzymatique

La préparation de microvaisseaux obtenue est transférée dans un falcon contenant la solution de dissociation (*Tableau M1*) est soumise à une digestion enzymatique avec agitation à 37°C pendant 1h (avec agitation manuelle supplémentaire toutes les 15min à la pipette). Des filaments fins sont observés à la fin de la digestion. La préparation est alors centrifugée (300xg, 10min) et le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans 10-15mL de milieu DMEM ((4,5g/L glucose, 4mM Glutamax, 100 U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine, 20% FCS).

Culture

L'intégralité du culot cellulaire obtenu à l'étape précédente est transféré dans une boite 100cm^2 et incubez sur la nuit à 37°C (95%O_2/5%CO_2). Le lendemain, la culture est rincée avec du HBSS pour retirer les cellules n'ayant pas adhérées et les fragments de vaisseaux restants et remettre du milieu de culture. Les cultures sont ensuite surveillées et le milieu changé tous les 3 jours jusqu'à confluence. Il faut compter environ 10 jours de culture pour obtenir une boite à confluence (appelée P0). Pour améliorer la croissance des cellules et promouvoir une meilleure adhérence, nous avons « coaté » la moitié des boites au collagène et comparé

avec/sans collagène. Le collagène améliore effectivement la prolifération cellulaire (*Figure M1*). Les cellules peuvent être congelées après deux passages (P2) et réutilisées après décongélation sans que cela n'altère ni leur phénotype ni leur réponse. Les cellules sont maintenues en culture jusqu'au passage 10 (P10) dans du milieu complet pour CMLV

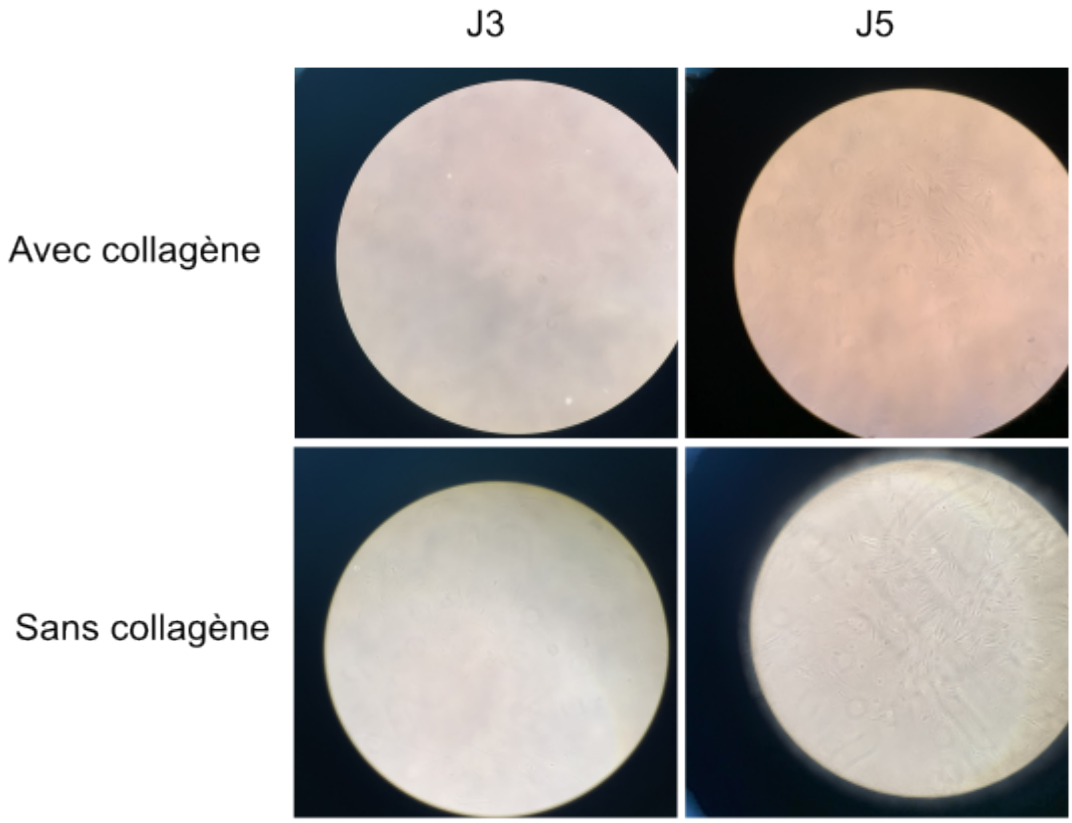


Figure M 1. Comparaison de la prolifération des rBCMLV avec ou sans matrice de collagène

Microscope à contraste de phase (Objectif 10x).

cérébrovasculaires.

II.2.2. *Phénotype des rbCMLV par immunofluorescence*

Nous avons ensuite vérifié l'expression d'un des marqueurs phénotypiques des CMLV, la SM22 par immunofluorescence.

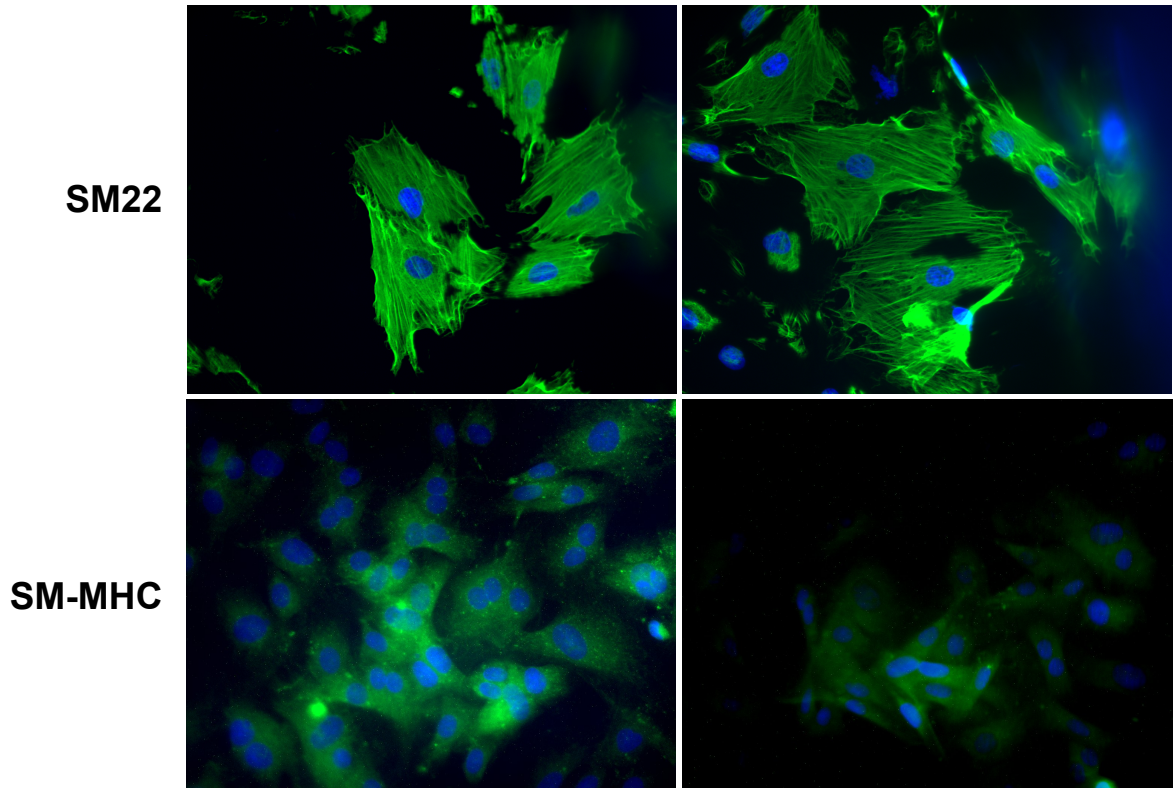


Figure M 2. Marquage phénotypique des rb-CMLV par immunofluorescence

Microscope à épifluorescence (objectif 40x). Marquage de la SM22 ou SM-MHC en vert et des noyaux au DAPI en bleu. Anticorps utilisés présentés dans le *Tableau S.2*.

II.3. Traitement des CMLV avec le peptide $A\beta_{1-40}$

Les peptides $A\beta_{1-40}$ (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV) ont été synthétisés par GeneCust (Luxembourg) et présentent une pureté comprise entre 95 et 98%. Les peptides conditionnés sous forme de poudre sont solubilisés au laboratoire dans de l'eau ultrapure à une concentration de 2mM puis sont stockés à -20°C. Les CMLV sont mises à jeun (Milieu complet sans SVF) au moins 12h avant d'être traitées par 50µM de peptide $A\beta_{1-40}$ pendant 48h.

III. Dynamique d'AMPc et Calcium

III.1. Imagerie de biosenseurs

L'analyse par imagerie dynamique d'AMPc a été rendue possible grâce à une collaboration initiée il y a douze ans par l'équipe d'Isabelle Limon avec l'équipe de Pierre Vincent, spécialiste dans le domaine. Les deux équipes ont fusionné en 2019. Nous avons utilisé le biosenseur ratiométrique ^{T}EPAC^{VV}, qui est un biosenseur protéique chimérique reposant sur le principe du FRET (transfert d'énergie par résonance de Förster), qui correspond à un transfert d'énergie non radiative d'un fluorophore donneur excité vers un fluorophore accepteur à proximité (Klarenbeek *et al.* 2011). Le biosenseur est composé d'un site senseur correspondant au domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac1, encadrée par deux fluorophores : un fluorophore donneur dérivé de la CFP (mTurquoise=T) et un tandem de fluorophores accepteurs dérivés de la YFP (Venus=VV) (*Figure M3*). Lorsque le biosenseur n'est pas lié à l'AMPc, sa conformation est favorable au FRET. Lorsque le fluorophore donneur est excité à 436 nm, il émet à 480 nm mais une partie de l'énergie émise est transférée à l'accepteur qui émet à 535 nm. Lorsque le biosenseur lie l'AMPc, il change de conformation rendant le FRET moins efficace. Aussi, lorsque le fluorophore donneur est excité à 435nm, son émission à 480nm augmente et l'émission à 535nm du fluorophore accepteur diminue. Ainsi, le calcul du ratio donneur/accepteur (F480/F535) reflète la production d'AMPc.

Les CMLV ensemencées sur des lamelles de verre coatées au collagène sont infectées par un vecteur adénoviral (*AAV serotype 5*) codant ^{T}EPAC^{VV} (environ 100 particules infectieuses par cellules) pendant 24h. La construction et production du vecteur adénoviral codant ^{T}EPAC^{VV} a été décrite dans l'article de Blirando et al, 2015 (Blirando *et al.* 2015).

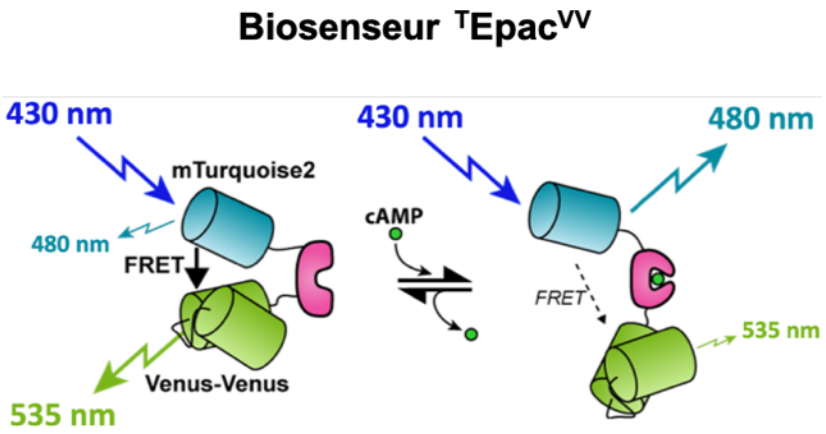


Figure M 3.Biosenseur ^{T}EPAC^{VV}

Les lamelles sont placées dans une chambre microscopique perfusée (2 mL/min) par une solution de BBS (125 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1.25mM NaH_2PO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 25 mM glucose) maintenue à 32 °C et saturée par un mélange 5% CO_2–95% O_2. La variation de la concentration intracellulaire en AMPc est mesurée avec le biosenseur $^{T}EPAC^{VV}$. Le biosenseur est excité à 436 nm et la fluorescence émise est séparée par un miroir dichroïque (455 DCLP), et détectée en alternant un filtre d'émission pour le donneur (470 ± 20 nm) et l'accepteur (530 ± 25 nm). Le ratio donneur accepteur (F480/F535), qui reflète la concentration en AMPc, est calculé pour chaque pixel de l'image, et mesuré pour chaque cellule délimitée par une zone d'intérêt (ROI). Le processus est répété au cours du temps, en acquérant des paires d'images sur un intervalle de temps défini et modulable. Les images sont prises avec une camera CCD (Orca-ER, Hammamatsu). Le poste d'imagerie est piloté par le logiciel iVision (BioVision Technologie). L'analyse des images est effectuée en temps réel par le programme Ratioscope (Pierre Vincent, Sorbonne Université) dans l'environnement Igor Pro 9 (WaveMetrics).

III.2. Sonde FURA-2AM

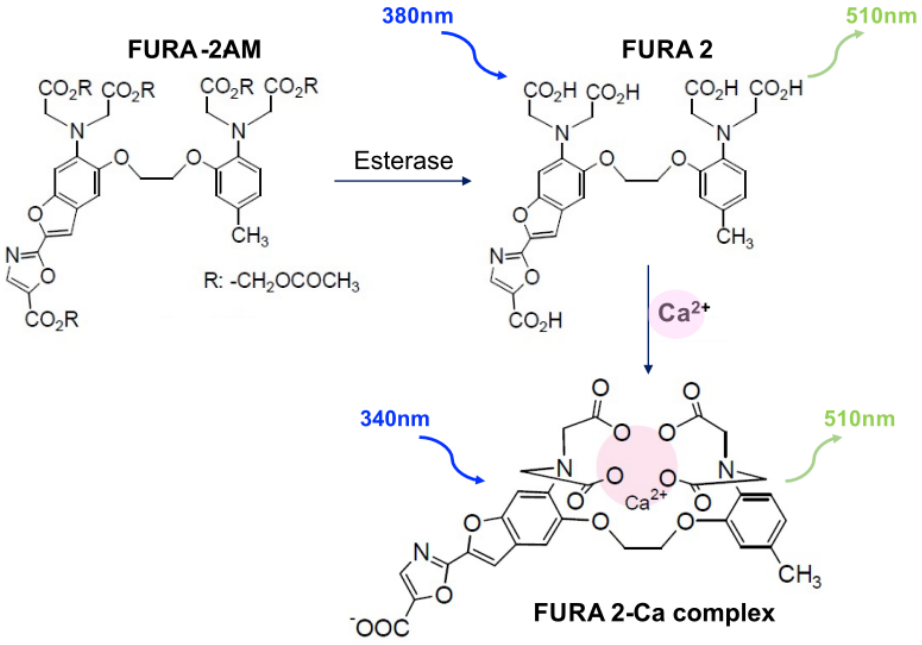


Figure M 4. Sonde calcique Fura-2AM

La mesure du calcium intracellulaire, a été effectuée à l'aide de la sonde chimique Fura-2AM. La sonde Fura-2 est une sonde ratiométrique double excitation/mono-émission dont le rapport des intensités de fluorescences des formes liées au calcium excitées à 340nm et non liées à excitées à 380nm est proportionnel à la concentration intracellulaire de calcium (*Figure M4*). Comme pour le biosenseur ^{T}EPAC^{VV}, le ratio est calculé pour chaque pixel de l'image, et mesuré pour chaque cellule. Le processus est répété au cours du temps, en acquérant des paires d'images sur un intervalle défini et adaptable à chaque évènement (120s en basal et 10s pour la réponse à un agoniste). Les images sont prises avec une caméra cooled monochrome spot RT sCMOS (SpotImaging). Le poste d'imagerie est piloté par le logiciel iVision (BioVision Technologie). L'analyse des images est effectuée en temps réel par le programme ratioscope (Pierre Vincent, Sorbonne Université) dans l'environnement Igor Pro 9 (WaveMetrics). Les CMLV traitées ou non au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, sont incubées en présence de 2µM de Fura-2-AM pendant 1h à 37°C (95%O_2/5%CO_2). Après 3 lavages au PBS, les cellules sont placées dans une chambre microscopique qui est continuellement perfusée (2 mL/min) par une solution de BBS (125 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1.25mM NaH_2PO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 25 mM glucose) bullée à l'air afin d'éviter le photoblanchiment de la sonde.

IV. Mesure de réactivité vasculaire

IV.1. Extraction de l'artère basilaire

Pour un set d'expérience, un rat Wistar mâle âgé de 6 à 7 semaines, environ 250-300g (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isles, France), a été anesthésié par injection intrapéritonéale de pentobarbital (300mg/kg). Le cerveau est ensuite extrait de la boite crânienne et maintenu dans une solution saline KREBS (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM $CaCl_2$ $(H2O)_2$, 1,17 mM $MgSO_4$ $(H2O)_7$, 1.18mM KH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, 11 mM glucose) à 4°C (*Figure M5*).

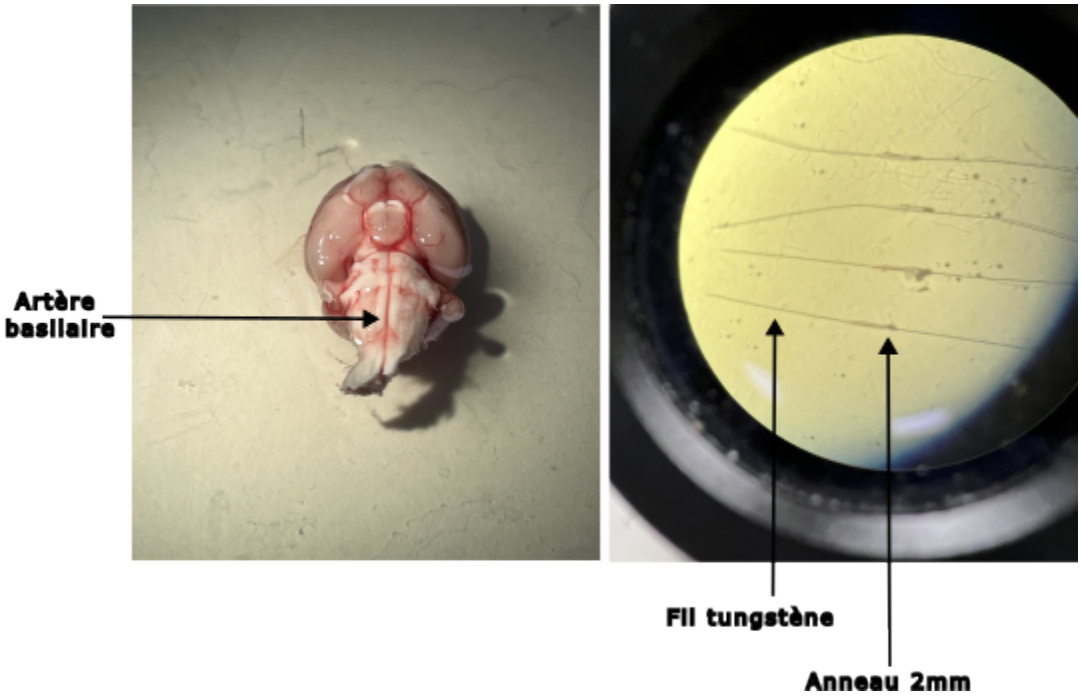


Figure M 5. Dissection et montage des artères basilaires sur fil

Gauche : cerveau de rat dont l'artère basilaire va être prélevée et découper en anneaux de 2mm. Ces anneaux seront mis en culture en présence ou non de peptide Aβ pendant 48h. **Droite** : Après 48h, montage des anneaux sur un fil de tungstène 25µm avant d'être fixé au support dans la cuve. Une fois fixé au premier support, un deuxième fil est passé à travers l'anneau puis fixé sur le deuxième support.

Le cerveau est placé et fixé avec des aiguilles dans une boite à dissection tapissée de gel en silicone et remplie de KREBS froid. Sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une pince et de micro-ciseaux l'artère basilaire et lentement dissociée du tissu conjonctif sous-jacent puis elle est sectionnée au niveau de son intersection avec l'artère cérébrale supérieure. L'artère basilaire est ensuite découpée en 4 anneaux de 1,5 à 2mm de longueur. Ces anneaux sont

ensuite incubés dans milieu DMEM avec HEPES en présence ou non de peptide $A\beta_{1-40}$, à 37°C (95%O_2/5%CO_2) pendant 48h.

IV.2. Montage et mesure de vasoréactivité

Montage

La vasoréactivité des artères basilaires a été mesurée à l'aide d'un wire-myographe (DMT : Danish Myo Technology, Aarhus, Danemark). Le principe du myographe repose sur la préparation d'anneaux de vaisseaux sanguins de petite taille montées à l'aide de fils fixées à deux supports dans une cuve à organe isolée remplie d'un bain de KREBS chauffé à 37°C. La position du premier support est réglable horizontalement grâce à une vis micrométrique, ce qui permet de l'éloigner ou le rapprocher de l'autre support et ainsi de faire varier le diamètre du vaisseau au cours du montage et lors de la normalisation. L'autre support est fixe et est relié à un transducteur (capteur) de force. Lors du montage deux fils de tungstène de 25µm de diamètre sont passés longitudinalement dans la lumière du vaisseau (*Figure M5*). Chaque fil est attaché à un des supports avec une tension minimale permettant ainsi au vaisseau d'être maintenu en équilibre. Une fois le vaisseau monté, le support réglable est positionné de manière à ce que les deux fils soient face à face, à la limite de se toucher (*Figure M6*). Cette configuration permet au vaisseau de générer une tension basale qui sera par la suite standardisée sur toutes les préparations d'anneaux expérimentaux par un processus appelé normalisation. Le myographe comporte quatre cuves pouvant accueillir quatre vaisseaux pour des mesures en parallèle. En ce qui concerne notre étude, les anneaux d'artère basilaire ont été montés après 48h de culture. Le myographe est connecté à un premier système d'acquisition Powerlab 8/30 (AD Instruments, Paris, France), lui-même relié à un ordinateur pour le traitement des données. L'acquisition est ensuite effectuée par LabChart (AD Instruments). Pour garantir la reproductibilité des expériences le myographe est calibré tous les mois en moyenne.

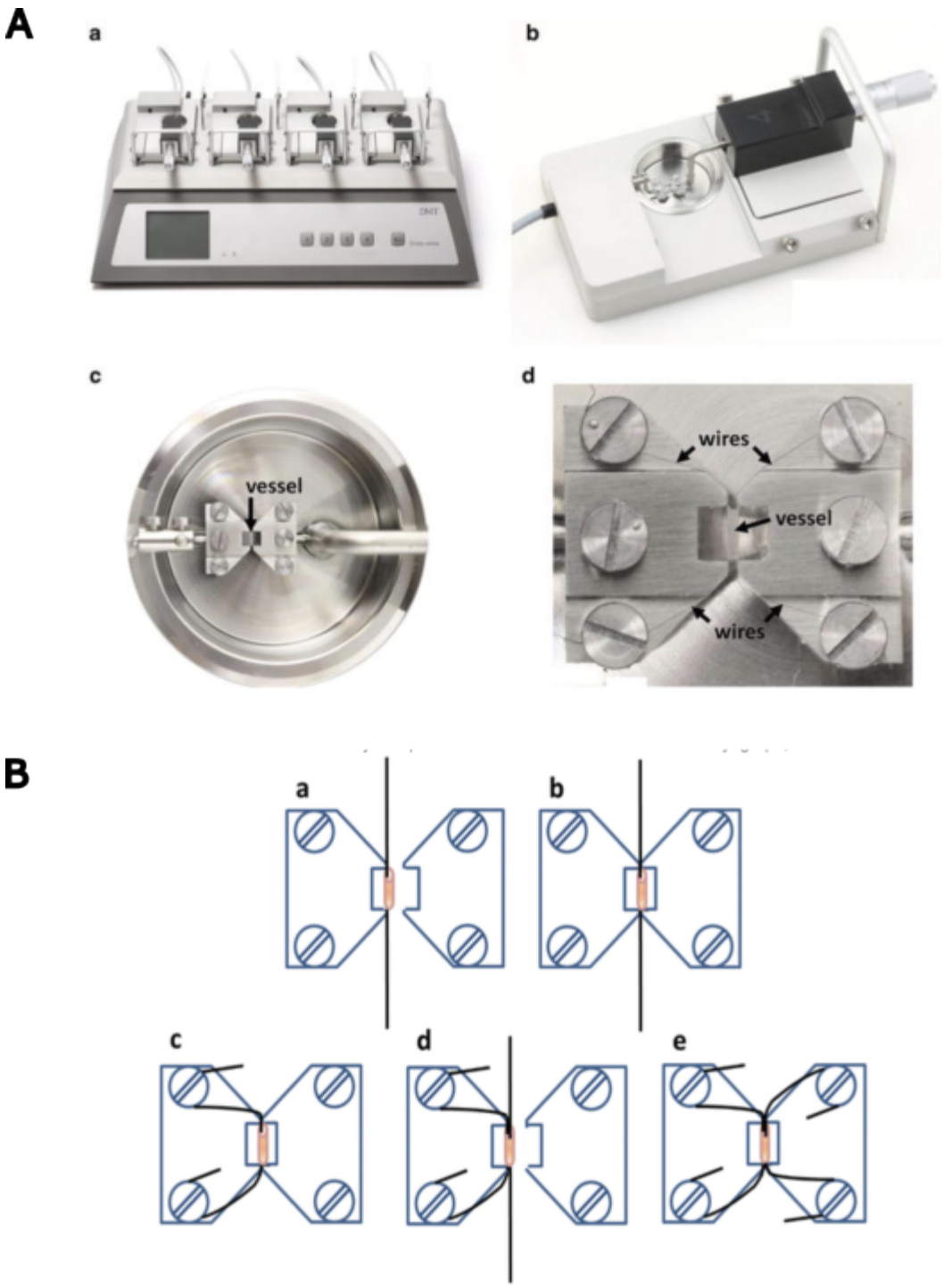


Figure M 6. Wire myographe et les étapes de montage d'une artère isolée

A.DMT wire myographe avec ses différents éléments : (a)Myographe, (b)bloc de support, (c)cuve contenant le bain de KREBS et (d)zoom sur la cuve et les deux supports avec les vis permettant de fixer les fils et le positionnement de l'anneau au centre. **B.** Étapes du montage d'un anneau dans la cuve. Schéma adapté depuis www.dmt.dk et www.musculoskeletalkey.com

Normalisation

Avant de commencer la normalisation, le myographe est remis à une tension de 0mN. Suite à cela, une force de 1mN est appliquée au vaisseau en tournant la vis micrométrique, ce qui étirent les fils et donc étirent la paroi du vaisseau transversalement. On augmente ainsi l'étirement par palier de 30-50µm à un intervalle de 180s, jusqu'à ce que la tension mesurée franchisse la valeur théorique de pression de 100mmHg (13,33 kPa), calculée par le logiciel sur le principe de la loi de Laplace.

La loi de Laplace établit une relation entre la tension de la paroi dans un cylindre, son rayon et la pression intraluminale : **T= P x r**. Où T est la tension pariétale exprimée en N/m, P est la pression artérielle théorique exprimée en Pa (N/mm^2) et r est le rayon interne du vaisseau exprimé en mètre.

Puisque la circonférence C théorique du vaisseau est égale à $\mathbf{C=2\pi r}$, on obtient l'équation suivante : $\mathbf{T = P \times C/(2\pi r)}$. Ainsi on peut établir pour une pression théorique donnée, une relation linéaire entre la tension de la paroi et le diamètre du vaisseau. Sur ce principe, le logiciel trace une isobare linéaire pour une pression de 100mmHg sur un graphique.

La tension réelle correspond alors à la tension de la paroi (F : force enregistrée par le transducteur, divisée par deux fois la longueur L du segment en mm) : T = F/2L, et est placée sur le graphique en fonction de la circonférence déduite de l'étirement entre les deux supports. Enfin les valeurs obtenues à chaque augmentation de l'étirement lors de la normalisation sont placées sur le graphique et créent une courbe exponentielle. L'intersection entre cette courbe et l'isobare indique la circonférence et la tension correspondante à cette valeur de pression pour un anneau. Nous avons choisi de travailler à 90% de la valeur de circonférence déterminée par le logiciel, ainsi pour l'atteindre nous ajustons l'étirement des deux fils à l'aide de la vis micrométrique à la valeur indiquée. Cette étape de normalisation est effectuée pour chaque anneau.

Une fois l'étape de normalisation terminée, les vaisseaux sont laissés au repos pendant environ 1h avant le début de l'expérience.

Les différents vasomodulateurs utilisés afin de stimuler la contraction ou la relaxation de l'artère, ainsi que les protocoles expérimentaux sont décrits dans la partie résultats de la partie 2 de la thèse.

PARTIE 1 : ATHEROSCLEROSE ET RESTENOSE POST-ANGIOPLASTIE

INTRODUCTION

I. De l'athérosclérose à la Resténose post-angioplastie

I.1. Définition

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire des artères de moyen et gros calibre, diffuse et évolutive, qui se caractérise, à un stade avancé, par des épaississements localisés de la paroi des vaisseaux, appelés plaques d'athérome. Composées d'un cœur lipidique enchâssé dans une chape fibreuse (*Figure I1.1*), elles se développent dans l'espace sous-endothélial de l'intima de l'artère (Libby *et al.* 2011). L'élargissement progressif de la plaque conduit à la mise en place d'une sténose artérielle qui provoque l'hypoperfusion et l'ischémie des tissus situés en aval. À des stades avancés, la plaque peut se rompre et provoquer une thrombose potentiellement responsable des infarctus du myocarde ou cérébraux, mais également des anévrismes ou des dissections aortiques. L'athérosclérose touche différents lits vasculaires (artères carotidiennes, artères cérébrales, coronaires, aorte, artères rénales, artères mésentériques et artères des membres inférieurs) et les manifestations cliniques varient selon le territoire (Fernández-Friera *et al.* 2015). L'athérosclérose est le principal facteur de risque des maladies cardiovasculaires (MCV), représentant la première cause de mortalité dans le monde (Libby *et al.* 2019). En 2019, plus de 17,9 millions de personnes sont mortes de MCV, soit 32% de la mortalité globale, avec 85% de ces décès imputables aux AVC (*Accidents Vasculaires Cérébraux*) et aux infarctus du myocarde (chiffres donnés par la World Health Organization/WHO/OMS - Cardiovascular diseases (CVDs) Fact Sheet. 2021).

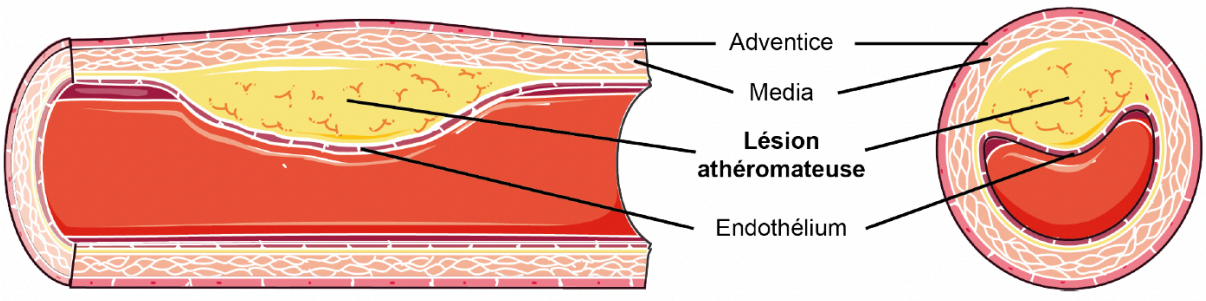


Figure I1. 1. Représentation schématique d'une artère athérosclérosée

Les facteurs de risques non génétiques conduisant à l'athérosclérose et aux MCV sont généralement liés au mode de vie. On peut citer un taux élevé de lipoprotéines de faible densité LDL-C (*Low Density Lipoprotein-Cholesterol*), l'hypertension artérielle, le tabagisme actif ou passif, l'alcoolisme, l'obésité, un régime alimentaire déséquilibré ou encore un mode de vie sédentaire. Les personnes diabétiques sont aussi plus à risque de développer des MCV, de même que les personnes souffrant d'hypercholestérolémie familiale. L'arrêt de ces comportements à risques permettant de diminuer les risques de développer une MCV, plusieurs initiatives et programmes tel que le *Global Hearts* sont lancés par l'OMS pour sensibiliser les personnes et réduire le danger que représentent les MCV dans le monde (*Cardiovascular disease: Global Hearts Initiative. World Health Organization, Geneva, 2018*).

I.2. L'athérogénèse

La pathogénèse de l'athérosclérose peut être séparée en trois phases : Initiation, Progression et Complications (Fragilisation et rupture de la plaque) (Libby *et al.* 2019).

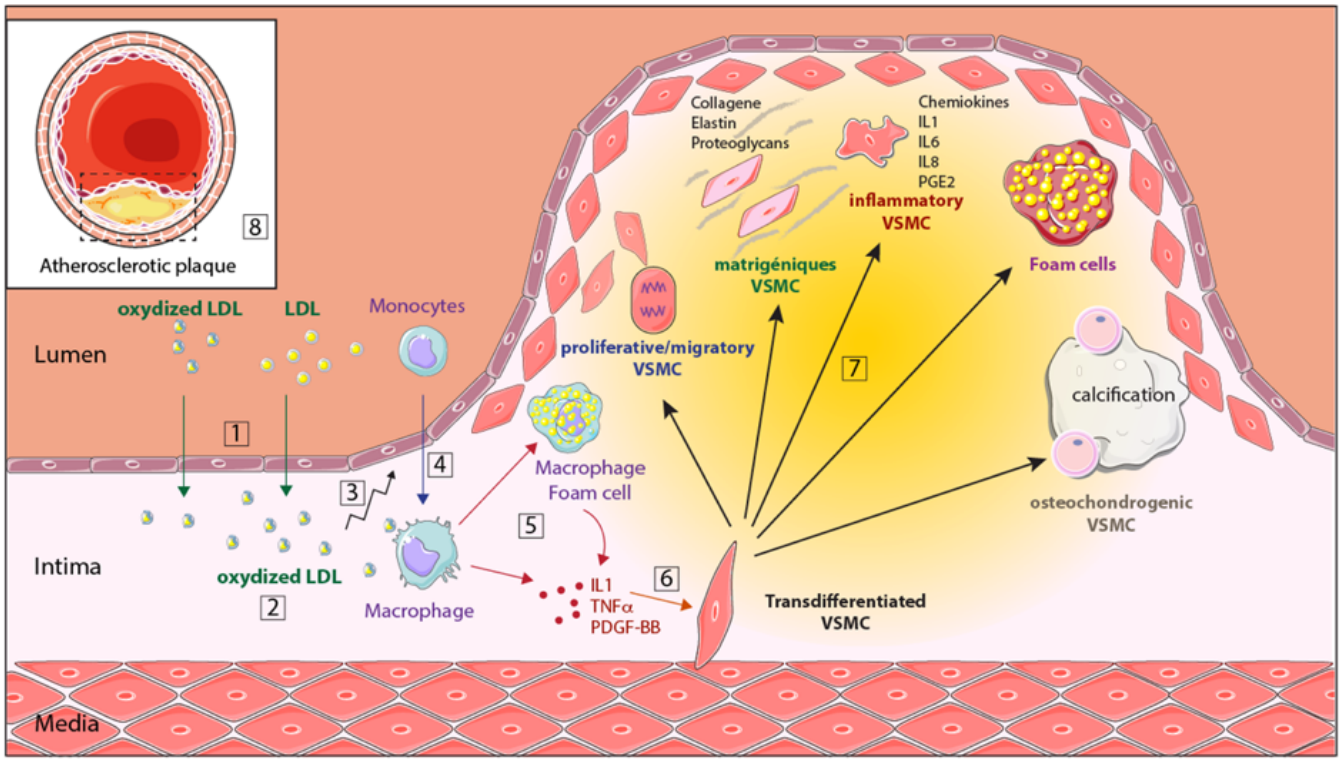


Figure I1. 2. Processus d'athérogénèse et diversité des phénotypes de CMLV retrouvée dans la plaque d'athérome

Les étapes de l'athérogénèse numérotées de 1 à 7 sont développées dans le chapitre suivant. 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. D'après (Gueguen *et al.*, 2016).

I.2.1. *Initiation de la lésion athéromateuse*

Le premier facteur déterminant dans l'initiation de la lésion athéromateuse est une exposition cumulative sur plusieurs années des artères à un taux plasmatique excessif de LDL-C (Ference *et al.* 2017). Le rôle crucial du LDL-C dans l'initiation des lésions athéromateuses a été mis en évidence dans différents modèles de souris C57BL/6, qui théoriquement sont résistantes à l'athérosclérose. Chez ces souris, l'invalidation des gènes codant le transporteur du LDL-C (*l'ApoE, Apolipoprotein E)* ou son récepteur (*LDL-R, LDL receptor*) provoque la formation spontanée ou consécutive à un régime riche en lipides (High Fat Diet) de lésions athéromateuses (Ishibashi *et al.* 1994; Plump *et al.* 1992; Nakashima *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1992). Le fait que les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale atteignent un niveau excessif de LDL-C plasmatique à un âge très jeune et que cela conduise au développement de MCV athérosclérotiques supportent un rôle causal des LDL-C dans le développement de l'athérosclérose (Nordestgaard *et al.* 2013). De plus, chez les patients présentant une perte de fonction de la protéine PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), impliquée dans l'internalisation du LDL-R, le taux plasmatique de LDL-C est réduit ; et cette réduction est corrélée avec une diminution de du risque cardiovasculaire (Cohen *et al.* 2006).

L'athérosclérose est initiée suite à des agressions multifactorielles et complexes de l'endothélium vasculaire (Libby *et al.* 2011), telle que l'infiltration de LDL-C oxydées ou non dans l'espace sous-endothélial (*Figure I1.2, étape 1*), où elles y sont retenues par une interaction physique entre l'ApoB (*Apolipoprotéine B*) exprimée à la surface des LDL et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire (Borén and Williams 2016). Les LDL-C natives, sont ensuite oxydées (LDLox) sous l'action de différentes enzymes telles que la myéloperoxydase ou la 15-lipoxygenase mais également sous l'effet des ROS et de certains ions métalliques (*Figure I1.2, étape 2*) (Navab *et al.* 2004; Yoshida and Kisugi 2010). Malgré le grand nombre de données expérimentales soutenant le rôle de l'oxydation des LDL dans l'initiation, le manque de preuves solides montrant que les LDLox initient l'athérosclérose chez l'Homme fait que cette hypothèse, bien qu'elle reste majoritaire au sein de la communauté scientifique, est parfois remise en question au profit d'un rôle de l'inflammation et du système immunitaire dans l'initiation de l'athérosclérose (Libby and Hansson 2019; Libby 2021; Ridker 2016; Ketelhuth and Hansson 2016).

Les cellules endothéliales activées par les LDLox vont alors acquérir un phénotype inflammatoire conduisant à l'expression et/ou la sécrétion d'un grand nombre de molécules d'adhésion (ICAM1, *intercellular adhesion molecule 1*, VCAM1, *vascular cell adhesion molecule-1*, sélectines E/P) (Collins *et al.* 2000; Hanyu *et al.* 2001; Dong *et al.* 1998), de facteurs de croissance (M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*) (Qiao *et al.* 1997), mais également de facteurs chimioattractants (MCP1, *monocyte chemotactic protein 1*) (Cushing *et al.* 1990; Gu *et al.* 1998). Ces diverses molécules permettent le recrutement de monocytes (*Figure I1.2, étape 3*), leur infiltration (diapédèse) dans l'espace sous-endothélial et leur différenciation en macrophages (*Figure I1.2, étape 4*).

Sous l'influence du M-CSF, les macrophages expriment des « récepteurs de nettoyage » ou « scavengers », spécifiques des LDLox (CD-36, LOX-1, SRA1, SRB1, etc.) reconnaissant des épitopes spécifiques d'oxydation (Miller *et al.* 2011), qui leur permettent d'internaliser les LDLox (Mushenkova *et al.* 2021). Cependant ces récepteurs n'ayant pas de rétrocontrôle sur la quantité de lipides internalisés (Suzuki *et al.* 1997), les macrophages en phagocytant les LDL oxydés de manière incontrôlée vont se transformer en cellules chargées en lipides ou cellules spumeuses (qui peuvent avoir plusieurs origines), dont l'accumulation et l'apoptose conduiront à la formation du cœur lipidique ou nécrotique de la plaque d'athérome (*Figure I1.2, étape 5*).

I.2.2. *Progression de la lésion athéromateuse*

a) Indépendante des CMLV

L'évolution des lésions athéromateuses implique la formation d'un cœur lipidique résultant de l'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima. Dans certaines lésions, ces cellules entrent en apoptose en raison d'un stress du réticulum provoqué par l'accumulation de lipides (Seimon *et al.* 2010). En l'absence de clairance de ces cellules apoptotiques, celles-ci nécrosent, formant le cœur nécrotique de la plaque, composé de lipides acellulaires, de débris cellulaires et de cellules en apoptose. La présence de ce cœur nécrotique accentue l'inflammation dans la plaque et contribue à sa fragilisation (Gautier *et al.* 2009; Hansson and Jonasson 2009).

L'immunité adaptative joue également un rôle dans le développement des lésions. Les lymphocytes T peuvent migrer vers les lésions, exerçant des effets bénéfiques ou néfastes

selon leur type. Les lymphocytes auxiliaires T1 (TH1) sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et favorisent ainsi la progression de la plaque. En revanche, les lymphocytes TH2 et les lymphocytes T-régulateurs sécrètent des substances limitant l'inflammation et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Hansson and Jonasson 2009; Ketelhuth and Hansson 2016; Libby and Hansson 2019).

b) Dépendante des CMLV transdifférenciées

L'implication des CMLV dans le développement de la plaque d'athérosclérose a longtemps été sous-estimée à cause de l'incapacité des méthodes traditionnelles à identifier l'origine des cellules au sein des lésions athéromateuses avancées. Ce n'est qu'à partir de 2006 que des études de lignages cellulaires ont montré que 30 à 70% des cellules au sein de ces lésions exprimant des marqueurs macrophagiques, étaient en fait des CMLV transdifférenciées ayant perdu tout marqueur spécifique permettant leur identification, notamment leurs marqueurs contractiles (Majesky 2007a; Alexander and Owens 2012; Bennett *et al.* 2016). Ainsi, les CMLV représenteraient la majorité des cellules composant la plaque d'athérosclérose, ce qui a été montré *in vivo* dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$ (Wang *et al.* 2019). La progression de la plaque d'athérosclérose est donc majoritairement dépendante des CMLV transdifférenciées.

Les nombreux facteurs de croissance (PDGF *platelet derived growth* factor, TGFβ *transforming growth factor* β), cytokines pro-inflammatoires (IL1β *Interleukine-1-*β, TNFα, *Tumor Necrosis factor-*α, IFNγ *Interferon-*γ) et espèces réactives de l'oxygène (ROS), produits par les cellules endothéliales et/ou les macrophages infiltrés, sont à l'origine de l'établissement d'une inflammation chronique contribuant à la migration et la prolifération des CMLV de la média vers l'intima (*Figure I1.2, étape 6*). Dans ce contexte inflammatoire, les CMLV vont acquérir un large panel de phénotypes (Bennett *et al.* 2016; Sorokin *et al.* 2020; Grootaert and Bennett 2021), participant ainsi directement ou indirectement au développement et à la stabilisation ou à la fragilisation de la plaque d'athérome (*Figure I1.2, étape 7*) :

- Les CMLV peuvent s'orienter vers un **phénotype macrophage-like** en phagocytant les LDL oxydées, à l'instar des macrophages, participant ainsi à la formation du cœur nécrotique de la plaque (Risinger *et al.* 2006). Ce phénotype peut être inversé par

une stimulation de l'efflux de cholestérol via l'apolipoproteine A1 et le HDL (*High Density Lipoprotein*) (Feil *et al.* 2014). La distinction entre le **phénotype spumeux** (*adipocyte-like*) caractérisé par l'accumulation de lipide et l'expression de marqueurs adipocytaires (adipsine et leptine) (Davies *et al.* 2005), et le phénotype macrophage-like n'est pas toujours clairement établie.

- Les CMLV peuvent également adopter un **phénotype matrigénique ou fibroblast-like**, caractérisé par une sécrétion importante de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, protéoglycane) élaborant ainsi la chape fibreuse consolidant le cœur lipidique (Wirka *et al.* 2019).
- Les CMLV peuvent aussi amplifier l'inflammation chronique par l'acquisition d'un **phénotype pro-inflammatoire**, sécrétant ainsi divers cytokines (IL-1, IL-6, IL-8), chimiokines (MCP1, CCL3, CCL5, CXCL2) et médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (Prostaglandines) (Forsyth *et al.* 1997; Sorokin 2010).
- Les CMLV peuvent acquérir un **phénotype ostéoblastique ou chondrogénique** en réponse à des niveaux élevés de calcium ou de phosphate contribuant à la calcification de la plaque (Speer *et al.* 2009; Durham *et al.* 2018). Il a été montré que 98% des cellules composant les plaques calcifiées étaient des CMLV, cependant il n'est pas clairement établi si les CMLV contractiles acquièrent directement ce phénotype ou si elles acquièrent un autre phénotype intermédiaire (Naik *et al.* 2012). Par ailleurs, le rôle de ces calcifications varie en fonction de leur nombre, leur taille ou encore leur localisation et peuvent soit favoriser la stabilisation soit la rupture de la plaque (Shi *et al.* 2020).

Dans les stades tardifs de l'athérogénèse, la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMP) par les CMLV (Newby 2005; Risinger *et al.* 2006) et l'acquisition d'un phénotype ostéoblastique-like, peuvent conduire à la déstabilisation et la rupture de la plaque.

Peu de données nous permettent à l'heure actuelle de déterminer si la CMLV acquièrent simultanément un ou plusieurs de ces phénotypes au sein de la même plaque. De plus, certains des phénotypes acquis par les CMLV transdifférenciées ont des fonctions opposées, telles que les CMLV matrigéniques sécrétant des protéines de la MEC pour consolider la chape fibreuse alors que les CMLV spumeuses et inflammatoires sécrètent des MMP dégradant cette chape.

Le fait que les CMLV se transdifférencient lors des remodelages vasculaires ne serait pas problématique si elles restaient localisées dans la média, mais le soucis est qu'en plus de ces phénotypes, les CMLV acquièrent aussi des propriétés **sécrétoires** (notamment de MMP2 et MMP9) (Gueguen *et al.* 2010b; Newby 2005; Risinger *et al.* 2006; Cho and Reidy 2002), **migratoires** (Gueguen *et al.* 2010b; Blirando *et al.* 2015) et **prolifératives** (McNamara *et al.* 1996; Marx *et al.* 2011). Si ces propriétés sont bénéfiques lors de la réparation tissulaire après une lésion, elles deviennent délétères si elles sont maintenues trop longtemps. En effet, si la prolifération est maintenue cela altère les propriétés biomécaniques du vaisseau par la création d'un tissu cicatriciel excessif comme dans le cas de la resténose post angioplastie qui sera présentée plus loin dans le manuscrit.

La transition phénotypique des CMLV et l'acquisition des propriétés migratoires, sécrétoires et prolifératives ont une implication cruciale dans le développement des lésions athéromateuses mais également dans les complications liées à la pose du stent lors du traitement chirurgical de la plaque d'athérosclérose (sujet développé plus loin dans le manuscrit). Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de cette plasticité phénotypique représente un enjeu majeur dans les remodelages vasculaires pathologiques.

I.2.3. *Complications de la lésion athéromateuse : Fragilisation et Rupture de la plaque*

À tout moment, le caractère chronique de l'inflammation risque de fragiliser la chape fibreuse, rendant la plaque instable et susceptible de provoquer un accident vasculaire. En effet, la calcification et/ou la sécrétion de MMP par les CMLV transdifférenciées et les macrophages, conduisent à l'instabilité mécanique de la plaque et peuvent en favoriser la rupture (Durham *et al.* 2018; Galis *et al.* 1994; Yu *et al.* 2018; Libby *et al.* 2019). Parmi les MMP, la MMP9 est de première importance dans la déstabilisation de la plaque (Li *et al.* 2020). Une augmentation de la sécrétion ou de l'activité de la MMP9 favorise la dégradation de la MEC. De plus, il a été montré que la MMP9 est spécifiquement sécrétée par les CMLV dans un contexte inflammatoire en réponse à l'IL1β (Blaise *et al.* 2012) et *in vivo* par les macrophages dans un modèle murin de l'athérosclérose (Gough *et al.* 2006). Les plaques les plus à risque de rupture sont celles possédant un large cœur lipidique recouvert d'une fine chape fibreuse (<60 µm). Les lésions présentant ces caractéristiques sont souvent appelées «

plaques vulnérables ». En revanche, les plaques avec une accumulation limitée de lipides et des chapes fibreuses plus épaisses sont souvent qualifiées de « plaques stables ». Un mécanisme d'érosion, plus spécifique des plaques avec une MEC importante recouverte par une fine chape fibreuse et un petit cœur lipidique peut également conduire à la rupture de la plaque (Bentzon *et al.* 2014).

La rupture de la plaque est la cause principale de l'infarctus du myocarde (Libby 2013). Par ailleurs, la rupture d'une plaque d'athérosclérose expose son contenu au compartiment sanguin, ainsi les éléments thrombogéniques du cœur de la plaque, notamment le facteur tissulaire (thromboplastine) produit par les macrophages et les CMLV transdifférenciées, peuvent déclencher la thrombose, complication ultime et la plus redoutée de l'athérosclérose (Bentzon *et al.* 2014).

I.2.4. *L'IL1β : cytokine la plus importante de l'athérogénèse*

Les effets de l'IL1β et l'établissement d'un contexte inflammatoire dans les CMLV ont été amplement étudiés par notre équipe. Ils ont entre autres démontré que parmi les médiateurs inflammatoires suivants : TNFα, IFNγ, IL1β, seul l'IL1β permettait d'induire un changement de phénotype dans les cultures primaires de CMLV de rat et que cela était médié par une sécrétion de PGE2 en réponse à l'IL1β (Blirando *et al.* 2015). Ils ont également démontré que l'IL1β activait la sécrétion de MMP9 par les CMLV (Blaise *et al.* 2012), ce qui peut alors contribuer au développement ou à la rupture de la plaque d'athérosclérose. Cependant d'autres équipes ont également démontré que l'IL1β favorisait la prolifération et la migration des CMLV (Eun *et al.* 2015) ou encore qu'elle augmentait l'expression de gènes pro-inflammatoires via un mécanisme dépendant de la voie NFκB (Alexander *et al.* 2012), suggérant que les CMLV acquièrent un phénotype pro-inflammatoire en réponse à IL1β.

L'IL1β est la cytokine la plus importante dans le développement des plaques d'athérosclérose et les remodelages vasculaires pathologiques (Libby 2017). L'IL1α, une autre isoforme de l'IL1 est également impliquée dans l'athérosclérose mais à des stades assez précoces contrairement à l'IL1β qui soutient l'inflammation tout au long du développement de la plaque, faisant de l'IL1β la cible thérapeutique de référence (Lim 2019). Son implication a été appuyée par plusieurs études montrant que i) l'invalidation du gène codant l'IL1β ou son récepteur, l'IL1-R, chez la souris KO ApoE$^{-/-}$ induit une diminution

significative de la surface des lésions athéromateuses, ainsi qu'une diminution de l'inflammation de l'aorte (Kirii *et al.* 2003; Chi *et al.* 2004) ; ii) à l'inverse l'invalidation du gène codant pour l'antagoniste du récepteur de l'IL1, IL1-Ra, favorise le développement précoce d'une athérosclérose sévère (Fitzgerald 2000) ; iii) l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour cibler spécifiquement l'IL1β chez l'Homme lors d'un essai clinique (CANTOS), réduit le risque d'accidents vasculaires (Ridker *et al.* 2017).

I.3. Traitement de l'athérosclérose

I.3.1. *Prévention primaire*

Les traitements de l'athérosclérose reposent en partie sur la réduction des facteurs de risques liés au mode vie chez le patient. Ce type de traitement est applicable dès l'enfance en tant que prévention primaire mais également à tous les stades de développement de l'athérosclérose. Bien que la réduction des niveaux de cholestérol, de la pression artérielle et de la consommation de tabac diminue considérablement la mortalité due aux maladies cardiovasculaires dans de nombreuses populations (Wilkins *et al.* 2017), l'augmentation d'autres facteurs de risque liés au mode de vie tels que l'obésité, le diabète de type 2, le comportement sédentaire et le stress psychosocial contrebalance ces résultats positifs, d'où l'importance de mener un mode de vie sain en tous points (Libby *et al.* 2019).

I.3.2. *Prévention secondaire et traitements pharmacologiques*

Au-delà de ces traitements préventifs, il existe des traitements pharmacologiques dont l'objectif est de diminuer le niveau de lipides circulants (Michaeli *et al.* 2023). Le principal traitement consiste jusqu'à présent en la prise de statines qui inhibent la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoAR), l'enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol mais de nombreux essais cliniques sont en cours pour développer d'autres traitements à utiliser en combinaison avec les statines (Libby *et al.* 2019; Tomlinson *et al.* 2020). Par exemple, l'Ezetimibe qui inhibe l'absorption du cholestérol par les entérocytes et augmente l'expression des récepteurs aux LDL, utilisé en combinaison avec les statines réduit de 15 à 20% les LDL-C (Hammersley and Signy 2017). On peut également citer des inhibiteurs de PCSK9 empêchant sa liaison aux récepteurs aux LDL et leur dégradation, qui

en combinaison avec les statines chez les patients à risque réduit de 60% les LDL-C (Robinson *et al.* 2015; Iqbal *et al.* 2019).

I.3.3. *Traitements chirurgicaux*

Malgré l'existence de traitements pharmacologiques limitant l'accumulation de lipides, les plaques d'athérome finissent toujours par se développer. Lorsque l'athérosclérose devient symptomatique, c'est-à-dire lorsque la plaque ou le caillot consécutif à sa rupture occupe un volume artériel trop important et limite l'irrigation artérielle (sténose artérielle), une intervention chirurgicale devient nécessaire.

Concernant la prise en charge des caillots, l'injection d'antiplaquettaires par voie intraveineuse suffit généralement à le dissoudre mais en cas d'échec une thrombectomie est réalisée (chirurgie consistant à insérer un cathéter et remonter le long de l'artère pour extraire le thrombus).

Pour le traitement des plaques d'athéromes, le type d'intervention réalisée dépend de la localisation et du nombre de plaques. Les artères faciles d'accès sont traitées par **endartériectomie** ou par **pontage** alors que les artères présentant une plaque unique et étant plus difficiles d'accès telles que les coronaires ou les fémorales sont traitées par **angioplastie percutanée.**

L'endartériectomie, est une technique chirurgicale consistant à retirer la plaque responsable de la sténose artérielle, et est effectuée au niveau d'artères facile d'accès, généralement les carotides et les artères des membres inférieurs.

Le pontage, est une technique privilégiée en cas de lésions multiples, qui consiste à contourner la région défaillante du vaisseau en insérant un tube synthétique ou un vaisseau sanguin prélevé sur le patient afin de rétablir la circulation sanguine.

L'angioplastie percutanée, est la technique privilégiée dans le traitement de plaques uniques et pour permettre la revascularisation des tissus (*Figure I1.3*). C'est une approche non invasive réalisée sous contrôle radiologique qui consiste à introduire dans l'artère un cathéter muni d'un ballonnet que l'on gonfle une fois arrivé au niveau de la lésion athéromateuse afin d'écraser la plaque contre la paroi et rétablir le flux sanguin. Aujourd'hui l'angioplastie est systématiquement accompagnée par la pose d'une endoprothèse (stent), dont le rôle est de maintenir l'artère ouverte mais aussi de limiter la resténose post-

angioplastie par l'utilisation de stents actifs délivrant des molécules anti-prolifératives (voir chapitre suivant).

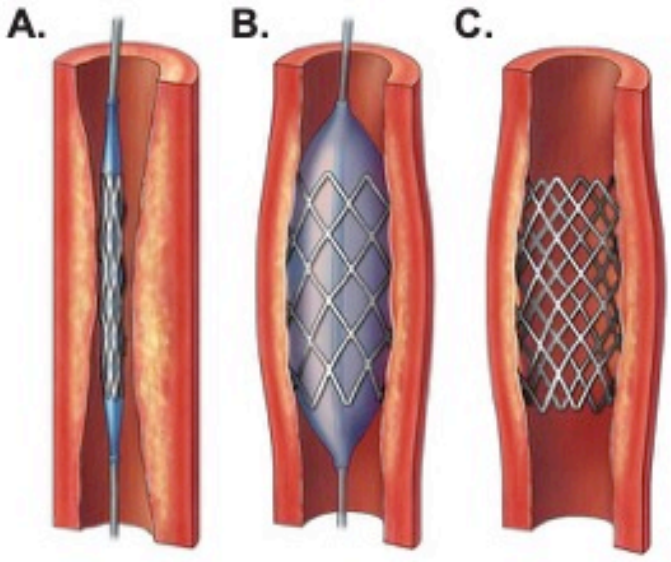


Figure I1. 3.Angioplastie percutanée au ballonnet avec pose de stent

A.Un cathéter muni d'un ballonnet gonflable et d'une endoprothèse grillagé et rétractée est introduit dans l'artère lésée. **B.** Le ballonnet est gonflé et écrase la plaque d'athérome contre la paroi, réduisant ainsi la sténose artérielle. **C.** Le gonflement du ballonnet permet de déployer l'endoprothèse qui va rester en place après le retrait du cathéter, prévenant ainsi le risque de resténose précoce.

I.4. La resténose post-angioplastie (RIS)

a) Causes de la resténose post-angioplastie

Environ un mois après l'angioplastie, on observe la formation d'une néointima correspondant à un tissu cicatriciel physiologique permettant la ré-endothélisation nécessaire à la restauration des fonctions anti-inflammatoires, anticoagulantes et antithrombotiques de l'endothélium. Cependant dans 20 à 30% des cas, la pose du stent conduit à un phénomène de resténose post-angioplastie ou resténose intra-stent (RIS), correspondant à un développement excessif du tissu cicatriciel dans l'intima (nommé néointima), rétrécissant à nouveau la lumière du vaisseau (*Figure I1.4*) (Inoue *et al.* 2011).

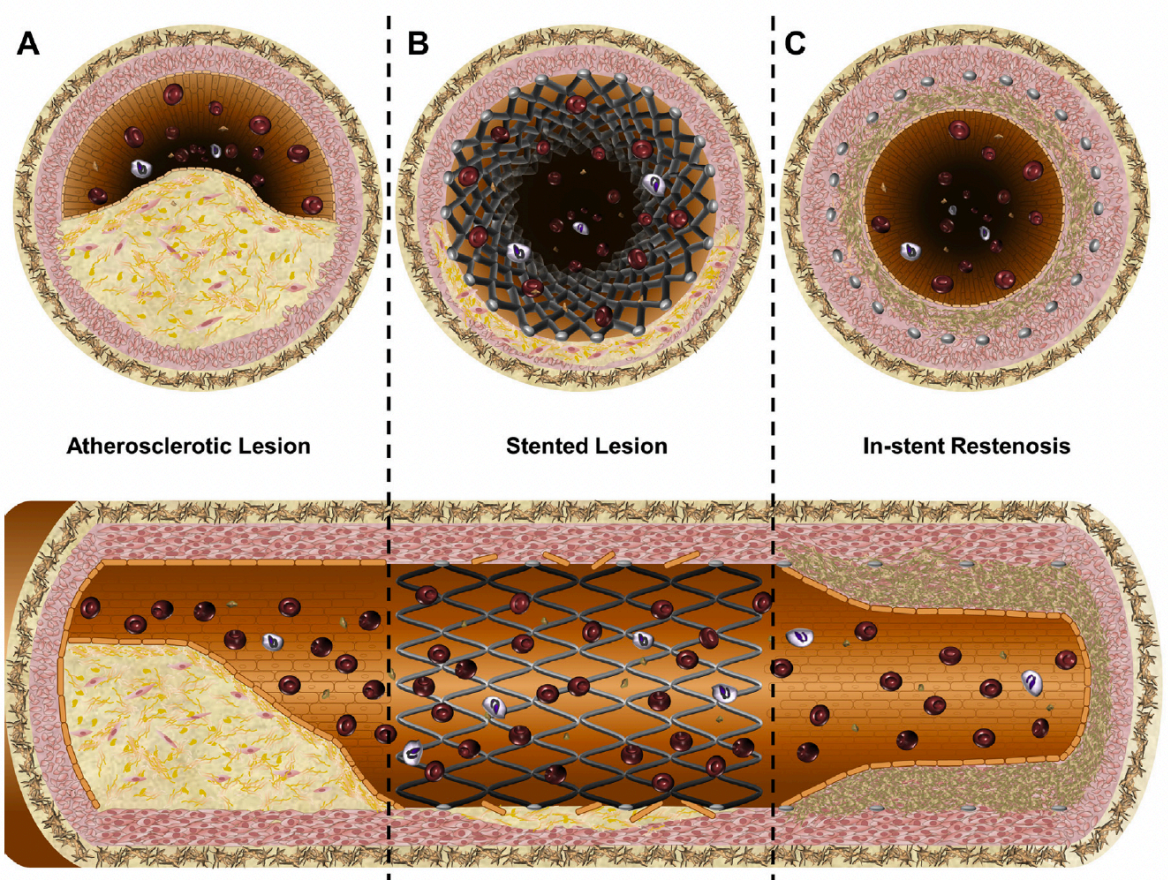


Figure I1. 4 Représentation schématique de la resténose post-angioplastie

A. Obstruction de l'artère par une plaque d'athérome limitant le flux sanguin. **B.** Rétablissement du diamètre de l'artère et du flux sanguin grâce à la pose d'un stent par angioplastie. **C.** Resténose intra-stent par formation d'une hyperplasie néointimale suite à la pose du stent. D'après (Simard *et al*., 2014)

Cette hyperplasie néointimale a pour origine une prolifération et une migration excessive des CMLV (Weintraub 2007), induites par une inflammation locale liée à la présence du stent mais également aux contraintes mécaniques qu'il impose, ainsi qu'à une activation plaquettaire. Cette inflammation et cette activation plaquettaire conduisent à la sécrétion de facteurs antithrombotiques et mitogènes (PDGF, Thromboxane A2) induisant la prolifération et la migration des CMLV (Cirillo *et al.* 1999), mais également à la sécrétion de substances matricielles dans l'intima, contribuant ainsi à la formation de la néointima.

b) Les stents actifs

Pour remédier à ce phénomène, l'utilisation de stents actifs (*drug eluting stents ou DES*) délivrant des molécules antiprolifératives et antimitotiques combinées à des traitements antiplaquettaires, permet de réduire les risques de RIS en modulant l'inflammation vasculaire et en prévenant la prolifération néo-intimale (pour revue voir (Rykowska *et al.* 2020)).

Les stents actifs de première génération ont vu le jour en 2002, avec un stent éluant du sirolimus dont l'efficacité a été évaluée lors d'un essai clinique en comparaison avec des stents classiques (Morice *et al.* 2002). Puis un autre stent éluant du paclitaxel (autre molécule antiproliférative) a été mis sur le marché l'année suivante (Hong *et al.* 2003). Cependant, leur efficacité est remise en question quelques années plus tard avec l'apparition tardive de thromboses intra-stent (Camenzind 2006).

Il a ensuite été reconnu que les stents de première génération constitués de polymères non biodégradables pouvaient déclencher une réponse inflammatoire contribuant à la resténose intra-stent. Aussi, des matériaux en polymères biodégradables présentant une meilleure biocompatibilité et biodégradabilité ont été proposés pour améliorer la structure du stent et l'élution des drogues (Parker *et al.* 2010; Naseem *et al.* 2017). Ces stents beaucoup plus fins, plus flexibles et plus surs sont appelés DES de deuxième génération (stents actifs de deuxième génération). Cependant, ces stents ne sont pas restés une solution miracle très longtemps puisqu'en 2015, une étude a démontré qu'ils ne permettaient pas de prévenir les thromboses intra-stent tardives (Kaiser *et al.* 2015).

Le développement de stents bioabsorbables offre une solution potentielle aux complications liées à la pose de stents. Ces stents, toujours en cours de développement, ont révolutionné la technologie des stents. Ils sont composés de métaux qui se dégradent dans un laps de temps spécifique (entre 30 et 60 jours), une fois que la drogue a été éluée et que le processus de cicatrisation et de support mécanique a été achevé. Ce type de stent a montré des résultats positifs en termes d'accidents cardiovasculaires et de revascularisation des tissus mais également une absence de remodelages vasculaires pathologiques après 12 mois (Simard *et al.* 2014; Kalra *et al.* 2017; Rykowska *et al.* 2020).

Malgré des progrès sur les polymères biodégradables et les stents bioabsorbables, les chirurgiens utilisent majoritairement les stents métalliques de seconde génération car ils

exercent une force plus importante et permettent un meilleur maintien de l'artère. Le risque de resténose intra-stent est donc toujours présent d'autant plus que les molécules antiprolifératives libérées par ces stents, bien qu'elles limitent l'hyperplasie néointimale en inhibant la prolifération des CMLV, exercent un effet délétère sur l'endothélium. En effet, elles empêchent la ré-endothélisation complète en inhibant aussi la prolifération des cellules endothéliales et altèrent leurs fonctions, ce qui limite la cicatrisation physiologique du vaisseau et favorise la formation de thrombose intra-stent potentiellement mortelle pour les patients (Inoue *et al.* 2011). Afin de limiter les risques de thromboses lors de la pose de ces stents, les médecins prescrivent des traitements antiplaquettaires de longue durée mais ces traitements sont incompatibles avec toute procédure chirurgicale en raison des risques hémorragiques encourus. Il est donc aujourd'hui nécessaire d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition du phénotype prolifératif et migratoire des CMLV, afin de développer une nouvelle génération de stents, ciblant spécifiquement les CMLV pour limiter la RIS sans affecter les fonctions des cellules endothéliales.

II. La transdifférenciation des CMLV, un acteur clé des remodelages vasculaires pathologiques

II.1. Importance de l'AMPc dans les CMLV

L'AMPc est un acteur clé de la transdifférenciation des CMLV qui est un élément essentiel du développement de la plaque d'athérosclérose mais également dans la resténose post angioplastie. L'AMPc joue un rôle central dans l'intégration et la transmission des signaux extracellulaires dans les CMLV (partie IV.2 de l'Introduction générale). Dans cette partie, nous nous focaliserons sur le rôle de l'AMPc dans le maintien de l'état différencié des CMLV, son rôle sur la contractilité ayant déjà été traité dans l'introduction générale.

L'AMPc participe au maintien de l'état différencié des CMLV en agissant à plusieurs niveaux comme le démontrent de nombreuses études :

- En favorisant l'expression des marqueurs contractiles et de différenciation (SM-MHC, SMα-actine, calponine, h-caldesmone) (Fetalvero *et al.* 2006).
- En inhibant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL6 (Newman *et al.* 2003; Chatterjee *et al.* 2014).
- En inhibant l'internalisation du cholestérol, limitant ainsi l'acquisition du phénotype spumeux (Guesquière *et al*. 2000).
- En inhibant la prolifération grâce à une activité synergique de la PKA et d'EPAC, ce qui a été démontré *in vitro* (Hewer *et al.* 2011) mais également *in vivo* (Indolfi 2000).
- En inhibant la migration (Daniel Palmer *et al.* 1998) via l'activation d'EPAC qui en inhibant RhoA via l'activation de Rap1, empêche l'assemblage des filaments d'actine nécessaires à la migration (McKean *et al.* 2015).

Ainsi la production d'AMPc en limitant l'acquisition de propriétés inflammatoires, migratoires et prolifératives des CMLV, limite le processus de transdifférenciation et est associée à un rôle athéroprotecteur, mais aussi limitant de la resténose post-angioplastie.

II.2. L'adenylyl cyclase 8, un acteur clé des remodelages vasculaires pathologiques et de la transdifférenciation des CMLV

II.2.1. *L'adenylyl cyclase 8*

a) Généralités

L'AC8 est codée par le gène ADCY8 chez l'Homme et Adcy8 chez le rat et la souris. Ce gène est localisé chez l'Homme, le rat et la souris sur le chromosome 8 (position 8q24.22), sur le chromosome 7 (position 7q33) et le chromosome 15 (position 15D1) respectivement. Le gène est très conservé entre ces espèces, avec 90% d'homologies entre les séquences codantes des AC8 humaine et murines. En raison de la redondance du code génétique, cette homologie de séquence se rapproche des 99% à l'échelle protéique. Chez l'Homme, elle est principalement exprimée dans le cerveau (forte expression des transcrits dans l'hippocampe, cervelet, cortex, thalamus et hypothalamus) mais est également exprimée dans le testicule (Defer *et al.* 1994; Sanabra and Mengod 2011). Chez les rongeurs, en plus d'une expression dans le cerveau, on la retrouve dans les cellules β-pancréatiques où elle est impliquée dans la sécrétion d'insuline (Raoux *et al.* 2015). En revanche, quel que soit l'espèce, elle n'est pas exprimée dans les CMLV en condition physiologique.

b) Régulation

L'AC8 est avec l'AC1 (et potentiellement l'AC3), l'une des seules cyclases activées par le complexe Ca^{2+}/calmoduline (Gu and Cooper 1999). La liaison du complexe Ca^{2+}/calmoduline lève l'auto-inhibition exercée par l'hélice H1 de l'AC8 sur son site catalytique (Macdougall *et al.* 2009). L'AC8 est plus particulièrement activée par le calcium capacitatif (Cali *et al.* 1994). Une régulation négative de l'AC8 est effectuée par son interaction avec la PKA associée à AKAP79, sur son extrémité N-terminale. En effet, la PKA par phosphorylation du résidu Ser112, inhibe l'AC8. L'AC8 peut également être inhibée par le dimère Gβ/γ des protéines G hétérotrimériques (Steiner *et al.* 2006). Enfin, le canal calcique Orai1 en se fixant au niveau N-terminal de l'AC8 coordonne l'entrée de calcium dans la cellule avec la production d'AMPc, tout comme la protéine STIM1, appuyant ainsi une régulation de l'activité de l'AC8 par le calcium capacitatif (Willoughby 2012).

c) Variants d'épissages alternatifs

Initialement identifiée dans le cerveau du rat en 1994 (Cali *et al.* 1994), l'AC8 pleine taille, longue de 1248aa et codée par 18 exons a été nommée **AC8A**, puis quelques années plus tard trois variants d'épissage alternatifs ont été décrits : l'**AC8B**, **AC8C** en 1996 (Cali *et al.* 1996) et l'**AC8D** en 2003 (Delmeire *et al.* 2003). Une représentation schématique de l'AC8A et de ses variants d'épissage est proposée en *Figure I1.5*.

L'AC8B est délétée de l'exon 11 codant la cinquième boucle extracellulaire de l'enzyme entre les domaines transmembranaires 9 et 10, sur laquelle se trouvent deux sites de N-glycosylation. L'AC8C est délétée de l'exon 8 codant pour le domaine C1b. L'AC8D présente une double délétion de l'exon 8 et 11.

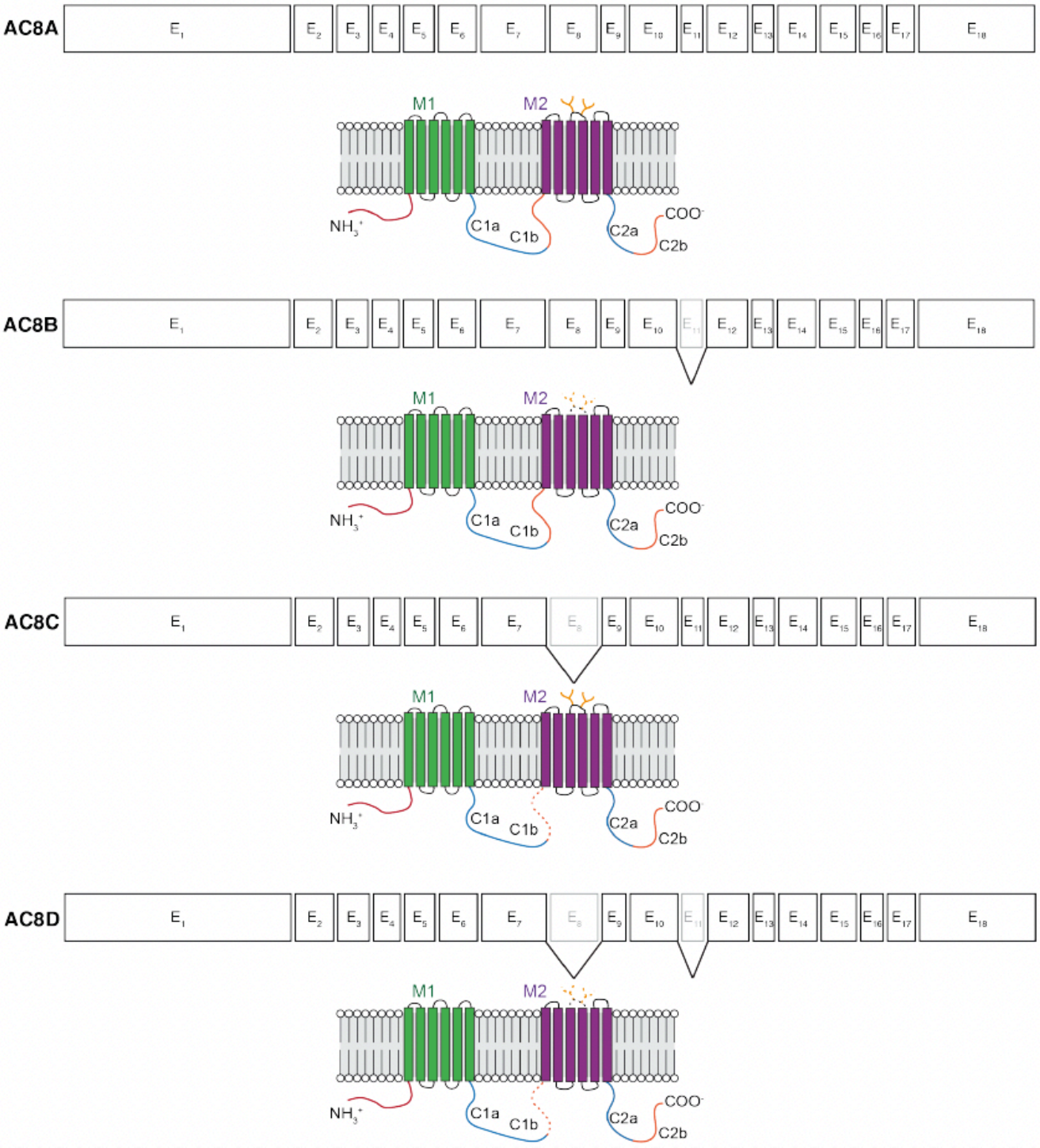


Figure I1. 5. Représentation schématique des variants de l'AC8

Pour rappel, l'AC8 comme toutes les AC est composée de deux cassettes M1 et M2, chacune composée de 6 domaines transmembranaires. Le site catalytique est formé par l'association des domaines C1a et C1b. La région N-terminale est impliquée dans la régulation de l'activité AC8A, positivement par le complexe Ca2+/Calmoduline et négativement par la PKA associée à AKAP79

Ici, sont représentés les exons codants pour les quatre variants de l'AC8, la correspondance entre les exons et les domaines protéiques est donnée par les barres colorées. Le variant B est délété de l'exon 11 codant la deuxième boucle extracellulaire de la cassette M2, le variant C est délété de l'exon 8 codant pour le domaine C1b et le variant D possèdent les deux délétions.

II.2.2. *Implication de l'AC8 dans la transdifférenciation des CMLV*

Notre équipe a travaillé pendant de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la transdifférenciation des CMLV à l'origine des remodelages vasculaires pathologiques. En 2006, elle démontre *in vitro* que la transition phénotypique des CMLV induite par l'IL1β est associée à l'expression *de novo* de l'adenylyl cyclase 8 (Clément *et al.* 2006). Absente dans les CMLV quiescentes et contractiles, son expression induite par l'IL1β participe à l'acquisition des propriétés inflammatoires et sécrétoires (notamment de la phospholipase A2) des CMLV transdifférenciées à l'IL1β *in vitro* (Clément *et al.* 2006). Par ailleurs, l'invalidation de l'AC8 induit une diminution significative de la sécrétion des MMP-2 et MMP-9 par les CMLV (Données non publiées). L'AC8 est également impliquée dans l'acquisition des propriétés migratoires des CMLV transdifférenciées, puisque son invalidation *in vitro* inhibe la migration, évaluée par wound-healing (Gueguen *et al.* 2010b).

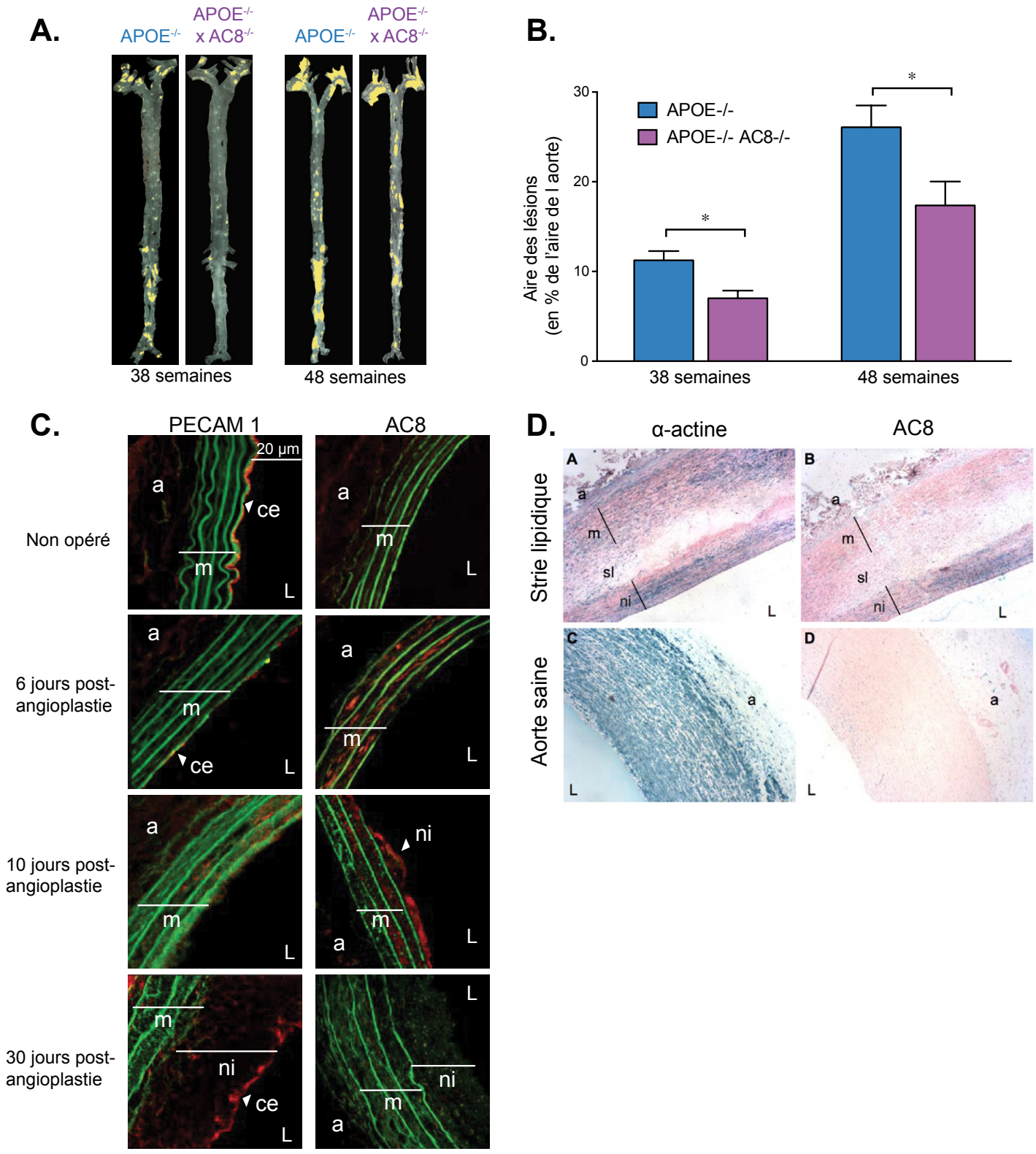


Figure I1. 6.Évidences de l'implication *in vivo* de l'AC8 dans les remodelages vasculaires pathologiques chez la souris, le rat et l'Homme

(A, B) Lésions athérosclérotiques (en jaune, A) chez les souris ApoE-/- et ApoE-/-/AC8-/- âgées de 38 et 48 semaines, dans les aortes en faces ouvertes. **(B)** Quantification de l'aire lésée en pourcentage de l'aire totale. Les données correspondent aux moyennes des aires lésées ± SEM pour chaque groupe (n = 8 à 12). *P < 0,05 par rapport aux souris ApoE$^{-/-}$. **(C)** Immunofluorescences réalisées sur des coupes de carotides de rats non opérés ou 6, 10 et 30 jours après angioplastie au ballonnet. Marquage de PECAM1 (marqueur endothélial) et de l'AC8. L'autofluorescence de l'élastine est observée en vert. **(D)** Immunohistochimie sur coupes sériées d'aortes humaines présentant des lésions athérosclérotiques précoces (stries lipidiques ou dites de type II selon la classification de Stary, 1992) et saines à l'aide d'un anticorps anti-actine-α et anti-AC8. Abréviations : a, adventice ; ce, cellules endothéliales ; m, média ; ni,néointima. L, lumen ; sl, strie lipidique. D'après (Gueguen *et al.,* 2010 ; Gueguen *et al.*, 2016)

L 'équipe a poursuivi ses recherches et a démontré *in vivo*, l'implication de l'AC8 dans les remodelages vasculaires pathologiques chez l'Homme, la souris et le rat (*Figure I1.6*)(Gueguen *et al.* 2010b; Gueguen *et al.* 2016a). Son implication dans le développement des lésions athéromateuses a été montré dans un modèle murin transgénique de l'athérosclérose où l'invalidation de l'AC8 ($ApoE^{-/-}$ x $AC8^{-/-}$) se traduit par une diminution de l'étendue des lésions athéromateuses au sein de la paroi artérielle des souris $ApoE^{-/-}$ (*Figure I1.6A et B*) (Gueguen *et al.* 2016a). Dans un modèle de resténose post-angioplastie chez le rat (rat balloon-injured), il a été montré que l'expression de l'AC8 est transitoire au cours de la formation de l'hyperplasie néointimale (*Figure I1.6C*) (Gueguen *et al.* 2010b). En effet, l'expression de l'AC8 apparait au niveau de la média 6 jours après la lésion, puis 10 jours après son expression est principalement retrouvée au niveau de la néointima, là où les CMLV migrent et prolifèrent. Enfin 30 jours après la lésion, lorsque l'hyperplasie est achevée, que les CMLV ne migrent plus et ne prolifèrent plus et que l'endothélium est reconstitué (marquage PECAM1), l'AC8 n'est plus exprimée. Chez l'Homme, un marquage positif à l'AC8 est retrouvé au niveau des CMLV néointimales d'aorte présentant des lésions athérosclérotiques précoces (stries lipidiques) (*Figure I1.6D*) (Gueguen *et al.* 2010b).

L'implication d'une adenylyl cyclase, censée produire de l'AMPc, dans la transdifférenciation des CMLV et le développement de l'hyperplasie néointimale est contradictoire avec le rôle athéroprotecteur de l'AMPc (présenté dans la partie II.1). Ce paradoxe a pu être expliqué par le clonage et la caractérisation de l'AC8 exprimée dans les CMLV transdifférenciées à l'IL1β (tdCMLV) par l'équipe et sont résumés dans la partie II.3 de cette introduction. Mon projet de thèse a été construit dans la continuité de ce travail réalisé par Benjamin Vallin et Yohan Legueux-Cajgfinger.

II.3. Identification d'un nouveau variant de l'AC8 : l'AC8E

II.3.1. *Clonage et identification des variants d'AC8 exprimés dans les CMLV transdifférenciées*

Le clonage et le séquençage de l'ADNc codant l'AC8 exprimée dans les CMLV transdifférenciées à l'IL1β, a mis en évidence l'existence de quatre variants d'épissage jusqu'alors inconnus, nommés **AC8E, F, G et H**. Les AC8E, AC8F, AC8G et AC8H, présentent une délétion commune de 414 pb localisée sur l'exon 1, se traduisant par la délétion des cinq premiers domaines transmembranaires de la cassette M1 de l'enzyme ainsi que des boucles intra- et extracellulaires associées. L'AC8E à l'exception de la délétion de 414pb est identique à l'AC8A. L'AC8F et l'AC8G possèdent en plus une délétion de l'exon 8 et 11 respectivement, comme les variants AC8B et AC8C. L'AC8H présente, comme l'AC8D, la double délétion des exons 8 et 11 (*Figure I1.7A*).

II.3.1. *Implication de ces AC8 dans la dynamique de production d'AMPc*

Afin d'identifier le rôle de ces AC8 dans la transdifférenciation des CMLV et comment elles pourraient impacter la production d'AMPc, l'équipe a mesuré la dynamique de production d'AMPc à l'aide du biosenseur ^{T}EPAC^{VV} (décrit dans le matériel & méthodes). Il a été mis en évidence que la dynamique de production d'AMPc en réponse à la forskoline (un activateur direct non sélectif des AC) est réduite dans les CMLV transdifférenciées à l'IL1β (tdCMLV) en comparaison aux CMLV contrôles (*Figure I1.7B*) et que cette diminution implique les AC8E-H puisque leur invalidation à l'aide d'un siRNA anti-AC8 restaure une production d'AMPc presque normale dans les CMLV transdifférenciées à l'IL1β (*Figure I1.7C*).

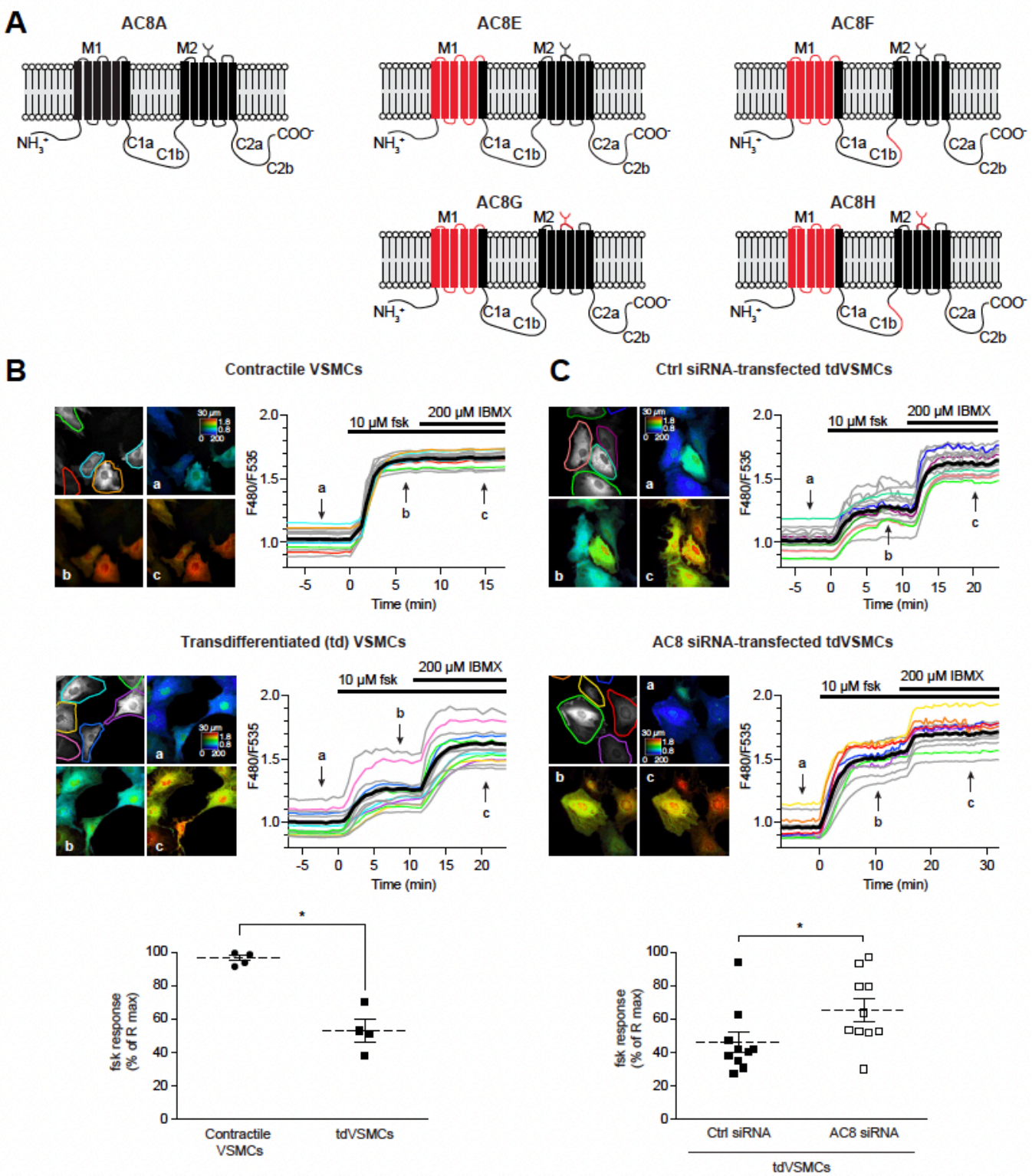


Figure I1. 7. Représentation schématique des domaines protéiques des AC8E, F, G et H en comparaison de l'AC8A.

A.Toutes les AC8E-H présentent une délétion de 414 pb à la fin de l'exon 1, correspondant à la délétion des 5 premiers domaines transmembranaires de la cassette M1 (en rouge). Le variant AC8F possède également une délétion (en rouge) dans le domaine C1b correspondant à l'exon 8, l'AC8G présente également une délétion de l'exon 11, codant la deuxième boucle extracellulaire de l'AC8, contenant deux sites de myristylation. Le variant AC8G possède en plus de la délétion partielle de l'exon 1, les délétions des exons 8 et 11. **B, C**. Modification des concentrations intracellulaires en AMPc dans des CMLV contractiles versus tdCMLV **(B)** et dans des tdCMLV exprimant un siRNA contrôle versus un siRNA ciblant l'AC8. **Panneaux de gauche** : image de microscopie montrant en noir et blanc l'émission de fluorescence à 535 nm. Le rapport F480/F535 (proportionnel à la concentration en AMPc) a été déterminée pour chaque cellule dans les zones de mesure délimitées par les traits de couleur. Les images en pseudo-couleur représentent le rapport d'émission F480/F535. (a) avant le traitement, (b) en réponse à 10µM de forskoline, (c) après ajout de 10µM de fsk et 200µM d'IBMX. **Courbes de droite :** Cinétique des rapports F480/F535 normalisés pour chaque zone de mesure. Chaque tracé de couleur correspond au rapport d'émission F480/F535 pour chaque cellule au cours du temps. La moyenne des tracés est représentée par le tracé noir épais. **Dot plot**: Quantification de la réponse moyenne des cellules à la forskoline en % de la réponse maximale de 4 à 10 expériences indépendantes. Test non paramétrique de Mann-Whitney, *P<0.05

II.3.2. *Caractérisation biochimique et fonctionnelle des AC8E-H*

Afin d'évaluer la fonctionnalité de ces variants AC8E-H et de l'AC8A (pleine taille et fonctionnelle), des lignées monoclonales de cellules HEK293A exprimant stablement chacune de ces protéines ont été générées (*Figure I1.8A*). On notera que les niveaux d'expression des AC8G et AC8H sont relativement faibles du fait de la délétion de l'exon 11 et donc de la perte des sites de N-glycosylation nécessaires à la maturation et la conformation des protéines, et donc à leur stabilité. Comme présenté sur la *Figure I1.8B*, la production d'AMPc en réponse à la forskoline dans les HEK exprimant l'AC8E et l'AC8F, est diminuée par rapport aux HEK contrôles ou exprimant l'AC8A pleine taille, démontrant ainsi une fonction dominant négatif de ces variants de l'AC8. L'absence d'effet significatif de l'AC8G et de l'AC8H sur la production d'AMPc s'explique par leur faible niveau d'expression.
Les expériences d'immunofluorescence ont montré que si l'AC8A est exprimée à la membrane plasmique, les AC8E-H sont intracellulaires, possiblement dans le réticulum endoplasmique (Vallin *et al.* 2018). Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de production d'AMPc par les AC8E-H, l'équipe s'est focalisée sur l'AC8E qui diffère de l'AC8A uniquement par la délétion dans l'exon 1, permettant ainsi de mieux comprendre l'impact de cette délétion sur les fonctions de la cyclase.

L'AC8E étant dépourvue d'activité catalytique (Vallin *et al.* 2018), les travaux se sont concentrés sur sa capacité à inhiber l'activité des autres cyclases fonctionnelles.

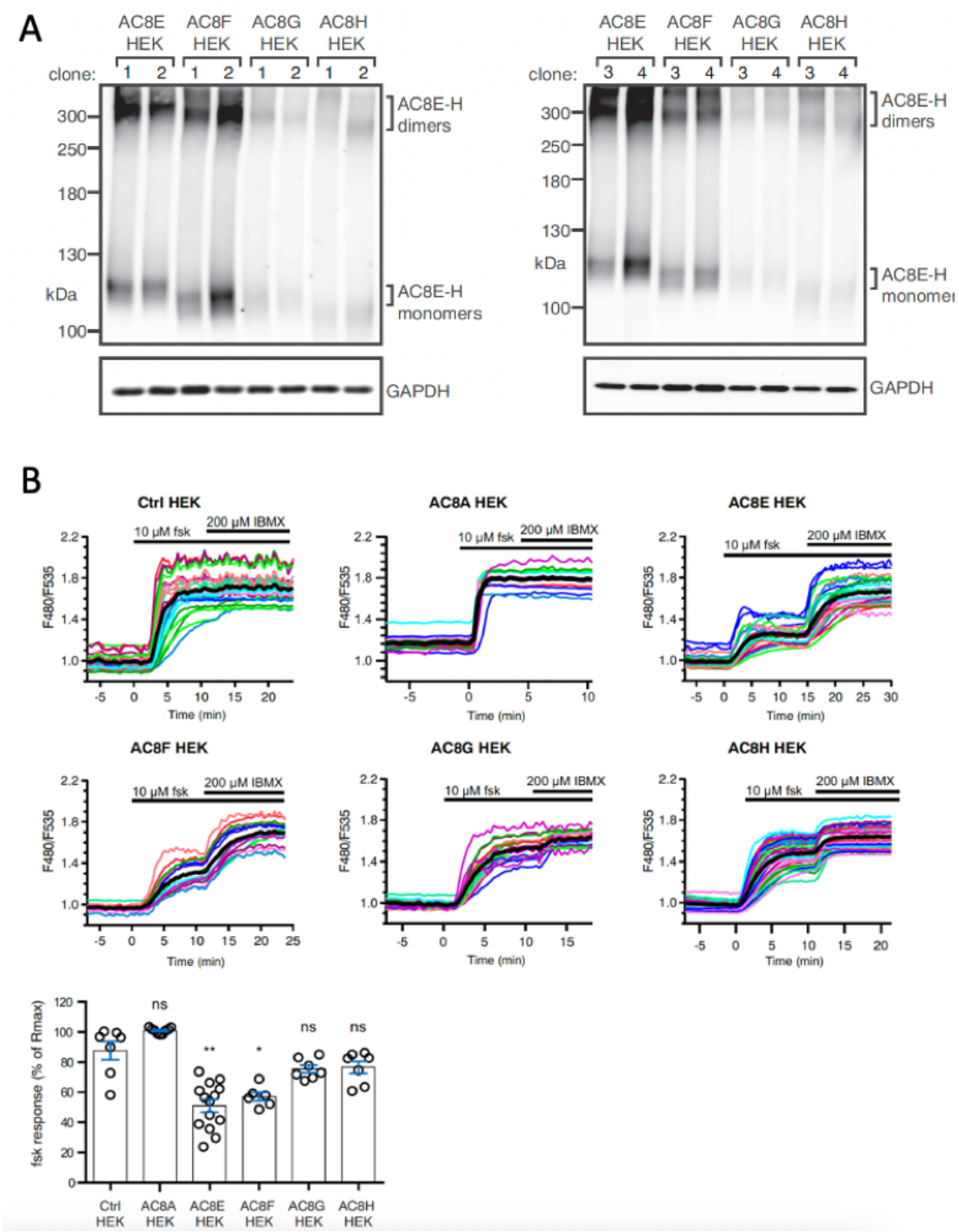


Figure I1. 8. Étude biochimique et fonctionnelle des AC8E-H dans les HEK293A.

Des clones stables exprimant individuellement les AC8E-H ont été générés dans des HEK293A. **A.** Western Blot montrant l'expression stable des AC8E-H dans les cellules HEK293A **B. Panels du haut :** Production d'AMPc en réponse à 10µM de forskoline (fsk) suivie par imagerie de biosenseur dans les cellules HEK contrôles (Ctrl HEK) et dans les clones HEK exprimant stablement les AC8E-H. L'application de 10µM fsk et de 200µM IBMX détermine le changement maximal de ratio (Rmax). Chaque trace colorée indique le ratio d'émission F480/535 au cours du temps dans des cellules individuelles. La trace noire épiasse indique la moyenne de toutes les traces. **B. Panel du bas :** Dot plot et barres représentant les valeurs moyennes des réponses à la fsk. Les résultats sont exprimés en pourcentage du changement maximal du ratio (% de Rmax). Les données présentées sont les moyennes ± SEM d'au moins N=6 expériences indépendantes réalisées sur des clones distincts. Pour chaque expérience indépendante, la valeur calculée représente la moyenne de n=10 à 20 cellules individuelles. Les réponses à la fsk étaient les suivantes : pour HEK de contrôle : 87,8 ± 6,1 %, N=7 ; pour HEK AC8A : 101,0 ± 0,6 %, N=9, P=0,6888 ; pour HEK AC8E : 51,1 ± 4,1 %, N=14, P=0,0030 ; pour HEK AC8F : 57,2 ± 2,8 %, N=6, P=0,0366 ; pour HEK AC8G : 75,5 ± 2,5 %, N=7, P > 0,9999 ; pour HEK AC8H : 76,6 ± 4,0 %, N=7, P > 0,9999. Des comparaisons multiples avec la condition de contrôle ont été réalisées à l'aide du test de Kruskal-Wallis pour des données non appariées et du test post hoc de Dunn. ** : P < 0,01, * : P < 0,05, ns : non significatif. D'après (Vallin *et al*. 2018).

II.3.3. *L'AC8E agit comme un dominant négatif*

Par des approches de co-immunoprecipitation (co-IP), d'immunofluorescence et de dosage d'AMPc dans des HEK, cette étude a démontré que l'AC8E s'hétérodimérisait avec l'AC3, et séquestrait le dimère dans le RE, exerçant ainsi un effet dominant négatif sur la production d'AMPc (*Figure I1.9*).

Plusieurs études, utilisant des méthodes telles que la co-immunoprécipitation ou le FRET, ont fourni des preuves que la régulation de l'activité des cyclases implique la formation de dimères homologues et hétérologues (Gu *et al.* 2002; Baragli *et al.* 2008). La réduction de l'activité des cyclases fonctionnelles par l'AC8E pourrait donc résulter de leur séquestration dans le réticulum endoplasmique (RE), qui ne peut pas être correctement adressée à la membrane plasmique. Des travaux antérieurs menés par Cooper et ses collaborateurs ont montré que les cassettes M2 de l'AC8 étaient responsables de la formation de dimères d'AC8 par une interaction M2-M2. Cependant, il a été démontré que l'interaction M1-M2 était essentielle pour l'adressage des dimères à la membrane (Gu *et al.* 2001b). Aussi, les dimères AC8E/AC3 pourraient toujours se former grâce au domaine M2 intact de l'AC8E, mais l'absence du domaine M1 pourrait altérer l'adressage à la membrane plasmique du dimère.

Ainsi, le laboratoire a réussi à concilier l'expression *de novo* d'une adenylyl cyclase lors de la transdifférenciation des CMLV en réponse à l'IL1β, alors que l'AMPc est censé la limiter. Par la suite, Yohan Legueux-Cajgfinger et moi-même, au cours de nos thèses respectives avons continué ce projet afin d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet dominant négatif de l'AC8E.

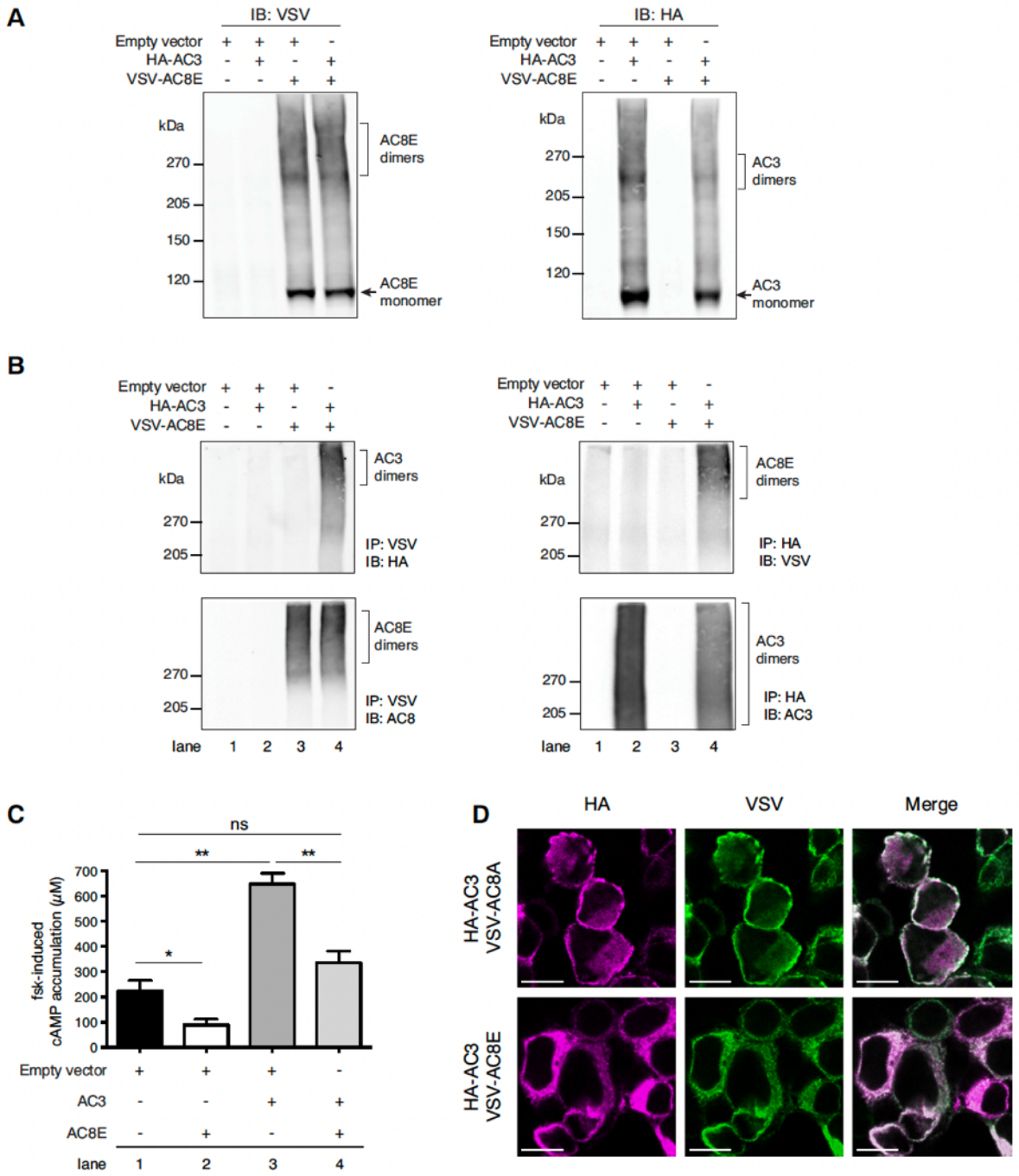


Figure I1. 9. L'AC8E s'hétérodimérise avec l'AC3 et inhibe l'activité cyclase

A. Western blots montrant les niveaux d'AC8E (panneau de gauche) et d'AC3 (panneau de droite) dans les cellules HEK-293 exprimant transitoirement VSV-AC8E et/ou HA-AC3, réalisés avec des anticorps anti-VSV et anti-HA. **B.**Western blots montrant les résultats de co-IP. Les IP ont été réalisées avec des anticorps anti-VSV (panneau de gauche) et anti-HA (panneau de droite). Les immunoblotages (IB) ont été effectués avec des anticorps anti-AC8 (sc-1967) ou anti-VSV pour détecter l'AC8E, et avec des anticorps anti-AC3 (sc-588) ou anti-HA pour détecter l'AC3. **C.** Dosages de l'accumulation d'AMPc sur des cellules HEK transfectées avec un vecteur vide et/ou un vecteur codant l'AC8E et/ou un vecteur codant l'AC3, après 60 minutes de traitement fsk (10 µM) plus IBMX (500 µM). Les résultats sont exprimés en µM et représentent les moyennes ± SEM de 5 expériences indépendantes. Les valeurs étaient les suivantes : pour les cellules HEK transfectées avec le vecteur vide : 224,4 ± 41,3 µM ; pour les cellules HEK exprimant AC8E : 88,9 ± 23,2 µM, P=0,0159 ; pour les cellules HEK exprimant AC3 : 648,4 ± 42,7 µM, P=0,0079 ; pour les cellules HEK exprimant AC8E/AC3 : 334,5 ± 47,5 µM, P=0,0952 par rapport aux cellules témoins et P=0,0079 par rapport aux cellules exprimant AC3. Les comparaisons côte à côte ont été effectuées avec le test de Mann-Whitney non paramétrique pour des données non appariées. **: P < 0,01, *: P < 0,05, ns: non significatif. **D.** Immunomarquage des cellules HEK-293 transfectées avec des plasmides codant l'HA-AC3 et VsV-AC8A ou -AC8E. Les détections ont été réalisées avec des anticorps anti-HA et anti-VSV. **A, B et D**. N=3 expériences indépendantes. D'après (Vallin *et al.*, 2018).

OBJECTIFS

Ce projet mené au cours de ma première année de thèse, s'insère dans la continuité des travaux effectués par Yohan Legueux-Cajgfinger. Le premier objectif de ce projet consiste à caractériser l'AC8E au niveau structurel, fonctionnel et biochimique afin d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet dominant négatif. Ensuite, sur la base des mécanismes et acteurs identifiés, l'objectif final était de développer une stratégie nous permettant de limiter les effets délétères de l'AC8E sur la diminution de la production d'AMPc et ainsi empêcher la transdifférenciation des CMLV à l'origine des remodelages vasculaires pathologiques. Les deux objectifs de ce projet sont détaillés ci-dessous.

OBJECTIF 1 : Caractérisation structurelle, fonctionnelle et biochimique de l'AC8E

L'ensemble des expériences permettant la caractérisation fonctionnelle et biochimique de l'AC8E a été mené sur des lignées de HEK exprimant transitoirement ou stablement l'AC8E ou d'autres cyclases (AC3, AC2, AC6). Trois axes d'études nous ont permis de répondre à ce premier objectif :

i) Étudier *in vitro*, la capacité de l'AC8E à former des hétérodimères avec les diverses familles d'adenylyls cyclases et à inhiber leur activité, par des approches biochimiques (co-immunoprécipitation, western blot, dosage d'AMPc).

ii) Construire un modèle 3D prédictif de l'AC8E, en collaboration avec l'UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Université de Reims Champagne Ardenne, afin de comprendre les différences structurelles et donc potentiellement fonctionnelles entre l'AC8 pleine taille et l'AC8E.

iii) Valider par des approches *in vitro*, les données obtenues à partir des modèles 3D. Nous avons plus particulièrement évalué l'implication du domaine N-terminal de l'AC8E, identifié par la modélisation comme étant potentiellement impliqué dans l'effet dominant négatif de l'AC8E, par des approches biochimiques et par imagerie dynamique à l'aide du biosenseur $^{T}Epac^{VV}$.

Les résultats obtenus ont conduit à un **article en révision** à BBA : Molecular Cell Research, dans laquelle je suis co-premier auteur et sera résumé dans la première partie des résultats et présenté dans sa version initiale soumise au journal.

OBJECTIF 2 : Limiter les effets de l'AC8E en inhibant la formation des dimères.

Ce deuxième objectif a consisté à identifier les sites d'interactions entre l'AC8E et d'autres cyclases (AC3 et AC6) et de développer une stratégie pour inhiber cette interaction et potentiellement restaurer la production d'AMPc. Plus précisément, cette partie du projet a consisté en/dans :

i) L'identification les domaines protéiques d'interaction entre l'AC8E et l'AC3 ou AC6 par une approche de criblages de domaines d'interaction (PEPscan).

ii) Le développement d'une stratégie de peptides interférents basés sur les séquences identifiées en PEPscan, afin d'établir une preuve de concept pour une stratégie thérapeutique afin de limiter les effets de l'AC8E sur les remodelages vasculaires pathologiques. Ces peptides ont été testés sur leur capacité à rompre l'interaction par des expériences de co-immunoprécipitation et sur leur capacité à restaurer la production d'AMPc dans des CMLV transdifférenciées à l'IL1β et dans des clones stables de HEK exprimant l'AC8E (mesurée par imagerie de biosenseurs).

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude sur les peptides interférents n'étaient pas concluants et n'ont pas pu être intégrés à l'article soumis. Ainsi ils seront présentés dans la partie résultats complémentaires.

RESULTATS

L'équipe d'Isabelle Limon a démontré *in vitro* (Clément *et al.* 2006; Gueguen *et al.* 2010b) puis *in vivo* (Gueguen *et al.* 2010b; Gueguen *et al.* 2016a) que la transition phénotypique des CMLV de rats, induite par l'IL1β s'accompagne de l'expression *de novo* de l'Adenylyl Cyclase 8 (AC8). Le laboratoire a plus récemment démontré que l'AC8 exprimée au cours de la transdifférenciation des CMLV était une nouvelle isoforme jusqu'ici inconnue, l'AC8E (Vallin *et al.* 2018). Cette isoforme correspond à un variant d'épissage de l'AC8A (AC8 pleine taille) délétée de 414pb à la fin de l'exon 1 codant pour les cinq premiers domaines transmembranaires. L'équipe a également démontré, par des approches biochimiques et par l'utilisation de biosenseurs, que l'AC8E limite la capacité des cellules transdifférenciées à produire de l'AMPc en se comportant comme un dominant négatif (Vallin *et al.* 2018). L'AC8E n'est pas correctement adressée la membrane et en conséquence, séquestre dans les compartiments intracellulaires les autres cyclases avec qui elle se dimérise. Ainsi, restaurer la production d'AMPc en ciblant l'AC8E, pourrait constituer une nouvelle stratégie afin de limiter la transdifférenciation des CMLV et les remodelages vasculaires pathologiques. Des études de caractérisation structurelle, fonctionnelle et biochimique de l'AC8E ont donc été menées afin d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet dominant négatif de l'AC8E.

I. Article 1 “Unraveling the inhibitory mechanism of Adenylyl Cyclase 8E: New insights into regulatory pathways of cAMP signal integration”

I.1. Résumé

Il a déjà démontré que l'Adénylyl Cyclase 8E (AC8E), délétée des cinq premiers domaines transmembranaires de la cassette M1, s’hétérodimérise avec l'AC3 et régule négativement son activité (Vallin *et al.* 2018), mais le mécanisme moléculaire impliqué dans cette inhibition n’est pas clairement établi.

Dans cette étude, nous démontrons tout d'abord que l'AC8E inhibe l’AC3 mais également les AC2 et AC6, soulignant ainsi l'importance fonctionnelle de ce nouveau mécanisme régulateur dans la voie de signalisation AMP cyclique au sein de différentes familles d'AC. Des expériences de co-immunoprécipitation réalisées sur des cellules HEK293-T exprimant transitoirement l’AC8E et/ou l’AC3, l’AC2, l’AC6 montrent leur interaction (Article 1 *Figure1A*), et par dosage d’accumulation d’AMPc nous avons démontré que cette co-expression avec l’AC8E diminue les niveaux d’AMPc produit en réponse à la forskoline (Article 1 *Figure1B*).

Nous avons entrepris une collaboration afin de proposer un modèle tridimensionnel de l’AC8E. En 2019, un modèle structural incomplet par cristallographie de l’AC9 bovine (Bos taurus) obtenu par cryo-microscopie, a été publié par Qi et ses collaborateurs (Qi *et al.* 2019) dans lequel ils démontrent que le positionnement des domaines hélicoïdaux HD1 et HD2, qui correspondent respectivement aux extensions cytosoliques des domaines transmembranaires TM6 et TM12, joue un rôle central dans la bonne conformation du site catalytique, et plus particulièrement au niveau des régions coiled-coil des domaines HD formés par les hélices h1.1, h1.2, h2.1 et h2.2. Ce modèle ne comportait pas le domaine N-terminal et une partie du domaine C-terminal de l’AC9, mais les auteurs suggéraient un possible positionnement de ces deux régions, entourant les domaines HD1 et HD2 (introduction, *Figure I12*). Sur la base de ce modèle incomplet et de la discussion de cet article, nous avons complété la structure partielle de l'AC9 bovine (Bos taurus), en combinant les méthodes de modélisation comparative et de « fold recognition », pour proposer un modèle prédictif complet de l’AC9. Sur la base de ce modèle de l’AC9, nous avons construit les premiers modèles prédictifs de l'AC8A et de l'AC8E (Article 1 *Figure2A et B*). La superposition de ces deux modèles a révélé que l'absence des TM1-5 de l'AC8E

modifierait la position du TM6, ce qui en conséquence déplacerait le domaine N-terminal vers le haut (Article 1 *Figure2C*). Ce « shift » du domaine N-terminal créerait de nouvelles interactions avec les régions coiled-coil conduisant à la formation de quatre cavités ou « pockets » (Article 1 *Figure3*), qui déstabiliseraient l'orientation des domaines hélicoïdaux HD1 et HD2, affectant ainsi le site catalytique des hétérodimères d'AC. Le domaine N-terminal pourrait de cette façon être impliqué dans l'effet dominant négatif.

L'implication du domaine N-terminal de l'AC8E a été évaluée en étudiant les propriétés de l'AC8E délétée de son domaine N-terminal (délétion des 2 à 179aa) et appelée AC8EΔNt. Les expériences de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence, démontrent que l'AC8EΔNt comme l'AC8E, est capable de s'hétérodimériser avec l'AC3 (Article 1 *Figure4A*) et qu'elle est localisée au niveau intracellulaire comme l'AC8E et contrairement à l'AC8A qui est membranaire (Article 1 *Figure4B*). Ceci témoigne que la délétion du domaine N-terminal n'affecte ni sa capacité à former des hétérodimères avec les autres AC, ni sa localisation subcellulaire.

Nous avons suivi par imagerie de biosenseur (^{T}EPAC^{VV}) la dynamique de production d'AMPc sur des cellules HEK contrôles ou exprimant stablement l'AC8E ou l'AC8EΔNt, en réponse à la forskoline et à l'isoprotérénol (agoniste des récepteurs β-adrénergiques). La production d'AMPc en réponse à la forskoline est restaurée lorsque le domaine N-terminal de l'AC8E est délété, validant ainsi l'implication de ce domaine, suggérée par la modélisation, dans l'inhibition de l'activité des autres cyclases (Article 1 *Figure 5C à 5F*). Cependant en réponse à l'isoprotérénol, la production d'AMPc est similaire entre les cellules exprimant l'AC8E et l'AC8EΔNt (Article 1 *Figure5A et B*). L'isoprotérénol n'active que les récepteurs β-adrénergiques exprimés à la surface de la cellule alors que la forskoline, qui pénètre dans la cellule, peut activer à la fois les cyclases membranaires et celles séquestrées dans le réticulum avec l'AC8EΔNt. Ces résultats mettent en évidence que l'effet dominant négatif de l'AC8E implique deux domaines : le domaine M2 qui est responsable de l'hétérodimérisation AC8E/AC et impliqué dans la séquestration des AC fonctionnelles dans le RE, et le domaine N-terminal qui inhibe le site catalytique du dimère AC8E/AC. Ainsi, nous démontrons l'existence d'un double mécanisme d'inhibition de la production d'AMPc, qui propose un niveau additionnel de régulation de la production d''AMPc, qui peut avoir lieu aussi bien à la membrane plasmique, que dans les membranes intracellulaires.

I.2. Article 1

En révision à BBA Mol Cell Research (16 août 2023)

Dual inhibitory mechanism of the truncated form of adenylyl cyclase 8 in cell signal integration: structural and functional approaches

Authors: Yohan Legueux-Cajgfinger[1,#], Mahesh Velusamy[2,#], **Samar Fathallah[1,#]**, Benjamin Vallin[1], Laurent Duca[2], Manuel Dauchez[2], Pierre Vincent[1], Isabelle Limon[1,§] and Régis Blaise[1,§,*].

Affiliations:

[1] Sorbonne Université, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), CNRS UMR 8256, Biological Adaptation and Ageing, 7 quai St-Bernard, F-75005, Paris, France.

[2] CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Université de Reims Champagne Ardenne, F-51095 Reims, France.

 # These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

§ These authors have contributed equally to this work and share last authorship.

* Corresponding author Régis Blaise, regis.blaise@sorbonne-universite.fr ;

NB :
Parmi les travaux présentés dans l'article, j'ai contribué aux expériences présentées dans la figure 1 et j'ai réalisé les expériences de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence présentées en figure 4 ainsi que les constructions des protéines de fusion AC8A-mGFP, AC8E-mGFP ou AC8EΔNt-mGFP utilisées pour les IF. J'ai également effectué une majeure partie des expériences de biosenseurs ainsi que les analyses présentées en figure 5. Le reste des expériences ont été réalisées par Yohan Legueux-Cajgfinger (Yohan LC) ou Mahesh Velusamy.

ABSTRACT

Adenylyl Cyclase 8E (AC8E), which lacks part of M1 transmembrane domain, has been previously shown to dimerize with AC3 and down-regulate its activity, but the molecular mechanism of this inhibitory effect has remained elusive. Here, we first show that AC8E also inhibits AC2 and AC6, highlighting the functional importance of this novel regulatory mechanism in the cAMP signaling pathway across AC families. We then completed the partial structure of Bos taurus AC9 using combinations of comparative modeling and fold recognition methods, and used this as a template to build the first full 3D-models of AC8 and AC8E. These models evidenced that the lack of M1 transmembrane domain of AC8E shifts the N-terminal domain, which impacts the orientation of the helical domains, thus affecting the catalytic site. This was confirmed in living cells with cAMP imaging, where we showed that the N-terminal domain is required for reducing cAMP production. Our data also show that AC8E prevents the translocation of other ACs towards the plasma membrane, further reducing the cAMP responsiveness to extracellular signals. This newly discovered dual inhibitory mechanism provides an additional level of regulation of cAMP-dependent signals integration.

1. INTRODUCTION

The response of cells to their environment strongly depends 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 (AC1-9), with discrete tissue distributions and unique regulatory properties, providing a potential focal point within the cell for the integration of diverse stimuli [1,2]. ACs 1 to 9 all have an intracellular N-terminus, two cassettes organized into six membrane spanning domains (M1 and M2) and two cytosolic domains (C1 and C2), each divided into 2 distinct functional a and b units. The regulatory N-terminal, the C1b and the C2b domains have little homologies and determine their unique properties. The C1a and C2a domains, which are the most homologous among AC isoforms, interact together to form the catalytic core responsible for cAMP production [3]; its molecular structure has been modeled associated to G-alphas protein in the late 1990's [1,4–6]. The two transmembrane cassettes are involved in the assembly of ACs allowing for the formation of homo- or hetero-dimers that have often been considered as the functional unit of these enzymes [7,8].

We have recently identified a new family of four short AC8 proteins derived from AC8 RNA splice-variants in inflamed rat vascular smooth muscle cells [9]. They are referred to as AC8E-H, in accordance with the nomenclature of previously identified variants [10–12]. Compared to the full-length AC8 (AC8A), AC8E-H mRNA share an in-frame deletion of 414bp at the end of exon 1, which translates into AC8 proteins lacking the amino acids 180 to 317 forming the first five transmembrane domains (TM1-5) and their linked intracellular and extracellular loops. AC8F, AC8G and AC8H

display the additional deletion of exon 8, exon 11 or both, respectively identified in AC8C, AC8B and AC8D splice variants [9,10,12] encoding for the end of C1b domain and the extracellular loop between TM7 and TM8. Whereas AC8G-H are unstable and poorly expressed, AC8E-F act as dominant-negatives by dimerizing with the full-length AC3, retaining the complex in the endoplasmic reticulum, thereby efficiently inhibiting global cAMP production within the cell [9].

In 2019, a cryo-electron microscopy structure of bovine AC9 lacking the N-terminus and C1b domains was described [13]. Here, we proposed a predicted complete structure of the bovine AC9 using the combination of comparative modeling and fold recognition. We then constructed the complete 3D-models of full-length AC8 (AC8A) and AC8E, using the full AC9 model as a template, leading to highlighting structural changes within AC8E. Based on these structural changes, we set up biochemical and real-time biosensor experiments to unravel the AC8E inhibitory mechanism on cell cAMP production. Our results, combined with our previous study [9], demonstrate that the AC8E-dependent mechanism preventing the signals integration involves the N-terminus and the heterodimerization domain(s).

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, 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. Forskolin (fsk) and isoproterenol were obtained from Tocris Bioscience, Bristol, UK. Opti-MEM and NuPAGE LDS sample buffer were obtained from Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France. We purchased the QIAquick Gel Extraction Kit and QIAprep Spin Miniprep Kit from Qiagen, Les Ulis, France. FuGENE HD was purchased from Promega, Charbonnières-les-Bains, France. Halt protease inhibitor cocktail and Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads 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 and G418 were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA. Nitrocellulose membranes were purchased from Amersham, Courtaboeuf, France. Primary antibodies were purchased from Abcam (Paris, France) or Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germany); HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Abliance, Compiègne, France. We obtained the cAMP - Gs HiRange kit from Cisbio Bioassays, Codolet, France. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs, Évry, France. Infusion cloning kit and CloneAmp HiFi PCR Premix were purchased from Takara Europe, Saint-Germain-

En-Laye, France. The Dako fluorescence mounting medium from Dako, Carpinteria, CA, USA.

2.2 Molecular modeling and docking

The sequences of adenylate cyclases type 8A (NP_058838.1) and 8E (AWX41284.1) from *Rattus Norvegicus* were retrieved from the NCBI reference sequence database. The best template was selected using protein BLAST against the PDB database. The domains of the above targets were further classified against the identified template AC9 from *Bos taurus* (PDB 6R4O_A and 6R3Q_A with a 4.2Å and 3.4Å resolution, respectively) using a T-coffee server. Subsequently, the helical orientations of transmembrane cassettes M1(TM1-6) and M2 (TM7-12) were defined using various online membrane prediction servers such as TOPCONS, CCTOP, TMHMM, UniProt, MESAT-SVM, Protter and T-Coffee.

The missing domains (N, C1B, and C2B) and loop regions of AC9 were modeled individually using the combinations of comparative modeling and fold recognition [14]. It was carried out using the SWISS-MODEL and Phyre2 servers, respectively. The loops and the helical orientations of the AC8A and AC8E models were defined based on the multiple sequence alignments and cross-validated using diverse servers for membrane prediction. Then, the known and unknown domain models were assembled using protein-protein docking procedure and AIDA *ab-initio* domain assembly server. For this purpose, both blind and site-specific docking was performed on the AC9 and AC8 models against the C1B domain model using both ClusPro and HADDOCK servers, respectively. The models were further refined using the 3D-protein structure refinement server 3Drefine. The detailed analysis of interactions and the molecular surface areas were calculated for the truncated AC8E model to predict its consequence using PyMOL and CASTp servers, respectively .

2.3 Cell culture

HEK-293 cells were grown at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO_2, in DMEM containing 4.5 g·L−1 glucose, 4mM L-glutamine, 5% FCS, 100 U·mL−1 penicillin and 100 µg·mL−1 streptomycin.

2.4 Cloning strategies

Primers used are all given in the **Supplementary Table 1**. The plasmids encoding AC8E, AC3-HA, pcDNA3-HA and $^{T}Epac^{VV}$ are described in Vallin et al., 2018 [9]. The dog AC6 and rat AC2 cDNAs were amplified by PCR and cloned into pcDNA3-HA at the EcoRI-BamHI sites to generate the HA-tagged AC6 or AC2 expression plasmids. AC8EΔNt encoding plasmid was generated from AC8E-encoding plasmid (template plasmid) by a PCR-based strategy deleting the AC8E cDNA base pairs from 4 to 537. The PCR product was recircularized using the infusion cloning kit after removing the template plasmid (DpnI digestion).

pCMV-mEGFP-N1 plasmid was generated by PCR to create the A206K mutation into the EGFP encoding sequence of the pCMV-EGFP-N1 plasmid. The mEGFP-tagged AC8A or AC8E-encoding plasmid was generated by PCR-cloning of AC8A, or AC8E (Supplementary Table 1) in frame with mEGFP into pCMV-mEGFP-N1 plasmid using Infusion cloning kit. All constructs were sequenced on both strands (Eurofins Genomics, les Ulis, France).

2.5 Transitory and stable transfections

Transient and stable transfection of plasmids in HEK293 cells were performed according to the FuGENE HD protocol database as previously described in [9].

For stable transfection, HEK-293 cultured in 100mm dishes were transfected by 10µg of empty pcDNA3 (control), pCDNA3-AC8E or pcDNA3-AC8EΔNt according to the FuGENE HD protocol. After 48h, transfected HEK-293 were treated with 0.8µg·mL−1

of G418 for one week to obtain polyclonal cell populations. Monoclonal cell populations were then generated by limiting dilution and screened by immunoblotting.

2.6 Co-immunoprecipitation and immunoblots

Transiently transfected HEK-293 cells were washed with ice-cold PBS and lysed in 1 mL of RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.3% (v/v) 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 x g for 10 min, supernatants were collected. 1mg of proteins were incubated on a rotating wheel at room temperature for 1h with 25µl of magnetic anti-HA beads (Pierce). Beads were then washed four times in TBS-T (20mM Tris, 100mM NaCl, 0.05% Tween) and complexes were eluted in 30µl of RIPA buffer + 1% SDS. Eluates were denatured 30 min at 37°C in NuPAGE LDS sample buffer + NuPAGE reducing agent and were subjected to 3-8% Tris-Acetate gradient electrophoresis gel with Tris-Acetate running buffer with antioxidant reagent (Nupage system, Invitrogen), according to the manufacturer, and immunoblotted as described below. Input control for immunoprecipitation were performed on 30µg of HEK293 cell lysates, denatured 30 min at 37°C in NuPAGE LDS sample buffer + NuPAGE reducing agent and were subjected to 4-12% Bis-Tris gradient electrophoresis gels with MOPS running buffer (Nupage, Invitrogen), according to the manufacturer.

Immunoblots were performed as previously described using goat anti-AC8 (SantaCruz, SC-1967), mouse anti-HA (Abcam, ab-130275), and mouse anti beta-actin (Sigma-Aldrich, A5441) as primary antibodies and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-goat (Invitrogen, PA1-28664) and anti-mouse (BioRad,1706516) secondary antibodies. Immunolabeling was detected by enhanced

chemiluminescence using the Clarity western ECL substrate (BioRad), on ChemiDoc Imaging System (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

2.7 cAMP accumulation assay

cAMP accumulation in whole-cell lysates of transiently transfected HEK-293 cells was measured with the cAMP-Gs HiRange kit after incubation for 60 min with the PDE inhibitor IBMX (200 µM) and the general AC activator forskolin (fsk, 10 µM), according to the manufacturer's instructions.

2.8 Fluorescence microscopy

HEK cells were grown on 10mm poly-Lysine-coated coverslips and were transfected 24h with expressing vectors encoding HA-AC2, HA-AC3 or HA-AC6 with or without mGFP-AC8E or mGFP-AC8EΔNt. Cells were fixed by incubation with PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at 37°C. PFA was then neutralized by incubation for 10 min with PBS plus 50mM NH_4Cl at room temperature. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min and blocked in 2% BSA for 60 min at room temperature. Cells were labelled with Alexa-596 conjugated anti-HA antibody (5 µg/mL in PBS + 0.1%BSA, Invitrogen #A21288) over night at 4°C. After 3 washes (PBS + 0.1%Tween20), coverslips were mounted with antifade Mounting Medium with DAPI (VectaShield H-1200-10). Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.9 cAMP imaging

Cells on 10mm poly-L-lysine-coated coverslips were transfected with the $^{T}Epac^{VV}$-encoding vector for 24 h. Coverslips were placed in a microscope chamber continually perfused (2 mL·min^{-1}) with BBS buffer (125mM NaCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 1.25mM NaH_2PO_4, 26mM $NaHCO_3$, 25mM 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 the 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. Images were acquired with iVision (Biovision, Exton, PA, USA) and analyzed in the IGOR Pro environment (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) with a custom package, Ratioscope, available on a public data repository (DOI: 10.25493/5G5V-HBC). No correction for bleed-through or direct excitation of the acceptor was applied to keep the benefit of ratiometric cancellation of artifacts.

2.10 Statistics

All data are presented as the means ± SEM of at least three independent experiments. Meta-analysis of experiments was performed using the same Ratioscope package. The statistical significance of differences between groups was assessed with GraphPad Prism 6 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The non-parametric 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 AC8E exerts a dominant-negative effect across AC families

AC8E exerts a dominant-negative effect on AC3 activity [9]. Therefore, we first tested whether AC8E could also exert a dominant-negative effect on other ACs such as AC2, from group 2, and, AC6, from group 3 (**Fig. 1**). Of note, AC6 is one of the two mostly expressed ACs in VSMCs, the other being AC3 [15,16]. Coimmunoprecipitation experiments (**Fig. 1A**) and cAMP accumulation assays (**Fig. 1B**) were performed on HEK-293 cells transiently expressing AC8E and/or HA-tagged AC2, AC3 or AC6 (HA-AC2; HA-AC3; HA-AC6). The expression of HA-tagged ACs and AC8E was confirmed by western blot (**Fig. 1A**, left panels).

After HA-immunoprecipitation of AC2, AC3 or AC6 (**Fig. 1A**, upper right panel), the anti-AC8 antibody revealed a single 115 kDa-band in HEK-293 cells co-expressing AC8E and HA-AC2, HA-AC3- or HA-AC6 (**Fig. 1A**, lower right panel, lanes 6, 7 and 8). Co-expression of AC8E with other AC significantly lowers levels of cAMP synthesis in response to fsk in cells co-expressing AC2, AC3, or AC6 and AC8E as compared to cells expressing full length ACs only (**Fig 1B**, AC8E/AC2 *vs* AC2: 221.7 ± 15.98 *vs* 627.0 ± 72.65%, P<0.01; AC8E/AC3 *vs* AC3: 121.0 ± 9.66 *vs* 326.0 ± 16.91%, P<0.001; AC8E/AC6 *vs* AC6: 363.1± 22.96 *vs* 629.3 ± 38.04%, P<0.001). AC8E alone also decreased the fsk-induced production of cAMP observed in pcDNA3 (control)-transfected cells suggesting that it dimerizes with endogenous ACs. Of note, AC2, AC3 and AC6 expressed alone are functional since fsk significantly raised cAMP accumulation (AC2 *vs* ctrl: 627.0 ± 72.65 *vs* 100.0 ± 6.72%, P<0.01; AC3 *vs* ctrl: 326.0 ±16.91 *vs* 100.0 ± 6.72%, P<0.001;AC6 *vs* ctrl: : 629.3 ± 38.04 *vs* 100.0 ± 6.72%, P<0.001). Altogether, these results suggest that AC8E

expression may constitute a broad system for negative regulation of the cAMP-dependent signal integration.

3.2 3D-structures of AC8 and AC8E.

To further explain the molecular dominant negative effect of AC8E, we used a homology modeling approach based on the 3D-structure of the bovine AC9 published by Qi et al [13]. These structural data were completed and refined as described in the Materials and Methods section in order to propose a predictive full structure of AC9 (**supplementary Fig. S1**), that served as a template for building predictive computational 3D models of full-length AC8A and truncated AC8E **(Fig. 2A** and **2B** left panels**)**. The position of the N-terminus domains of AC8A and AC8E (surface representation) and that of the adjacent transmembrane domains, TM1 for AC8A and TM6 for AC8E (cylindrical representation) are presented in **Fig. 2A** and **2B** right panels, respectively. Merging the surface representation of the two predicted 3D models of AC8A and AC8E (**Fig. 2C)** reveals that the lack of TM1-5 transmembrane domains in AC8E modifies the position of the TM6 domain (in orange) and consequently shifts the N-terminus of AC8E.

As mentioned by Qi et al [13], membrane domains can influence the catalytic domain *via* the helical domains (HD) and the adjacent coiled-coil regions, both defined for AC8A and AC8E in **supplementary Fig. S2**. We next identified the interactions between the N-terminus domain (referred to as SITE 1, **Table 1**) and the helical domains (HD1 and HD2) or the coiled-coil regions (referred to as SITE 2, **Table 1**), for both AC8A and AC8E. In AC8A, amino acids from the N-terminus domain form 6 hydrogen bonds with some of the HD1 domain residues and none involve the HD2 or coiled-coil regions (**Fig. 3A**). Conversely, in the AC8E, hydrogen bonds are predicted between the N-terminus domain and the coiled-coil regions, as well as between the

N-terminus domain and the HD2 domain (**Fig. 3B**). The molecular surface area volume (MSV) combined with the pocket molecular surface area (PMSA) highlighted 4 small cavity pockets (numbered 2, 16, 22, and 28) between the N-terminus and the coiled-coil region (H2.1) within the AC8E (**Fig. 3C**)**.** These small cavity pockets could reduce the flexibility of AC8E in the vicinity of the catalytic core and modify the shape and the structure of the protein. Thus, the analysis of AC8 predictive models shows that the missing part of AC8E (i.e.TM1-5) moves the AC8E N-terminus domain in a position that impacts the HDs orientation and coiled-coil regions.

3.3 The AC8E N-terminus domain is responsible for the inhibitory effect on AC partners.

Such a shift could possibly modify the catalytic core of AC heterodimers that include AC8E, and thus be involved in the AC8E-dominant negative effect [9]. To test whether the N-terminal domain is involved in the AC8E inhibitory effect on cAMP production, the amino acids from 2 to 179 were deleted. Before using this new construct, referred to as AC8E∆Nt, we tested it for heterodimerization capacity and subcellular location compared to AC8E (**Fig. 4**). Co-immunoprecipitation studies were performed using the HA-antibody on lysates obtained from cells transiently expressing HA-tagged AC2, AC3 or AC6, with or without AC8E or AC8E∆Nt (**Fig. 4A**). The expression of HA-AC2, HA-AC3, HA-AC6, AC8E and AC8E∆Nt was confirmed by western blot (**Fig. 4A**, left panels). The analysis of HA-AC2, HA-AC3 and HA-AC6 immunoprecipitated complexes (**Fig 4A**, right panel lane 13 to 24) reveals a single band corresponding to AC8E (115 kDa) or AC8E∆Nt (100 kDa) (**Fig. 4A** right panel, lane 19 to 24). No bands are observed in the negative control (**Fig.**

4A, right panel, lane 13). However, a low-intensity band is detected after HA-immunoprecipitation of HEK expressing AC8E or AC8EΔNt alone (**Fig. 4A**, right panel lane 14 and 15), resulting from non-specific interaction of the anti-HA antibody. Immunofluorescence experiments reveals that HA-AC2, HA-AC3 and HA-AC6 expressed alone, are mainly located at the plasma membrane (**Fig 4B**, lane 1,4 and 7), while they co-localized in intracellular compartments when co-expressed with AC8E or AC8EΔNt (**Fig 4B**, lane 2,5,8 and 3,6,9 respectively). AC8E and AC8EΔNt displayed a similar intracellular pattern of localization, in contrast to AC8 full-length (AC8A) which is at the plasma membrane (**Supplementary Figure S3.A**). This is consistent with our previous data demonstrating that AC8E is trapped inside the cell, while the functional full length AC8A is expressed at the plasma membrane [9]. Altogether, these results show that the deletion of the N-terminal domain of AC8E neither affects its subcellular location nor its ability to form heterodimers with AC2, AC3 and AC6.

cAMP dynamics and ACs functionality were measured in response to isoproterenol, an agonist selective of the Gs-protein coupled membrane β-adrenergic receptor (3nM) using the FRET-based biosensor $^{T}Epac^{VV}$ (**Fig. 5A and B**).). We used isolated clones of HEK cells stably expressing AC8E (HEK-AC8E clone #13) or AC8EΔNt (HEK-AC8EΔNt clone #6) selected for their similar levels of expression (**supplementary Fig. S3.B**). Of note, endogenous adenylyl cyclases transcripts expression was evaluated by real-time PCR in the HEK-293 cells used for this study (**supplementary Fig. S3.C**) and is quite similar to what has been described in the literature [17,18]. Relative changes in intracellular cAMP production in response to isoproterenol were monitored over time by calculating the ratio R of donor fluorescence emission (F480 nm) to acceptor (F535 nm) throughout the entire study.

Rmax was determined at the end of each experiment by adding 200 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), a broad-spectrum PDE inhibitor, and 12 µM of fsk. For statistical analyses, cAMP level is systematically reported as a fraction of the maximum ratio change (Rmax), corresponding to saturation of the biosensor. As shown in **Fig. 5A and B**, the isoproterenol-induced cAMP signal in AC8EΔNt cells is not statistically different from in AC8E cells and both are significantly lower related to control cells (0.39 ± 0.05 fold of Rmax for AC8EΔNt and 0.37 ± 0.04 fold of Rmax for AC8E, and 0.59 ± 0.04 fold of Rmax for control**,** AC8EΔNt *vs* AC8E, P>0.99 n.s, AC8EΔNt *vs* control P<0.05, and AC8E *vs* control, P<0.05).

Over the past decade, the idea of GPCR signaling from intracellular membranes has gained ground [19,20]. A 2017 study, using conformational biosensors, even showed that β-1 adrenergic receptors localized in the Golgi are functional and capable of ligand binding, leading to cAMP production [21]. Since isoproterenol is a non permeant ligand, we revisited these experiments using forskolin (fsk), a cell permeant compound which activates all membrane-bound ACs, including intracellular membrane Acs (except AC9 that needs the presence of activated Gs), to determine whether or not the AC8E N-terminal domain is involved in inhibiting the cyclase activity of intracellular AC8E/ACs dimers (**Fig. 5C and D**). Consistently with our previous work [9]**,** the cAMP production in HEK-AC8E cells is lower in response to 5 µM fsk than in control cells (0.44 ± 0.05 *vs* 0.86 ± 0.03 fraction of Rmax**,** P<0.05**, Fig.5D**); conversely, that of HEK-AC8E∆Nt cells is similar to control HEK cells (0.91 ± 0.02 *vs* 0.86 ± 0.03 fraction of Rmax, ns, **Fig. 5D**). The baseline ratio and the Rmax were not significantly different between the different conditions **(Supplementary Fig.S4)**.

The global cell cyclase activity can be determined by measuring the slopes of traces while blocking phosphodiesterases (PDEs) [9]. To rule out any involvement of PDEs, we monitored cAMP synthesis over time in each cell in response to a low dose of fsk (1 µM) while blocking PDEs with 200 µM IBMX (**Fig. 5C** to **H**). In **Fig. 5E,** each colored thin trace represents the change in cAMP production within a single cell; the thick trace is the mean of all the traces obtained from a single experiment. **Fig. 5F** shows the average traces from 6 independent experiments obtained in response to 1µM fsk+IBMX. **Fig. 5G** recapitulates the mean of onset slopes calculated for each experiment. As shown in **Fig. 5F**, the average slope obtained from AC8E cells (magenta) is shallower than in control cells (black) whereas that of AC8E∆Nt (cyan) is similar. Accordingly, the average slope shows no statistical difference between AC8E∆Nt and control cells (2.99 ± 0.30 *vs* 2.49 ± 0.16, ns, **Fig. 5G**) conversely to that of AC8E cells which is significantly lower (1.17 ± 0.14 *vs* 2.49 ± 0.16**,** $p < 0.05$, **Fig. 5G**). Since the increase of the ratio depends on the buffering effect of the biosensor on cAMP -meaning that a slower onset is expected when the biosensor is present at a higher concentration-, we also plotted for each cell the slope at the origin of the ratio increase as a function of fluorescence intensity, used as a proxy for biosensor concentration **(Fig. 5H**). For the same amount of biosensor (or equal biosensor intensity expressed in count per second), the initial slope of the ratio curve (indicated by a symbol for each cell in **Fig. 5H**) is similar for AC8E∆Nt and control cells whereas lower in AC8E cells. These results demonstrate that the AC8E N-terminus domain is responsible for the inhibitory effect of AC8E on endogenous AC partners. Interestingly, partial deletions of the N-terminus domain (Δ2-44, Δ45-89, Δ90-134 and Δ135-179) did not prevent the AC8E dominant-negative effect

(**supplementary Fig. S5**), suggesting that it is triggered by the entire N-terminus domain rather than a particular motif.

Our results combined to previously published data [9,22,23] demonstrate that the dominant negative effect of AC8E is due to two domains i) the M2 domain, responsible for heterodimerization of AC8E/AC dimers, which should be involved in the entrapment of functional ACs inside the cell and, ii) the N-terminus domain inhibiting the catalytic core of AC8E/AC dimers. The trapping of AC8E/ACs dimers combined to the inhibitory effect of AC8E N-terminus domain on cAMP production prevents the integration of signals from the plasma and intracellular membranes (**Fig. 6**).

4. DISCUSSION

Here, we used template-based structure modeling [24] to predict the complete 3D structure of AC9 positioning the missing Nter and C1b domains [13]. Based on this, we then predicted the 3D models of the full-length AC8 (AC8A) and the truncated version AC8E by structural analysis with computational homological modeling, making this paper the first publication modeling the full 3D structures of two full-length ACs, AC8A and AC9. The comparative analysis of the AC8A and AC8E models combined with cAMP biosensor imaging of deletion mutants demonstrate that the AC8E N-terminal domain inhibits the AC activity of AC8E/ACs dimers.

The analysis of predicted structures revealed that the helical domains HD1 and HD2 are stabilized by coiled-coil regions next to the catalytic site ([13]**, Supplementary Fig. S2D**). Since coiled-coil domains are defined as "molecular rulers" for the assembly of the catalytic site of several enzymes [25–27], they likely provide the

framework for the correct dimerization of the C1a and C2a domains which together constitute the catalytic core. As a result of this, the N-terminal and C1b domains surrounding the helicoidal domains HD1 and HD2 (**Fig. 2 and Supplementary Fig. S2**) add a degree of constraint which undoubtedly contributes to the correct assembly of the catalytic site as suggested by Qi and coll [13].

In the AC8E, the lack of the transmembrane regions TM1-5 lead to several interdependent structural modifications. Indeed, the TM6 region changes position and becomes “perpendicular” to the M2 cassette; this translates into a drastic shift in the positioning of the N-terminus domain which, in turn, establishes new interactions towards coiled-coil regions leading to the formation of 4 small cavity pockets that likely destabilize HD1 and HD2 domains (**Fig. 2D**). Cavity pockets are known to modify local structure by decreasing protein packing densities of residues within helices [28]. As the possibly destabilized HD1 and 2 are in the vicinity of the catalytic core, one may assume that it changes the catalytic core structure of the AC dimers formed with AC8E, rendering the ensemble inactive. However, template-based modeling predicts the native structure of a protein target by sequence-sequence or sequence-structure alignment, but does not detail atomic interactions determining molecular structure [29]. Therefore, the assumption as to whether the cavity pockets effectively affect HD1 and HD2 structure and whether it destabilizes the catalytic core of the AC dimers formed with AC8E should be evaluated using molecular dynamics combined with molecular docking within a lipid bilayer.

According to structural data suggesting that the dominant-negative effect of AC8E on AC partners comes from its N-terminus domain, deleting it prevents the decrease of cAMP production in response to forskolin (**Fig. 5D**). However, we also found that this did not occur with the selective β-adrenergic membrane receptor agonist isoproterenol (**Fig. 5B**) due to AC8EΔNt intracellular location (**Fig. 4B and S3A**). The

intracellular AC8EΔNt remains able to dimerize with AC partners (**Fig. 4A**), preventing the export of AC8EΔNt-AC dimers towards the plasma membrane. Thus, one may suggest that the N-terminus domain is involved in both the dominant-negative effect and intracellular localization of AC8E. In support of such an assumption, the targeting of the full-length AC8 to the plasma membrane depends on the binding of caveolin1 to two "caveolin-binding motifs," CBM1 and CBM2 localized in the N- and C-terminal domains, respectively [30].

The intracellular retention of ACs heterodimers by AC8E is one of the mechanisms for regulating the integration of extracellular signals mediated by plasma membrane G protein-coupled receptors. In this respect, the AC8E is one more example of truncated transmembrane proteins acting in a dominant-negative manner by retaining their functional homologue inside the cells in the ER [31–37]. However, the central concept that signaling through second messengers such as cAMP takes place only at the plasma membrane is increasingly being questioned since functionally relevant GPCR and AC isoforms have been found in intracellular compartments such as endosomes, ER and golgi vesicles [21,38,39]. Bearing this in mind, the AC8E N-terminus-dependent mechanism of regulation of cAMP signaling takes on a new dimension, although functional ACs in ER have been poorly documented.

Alternate splicing of several ACs mRNA naturally occurs in different tissues and species, including humans [18,40–42] (Genbank AB007882, AA961399, AW002651, AW969619, AI807304, BE466682, AV723967). Expression of short ACs issued from mRNA spliced variants combined with heterodimerization process could therefore constitute a general system of regulation for the signal transduction involving cAMP-dependent pathways. This idea strengthens the case for characterizing the patterns

of expression of AC splice variants as well as the subcellular location, the function and the pathophysiological implications of their corresponding proteins.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. AC8E interacts with AC2, AC3 and AC6 and exerts a dominant negative effect on their activitiy.

A. Western Blots. **Left panels :** Input showing the levels of expression of AC2, AC3 , AC6, AC8E and β-actin in HEK-293 cells transiently transfected. **Right panels:** immunoblots (IB) with AC8 antibody (*lower panel*) and HA-antibody (*upper panel*) after HA-immunoprecipitation (IP). Blot presented are representative of 4 independent experiments.

B. cAMP accumulation assay performed on HEK293 cells transiently expressing AC8E and/or AC2, AC3 or AC6, after a 60-min treatment with forskolin (10μM) in the presence of IBMX (200μM). The results are expressed in % of control cells and are represented as mean ± SEM of 4-9 independent experiments**.** Statistical analysis was carried out with the Mann-Whitney nonparametric test. *** P <0.001, ** P <0.01 compared to control cells; $^{###}$ P <0.001, $^{\#}$ P <0.05 compared to the corresponding full AC expressed alone.

Figure 2. Predictive 3D complete models of adenylyl cyclase 8A and 8E reveal change in N-terminal domain positioning.

Predictive 3D-structure of *Rattus norvegicus* full-length AC8A (**A**) and truncated AC8E (**B**). *Left Panels:* The C1b (blue) and N-terminal (green) domains are parallel and both surround the helical domains (HD1 and HD2, in red). *Right panels*: Overall structures of the AC8A and AC8E models in a ribbon representation. The N-domains of AC8A (blue), and AC8E (olive green) are shown using surface representation. The TM1 in AC8A and TM6 in AC8E are represented in green and orange cylindrical cartoons, respectively. ***C.*** *Left:* Superimposition of the AC8A and AC8E predictive

3D-structures. *Right.* 180° z-rotation. The shift of the Nter domain of AC8E is indicated by a dashed arrow.

Figure 3. Interactions between N-domain and coiled-coil regions differ from AC8A and AC8E.

Identification of the interaction sites between the N-domain and coiled-coil regions in full length AC8A (**A**) and truncated AC8E (**B**). The amino acids of HD domains or coiled-coil regions for both AC8A and AC8E are given in red; that of the N-terminus domain of AC8A and AC8E are given in blue and green, respectively.

Representation of the four cavity pockets identified in AC8E formed by the interaction sites between the N-domain and H2.1 coiled-coil region (**C**). Detailed information is given in **Table 1** for each interaction. Red helix: Coiled-coil region (H2.1); Green loop: part of N-domain; Grey surface: interaction site/pocket.

Figure 4. **Deletion of AC8E N-terminus domain does not affect its ability to interact with AC2, AC3 or AC6, neither intracellular retention of other ACs.**

A. Western Blots. **Left panels :** Input showing the levels of expression of HA-AC2, HA-AC3 , HA-AC6, AC8E, AC8EΔNt and β-actin in HEK-293 cells transiently transfected. **Right panels:** immunoblots (IB) with AC8 antibody (*upper panel*) and HA-antibody (*lower panel*) after HA-immunoprecipitation (IP). Membranes were incubated first with anti-AC8 R20 antibody, then stripped to be blotted with HA antibody. Asterisk represent remaining AC8 signal on HA-blotted membranes. Blots presented are representative of 2 independent experiments.

B. Subcellular localization of AC8E, AC8EΔNt, AC2, AC3 and AC6. HEK were transfected with HA-AC2, HA-AC3, HA-AC6 with or without AC8E-mGFP, or

AC8EΔNt-mGFP encoding vectors. Confocal images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (63x). Scale bar =20µm.

Figure 5: **Deletion of AC8E N-terminus domain restores cAMP production in response to isoproterenol, but not to forskolin.**

Cyclic cAMP production induced by isoproterenol (**A** and **B)** or forskolin (**C** to **H**) in HEK cells stably expressing pcDNA3 (control), pcDNA3-AC8E (AC8E) or pcDNA3-AC8EΔNt (AC8EΔNt).

Panels A and C.*Top panels***:** microscopy fields in grayscale (top left) show biosensor fluorescence at 535 nm. The F480/F535 ratio is 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 3nM isoproterenol (**panel A**) or 5µM forskolin (**panel C**) and (c) during the application of fsk (12 µM) + IBMX (200µM), corresponding to the maximal ratio change (Rmax). *Bottom panels***:** each thin trace indicates the F480/F535 emission ratio over time in individual cells. The thick line represents the average of all traces. **Panels B and D**. Dot plot and bars representing the mean values for isoproterenol-induced (**panel B**) or fsk-induced (**panel D**) cAMP production are expressed in fraction of the maximal ratio (Rmax) change. Data shown are the means ± SEM of N=6 to 7 independent experiments. For each independent experiment, the symbol represents the mean of n=10 to 30 individual cells. Multiple comparisons were performed with the Kruskal-Wallis test. *: P <0.05, **: P <0.01, ns: not significant. **Panels E-H.** Biosensor imaging for measuring the onset slopes corresponding to global cyclase activity in cells. Fast bath application of a low concentration of fsk (1µM) moderately activated ACs while

cAMP degradation by PDEs was blocked with IBMX (200 µM). For each cell, biosensor concentration was estimated by measuring the intensity of the 10% brightest pixels within the region of interest. **E.** The color code of each ROI (**top panels**) reflects biosensor concentration: from blue (low concentration) to red (high concentration); matching color thin traces (**bottom panels**) indicate the F480/F535 emission ratio over time in the ROIs delimiting each cell. The thick trace represents the mean recordings. **F.** Average traces in response to 1µM fsk + 200µM IBMX are calculated based on the mean (thick) traces from 6 independent experiments. Shading indicates 95% confidence interval. **G.** Mean of onset slopes calculated for each independent experiment (N=6 per condition). **H.** Onset slope of the fluorescence ratio for each cell plotted against fluorescence intensity (reflecting biosensor expression levels). Results of only 3 out of 6 independent experiments are shown for a better readability.

Figure 6: Cartoon of the AC8E-dependent inhibitory mechanism on cAMP production.

Top Panel. Integration of extracellular signals mediated by G proteins-coupled receptors leading to cyclic AMP production at plasma and intracellular membranes. **Bottom Panel.** AC8E-dependent inhibitory mechanisms on cAMP production.

Table

Table 1. The list of individual interactions identified between N and helical domains of adenylate cyclase AC8A and AC8E models (SITE1=N-terminus domain, SITE2 = HD1, HD2, coiled-coil regions). #:number of poses for each AC. NR* (neighbor residues) = Amino-Acids closed to the h2.1 region.

#	Models	Site 1		Site 2		Interaction	Distance (Å)
1	**AC8A**	Gly57	N	Arg341	HD1	Hydrogen	3.11
2	**AC8A**	Tyr167	N	Arg344	HD1	Hydrogen	3.17
3	**AC8A**	Glu164	N	Arg344	HD1	Hydrogen	3.05
4	**AC8A**	Gly58	N	Gln345	HD1	Hydrogen	3.03
5	**AC8A**	Asn156	N	Arg351	HD1	Hydrogen	2.76
6	**AC8A**	Gln14	N	Arg359	HD1	Hydrogen	3.10
1	**AC8E**	His128	N	Arg206	HD1	Hydrogen	3.26
2	**AC8E**	Ser116	N	Asp785	HD2	Hydrogen	2.81
3	**AC8E**	Asn67	N	Arg803	h2.1	Hydrogen	3.06
4	**AC8E**	Asn67	N	Glu807	h2.1	Hydrogen	3.11
5	**AC8E**	His52	N	Arg811	h2.1NR*	Hydrogen	3.31
6	**AC8E**	Arg55	N	Glu824	h2.2	Hydrogen	2.74

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Supplementary Figure S1. Putative complete structure of adenylyl cyclase 9.

A. The complete structure of *Bos taurus* AC9 including the missing N-terminal, C1b, and C2b domains and the loop regions. **B.** The orientation of the C1b domain (blue) is highlighted in mesh representation (grey). The C1b domain connects together the C1a and TM7 domains. **C.** Representation of AC9 3D model turned forward by 90°. The C1b (blue) and N-terminal (green) domains are paralleled and both surround the helical domains (HD1 and HD2, in red). **D**. The coiled-coil regions of AC9 (h1.1 -

cyan, h1.2 - grey, h2.1- yellow, and h2.2 - green) stabilizing the HD1 and HD2 as mentioned by Qi et al. 2019, are shown with cartoon stick representation [12].

The newly incorporated N-terminus and C2B domains are linked to the N-terminal region of the TM1 helix and the C-terminal of C2A, respectively. The C1B domain parallels the N-domain based on docking results. Considering the orientation of the N and C1B domains, they twist around the helical parts HD1 and HD2, respectively. These observations correlate the unresolved density maps of both N-terminal and C1B domains of AC9 [12].

Supplementary Figure S2. Coiled-coil regions of AC8A and AC8E.

AC8A and AC8E coiled-coil regions were identified by multiple sequence alignment with the coiled-coil region of AC9 (h1.1, h1.2, h2.1 and h2.2 are highlighted in bold and underlined).

Supplementary Figure S3. Characterization of AC8E and AC8EΔNt expression in HEK-transfected and expression level of ACs transcripts in HEK.

A. Subcellular localization of AC8A (as a control of Adenylyl cyclase localization at plasma membrane), AC8E or AC8EΔNt. HEK were transfected with AC8A-mGFP, AC8E-mGFP, or AC8EΔNt-mGFP encoding vectors. Confocal images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (63x). Scale bar = 20µm. **B.** Western Blots showing the levels of expression of AC8E or AC8EΔNt in monoclonal stable HEK-293 obtained by limiting dilution. Immunoblots (IB) with AC8 antibody (*upper panel*) and beta actin-antibody (*lower panel*). Immunoblots were performed twice. **C.** Endogenous adenylyl cyclases transcripts in HEK-293 cell line, normalized to HPRT.

n.d: not detected (Cp>33). RT-qPCR were performed as preciously described by Vallin et al [9], primers used are presented in supplementary table S2. The results represent the mean ± SEM of 4 independent experiments.

Supplementary Figure S4. Basal and maximal cAMP levels in HEK.

Baseline ratio (referred as R basal) and maximal ratio (Rmax) in HEK-293 cells stably expressing empty vector (ctrl), AC8E or AC8EΔNt in biosensors experiments for measuring cAMP production in response to isoproterenol (A) or forskolin (B) . The data are the means ± SD of N=7 (**A**) or N=6 (**B**) independent experiments. For each independent experiment, values used represent the mean of n= 10 to 30 individual cells. The nonparametric two-tailed Kruskal-Wallis test awas used, P values are given on the graph.

Supplementary Figure S5. Iterative deletions of 45aa within AC8E N-terminal do not restore cAMP production.

A. cAMP accumulation assays on HEK cells transfected with empty vector (control), AC8E-; AC8EΔNt-; AC8EΔ2-44-; AC8EΔ45-89-; AC8EΔ90-135- or AC8EΔ135-179-encoding vectors after 1 hour of fsk (10µM) +IBMX (500µM) treatment. Results are expressed in % of control and the means ± SEM of 3 independent experiments are shown. Values were as follows: for 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 %. Side-by-side comparisons were performed with the Kruskal-Wallis test for unpaired data. **: P<0.01, ns : not significant. **B.** Immunoblot showing the levels of expression of AC8E, AC8EΔNt,

AC8E∆2-44; AC8E∆45-89; AC8E∆90-135, AC8E∆135-179 and β-actin in HEK-293 cells transiently transfected.

Supplementary Table 1: Cloning primers and strategies.

Supplementary table 2: List of primers used for RT-qPCR.

Acknowledgements:

We would like to thank JF. Gilles from the imaging facility of the Paris-Seine Biological Institute (IBPS), C. Dessauer for providing the AC3, AC2 and AC6 constructs and JB. Klarenbeek for providing the $^{T}Epac^{VV}$ expression plasmid.

This work was supported by the French Federation of Cardiology (FFC), the *Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose* (NSFA), the *Société Française de Cardiologie* (SFC), the *Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire* (GRRC), the *Fondation de France* (FDF) and the chair of research in molecular modeling MAgICS.

REFERENCES

[1] N. Defer, M. Best-Belpomme, J. Hanoune, Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase., Am J Physiol Renal Physiol. 279 (2000) F400-16. https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.3.F400.

[2] R.K. Sunahara, C.W. Dessauer, A.G. Gilman, Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases., Annu Rev Pharmacol Toxicol. 36 (1996) 461–80. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.002333.

[3] W.J. Tang, M. Stanzel, A.G. Gilman, Truncation and alanine-scanning mutants of type I adenylyl cyclase., Biochemistry. 34 (1995) 14563–72. https://doi.org/10.1021/bi00044a035.

[4] J.J. Tesmer, R.K. Sunahara, A.G. Gilman, S.R. Sprang, Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS., Science. 278 (1997) 1907–16. https://doi.org/10.1126/science.278.5345.1907.

[5] G. Zhang, Y. Liu, A.E. Ruoho, J.H. Hurley, Structure of the adenylyl cyclase catalytic core., Nature. 386 (1997) 247–53. https://doi.org/10.1038/386247a0.

[6] S.C. Van Keulen, D. Narzi, U. Rothlisberger, Association of Both Inhibitory and Stimulatory Gα Subunits Implies Adenylyl Cyclase 5 Deactivation, Biochemistry. 58 (2019) 4317–4324. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00662.

[7] D.M. Cooper, A.J. Crossthwaite, Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases., Trends Pharmacol Sci. 27 (2006) 426–31. https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.002.

[8] 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) 480–92. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.033.

[9] B. Vallin, Y. Legueux-Cajgfinger, N. Clément, M. Glorian, L. Duca, P. Vincent, I. Limon, R. Blaise, Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production, Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 1865 (2018) 1326–1340. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.012.

[10] 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) 1089–95. https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.1089.

[11] 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) 109–13. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00836-1.

[12] 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) 1383–93. https://doi.org/10.1007/s00125-003-1203-8.

[13] C. Qi, S. Sorrentino, O. Medalia, V.M. Korkhov, The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein., Science. 364 (2019) 389–394. https://doi.org/10.1126/science.aav0778.

[14] L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J. Sternberg, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis., Nat Protoc. 10 (2015) 845–58. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053.

[15] 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) 983–92. https://doi.org/10.1124/mol.62.5.983.

[16] 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) H1545-52. https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1545.

[17] K. Lefkimmiatis, M. Srikanthan, I. Maiellaro, M.P. Moyer, S. Curci, A.M. Hofer, Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1, Nat Cell Biol. 11 (2009) 433–442. https://doi.org/10.1038/ncb1850.

[18] M.G. Ludwig, K. Seuwen, Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms., J Recept Signal Transduct Res. 22 (2002) 79–110. https://doi.org/10.1081/rrs-120014589.

[19] S.E. Crilly, M.A. Puthenveedu, Compartmentalized GPCR Signaling from Intracellular Membranes., J Membr Biol. 254 (2021) 259–271. https://doi.org/10.1007/s00232-020-00158-7.

[20] A. Radoux-Mergault, L. Oberhauser, S. Aureli, F.L. Gervasio, M. Stoeber, Subcellular location defines GPCR signal transduction., Sci Adv. 9 (2023) eadf6059. https://doi.org/10.1126/sciadv.adf6059.

[21] R. Irannejad, V. Pessino, D. Mika, B. Huang, P.B. Wedegaertner, M. Conti, M. von Zastrow, Functional selectivity of GPCR-directed drug action through location bias., Nat Chem Biol. 13 (2017) 799–806. https://doi.org/10.1038/nchembio.2389.

[22] 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) 185–90.

[23] C. Gu, J.J. Cali, D.M. Cooper, Dimerization of mammalian adenylate cyclases., Eur J Biochem. 269 (2002) 413–21.

[24] A. Szilagyi, Y. Zhang, Template-based structure modeling of protein–protein interactions, Current Opinion in Structural Biology. 24 (2014) 10–23.

https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.11.005.

[25] G. Hagelueken, B.R. Clarke, H. Huang, A. Tuukkanen, I. Danciu, D.I. Svergun, R. Hussain, H. Liu, C. Whitfield, J.H. Naismith, A coiled-coil domain acts as a molecular ruler to regulate O-antigen chain length in lipopolysaccharide., Nat Struct Mol Biol. 22 (2015) 50–56. https://doi.org/10.1038/nsmb.2935.

[26] L. Truebestein, D.J. Elsner, E. Fuchs, T.A. Leonard, A molecular ruler regulates cytoskeletal remodelling by the Rho kinases., Nat Commun. 6 (2015) 10029. https://doi.org/10.1038/ncomms10029.

[27] L. Truebestein, T.A. Leonard, Coiled-coils: The long and short of it., Bioessays. 38 (2016) 903–16. https://doi.org/10.1002/bies.201600062.

[28] S. Sonavane, P. Chakrabarti, Cavities and atomic packing in protein structures and interfaces., PLoS Comput Biol. 4 (2008) e1000188. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000188.

[29] H. Geng, F. Chen, J. Ye, F. Jiang, Applications of Molecular Dynamics Simulation in Structure Prediction of Peptides and Proteins., Comput Struct Biotechnol J. 17 (2019) 1162–1170. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.010.

[30] V.G. Tabbasum, D.M.F. Cooper, Structural and Functional Determinants of AC8 Trafficking, Targeting and Responsiveness in Lipid Raft Microdomains., J Membr Biol. 252 (2019) 159–172. https://doi.org/10.1007/s00232-019-00060-x.

[31] M. Benkirane, D.Y. Jin, R.F. Chun, R.A. Koup, K.T. Jeang, Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32., J Biol Chem. 272 (1997) 30603–6. https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30603.

[32] M. De Bellis, F. Pisani, M.G. Mola, D. Basco, F. Catalano, G.P. Nicchia, M. Svelto, A. Frigeri, A novel human aquaporin-4 splice variant exhibits a dominant-negative activity: a new mechanism to regulate water permeability., Mol Biol Cell. 25 (2014) 470–80. https://doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0331.

[33] R. Grosse, T. Schöneberg, G. Schultz, T. Gudermann, Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor., Mol Endocrinol. 11 (1997) 1305–18. https://doi.org/10.1210/mend.11.9.9966.

[34] K.D. Karpa, R. Lin, N. Kabbani, R. Levenson, The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors., Mol Pharmacol. 58 (2000) 677–83. https://doi.org/10.1124/mol.58.4.677.

[35] J. Rhyne, M.M. Mantaring, D.F. Gardner, M. Miller, Multiple splice defects in ABCA1 cause low HDL-C in a family with hypoalphalipoproteinemia and premature coronary disease., BMC Med Genet. 10 (2009) 1. https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-1.

[36] C.L. Wellington, Y.Z. Yang, S. Zhou, S.M. Clee, B. Tan, K. Hirano, K. Zwarts, A.

Kwok, A. Gelfer, M. Marcil, S. Newman, K. Roomp, R. Singaraja, J. Collins, L.H. Zhang, A.K. Groen, K. Hovingh, A. Brownlie, S. Tafuri, J. Genest, J.J. Kastelein, M.R. Hayden, Truncation mutations in ABCA1 suppress normal upregulation of full-length ABCA1 by 9-cis-retinoic acid and 22-R-hydroxycholesterol., J Lipid Res. 43 (2002) 1939–49. https://doi.org/10.1194/jlr.m200277-jlr200.

[37] X. Zhu, J. Wess, Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function., Biochemistry. 37 (1998) 15773–84. https://doi.org/10.1021/bi981162z.

[38] D. Calebiro, V.O. Nikolaev, M.C. Gagliani, T. de Filippis, C. Dees, C. Tacchetti, L. Persani, M.J. Lohse, Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors., PLoS Biol. 7 (2009) e1000172. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000172.

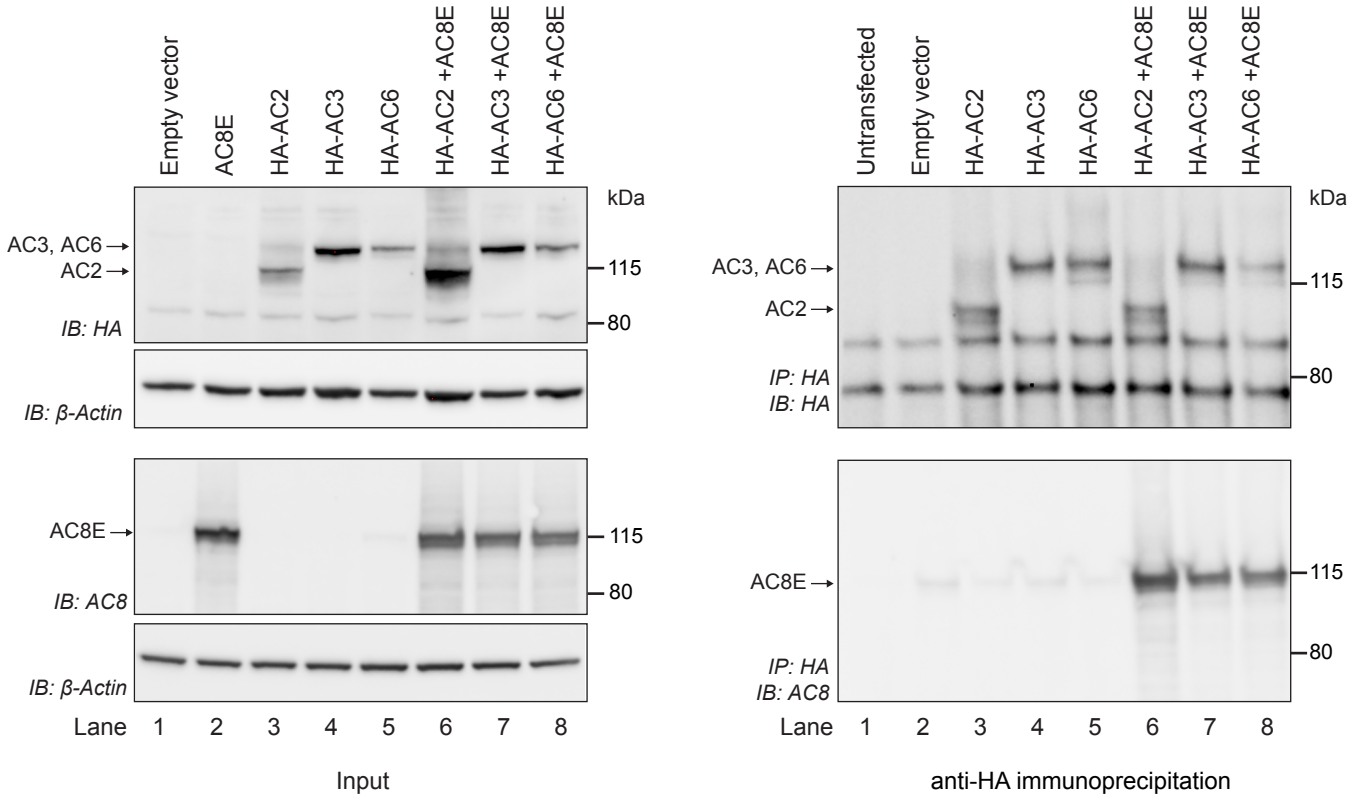
[39] R.S. Ostrom, A.S. Bogard, R. Gros, R.D. Feldman, Choreographing the adenylyl cyclase signalosome: sorting out the partners and the steps., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 385 (2012) 5–12. https://doi.org/10.1007/s00210-011-0696-9.

[40] G. Iwami, M. Akanuma, J. Kawabe, P.J. Cannon, C.J. Homcy, Y. Ishikawa, Multiplicity in type V adenylylcyclase: type V-a and type V-b., Mol Cell Endocrinol. 110 (1995) 43–7. https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03514-8.

[41] 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) 2273–6.

[42] J. Wallach, M. Droste, F.W. Kluxen, T. Pfeuffer, R. Frank, Molecular cloning and expression of a novel type V adenylyl cyclase from rabbit myocardium., FEBS Lett. 338 (1994) 257–63. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80279-3.

A


Empty vector
AC8E
HA-AC2
HA-AC3
HA-AC6
HA-AC2 +AC8E
HA-AC3 +AC8E
HA-AC6 +AC8E
kDa
AC3, AC6
AC2
IB: HA
IB: β-Actin
AC8E
IB: AC8
115
80
Lane 1 2 3 4 5 6 7 8
Input
Untransfected
IP: HA
IB: HA
IP: HA
IB: AC8
anti-HA immunoprecipitation

B

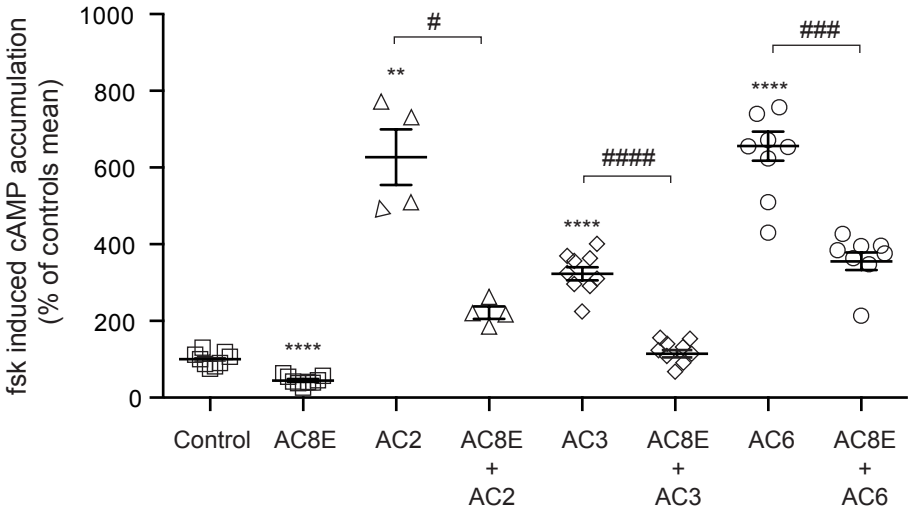
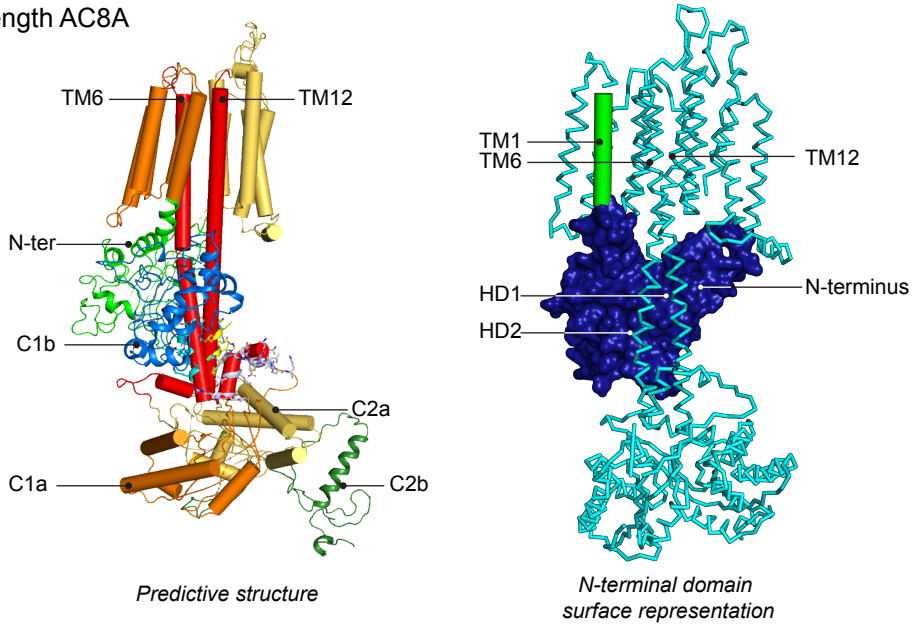

fsk induced cAMP accumulation
(% of controls mean)
1000
800
600
400
200
0
#
###
####
**
****
Control
AC8E
AC2
AC8E + AC2
AC3
AC8E + AC3
AC6
AC8E + AC6

Figure 1

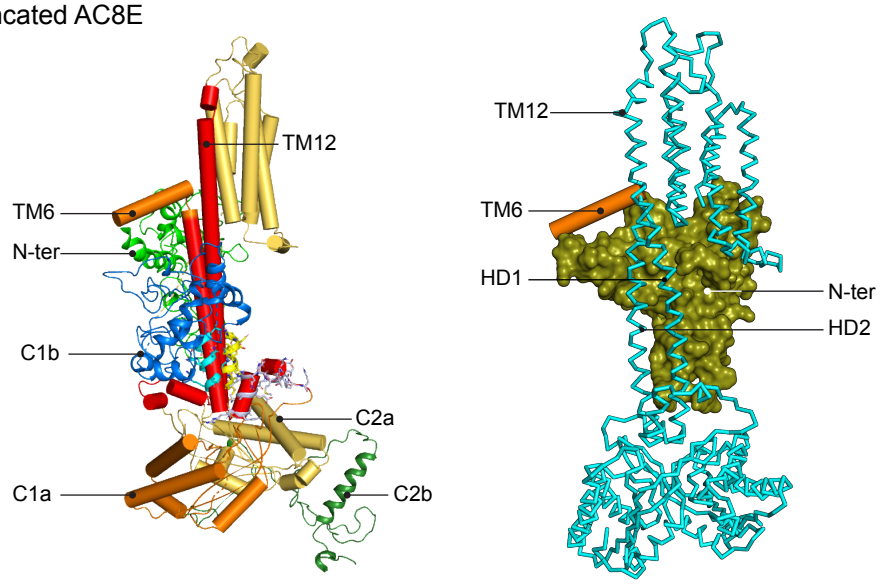
A Full-length AC8A



Predictive structure

N-terminal domain surface representation

B Truncated AC8E



Predictive structure

N-terminal domain surface representation

C AC8A/AC8E Models superimposition

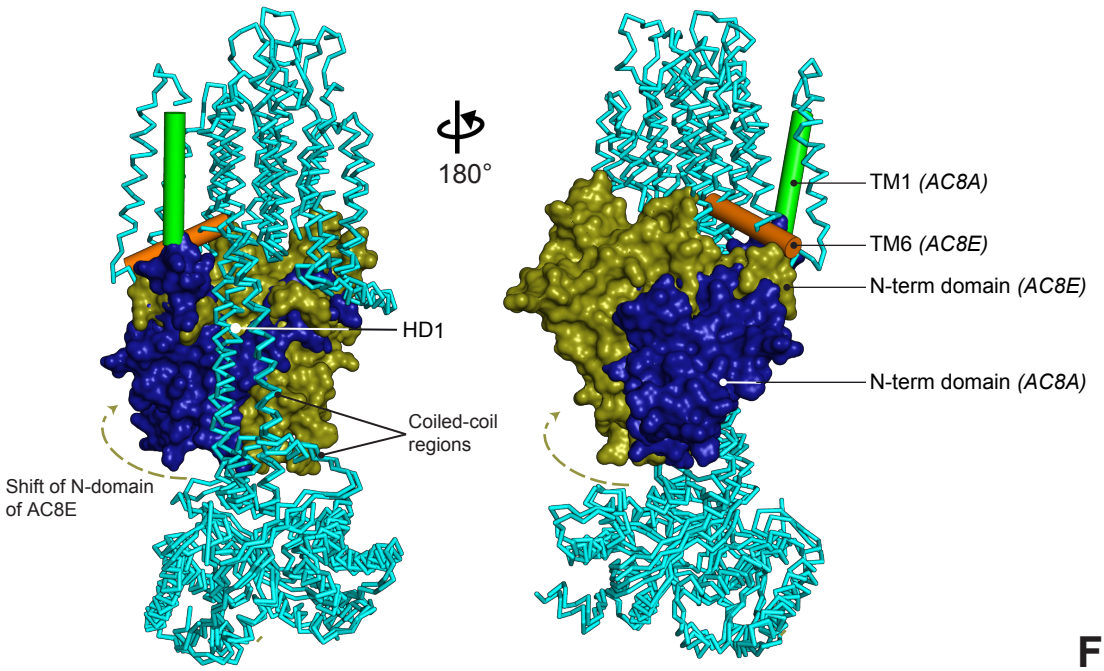
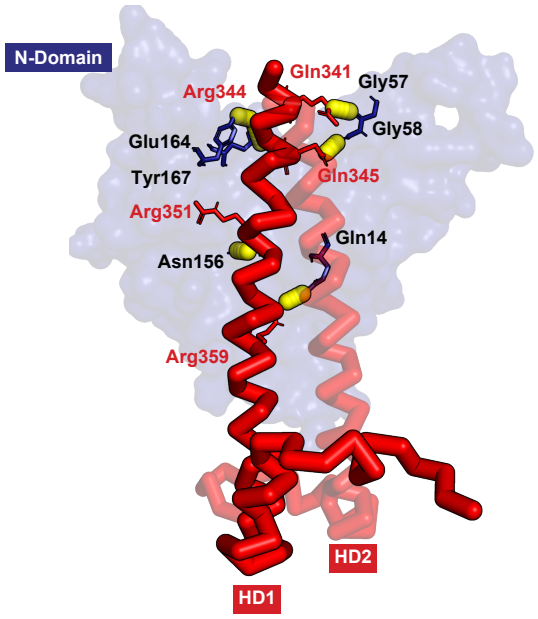
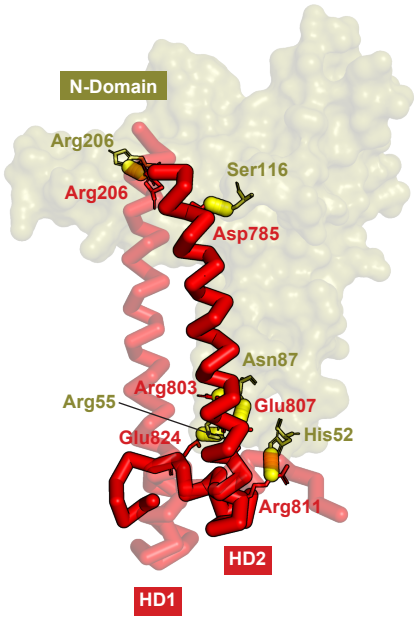


Figure 2

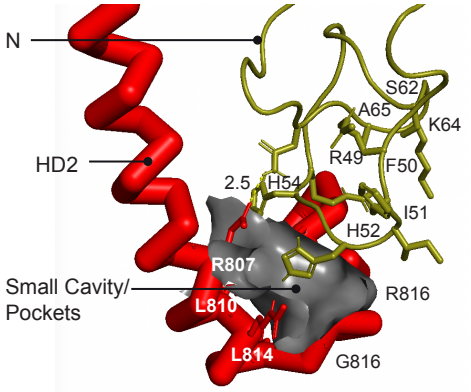
A Full-length AC8A



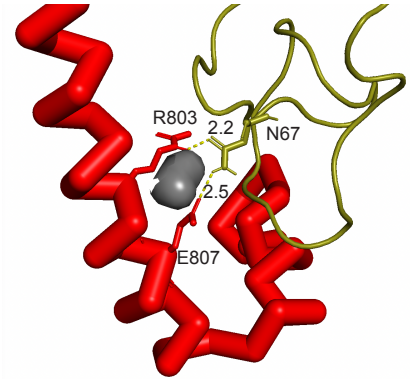
B Truncated AC8E



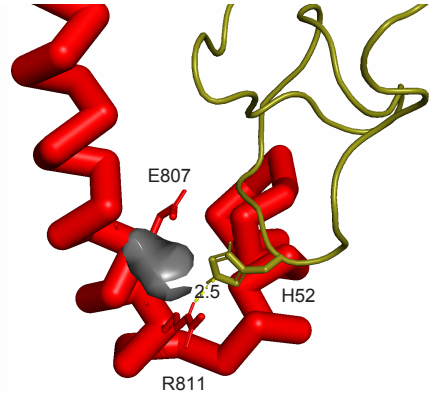
C Truncated AC8E cavity pockets



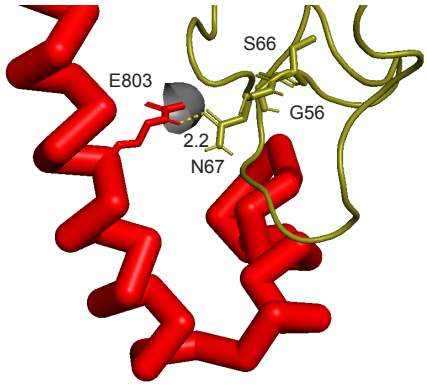
Pocket Id 2



Pocket Id 16



Pocket Id 22



Pocket Id 28

Figure 3

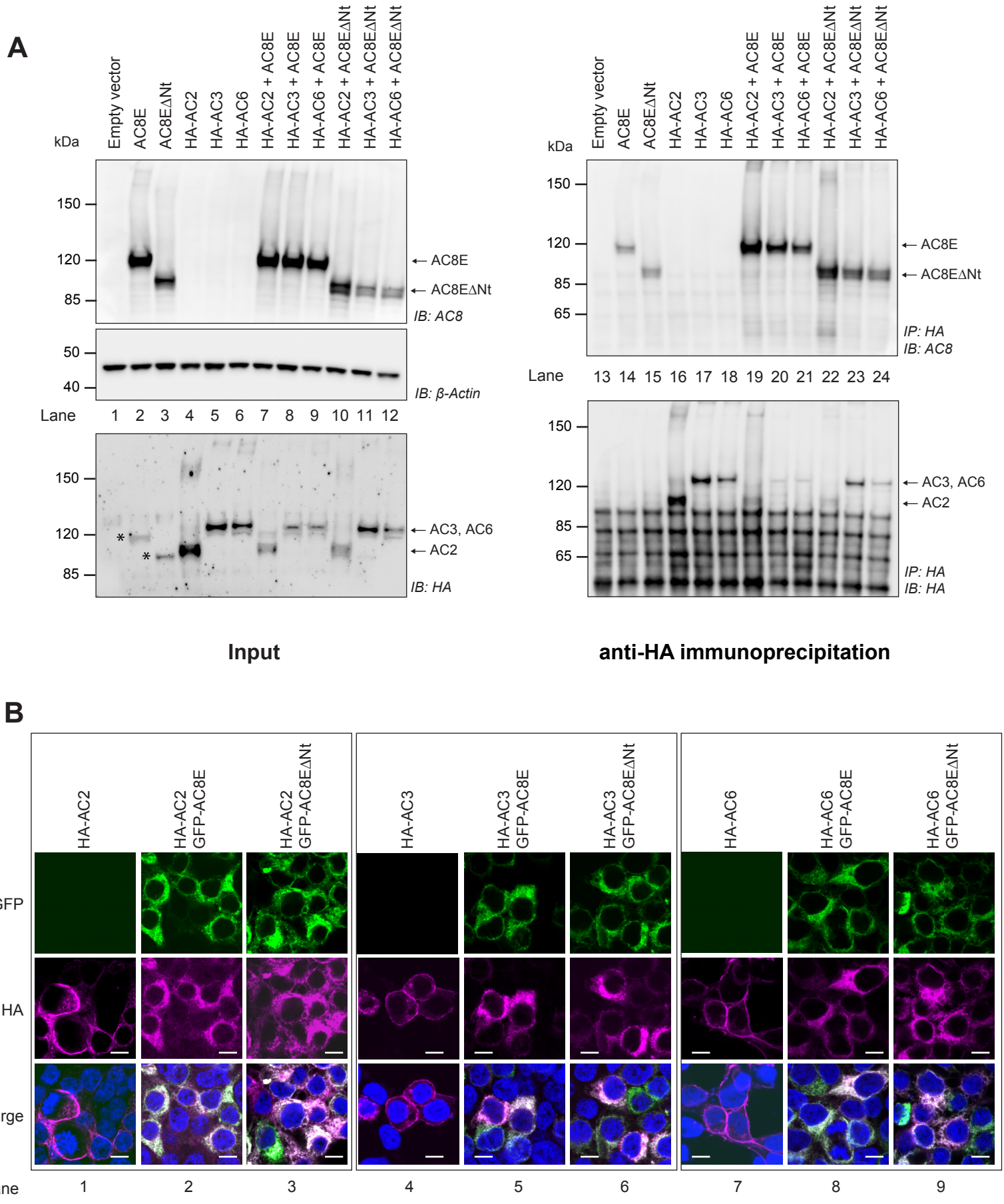

A
Empty vector
AC8E
AC8EΔNt
HA-AC2
HA-AC3
HA-AC6
HA-AC2 + AC8E
HA-AC3 + AC8E
HA-AC6 + AC8E
HA-AC2 + AC8EΔNt
HA-AC3 + AC8EΔNt
HA-AC6 + AC8EΔNt
kDa
150
120
85
50
40
65
← AC8E
← AC8EΔNt
IB: AC8
IB: β-Actin
Lane 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Lane 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
← AC3, AC6
← AC2
IB: HA
IP: HA
IB: AC8
IP: HA
IB: HA
Input
anti-HA immunoprecipitation
B
HA-AC2
HA-AC2 GFP-AC8E
HA-AC2 GFP-AC8EΔNt
HA-AC3
HA-AC3 GFP-AC8E
HA-AC3 GFP-AC8EΔNt
HA-AC6
HA-AC6 GFP-AC8E
HA-AC6 GFP-AC8EΔNt
GFP
HA
Merge
Lane 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figure 4

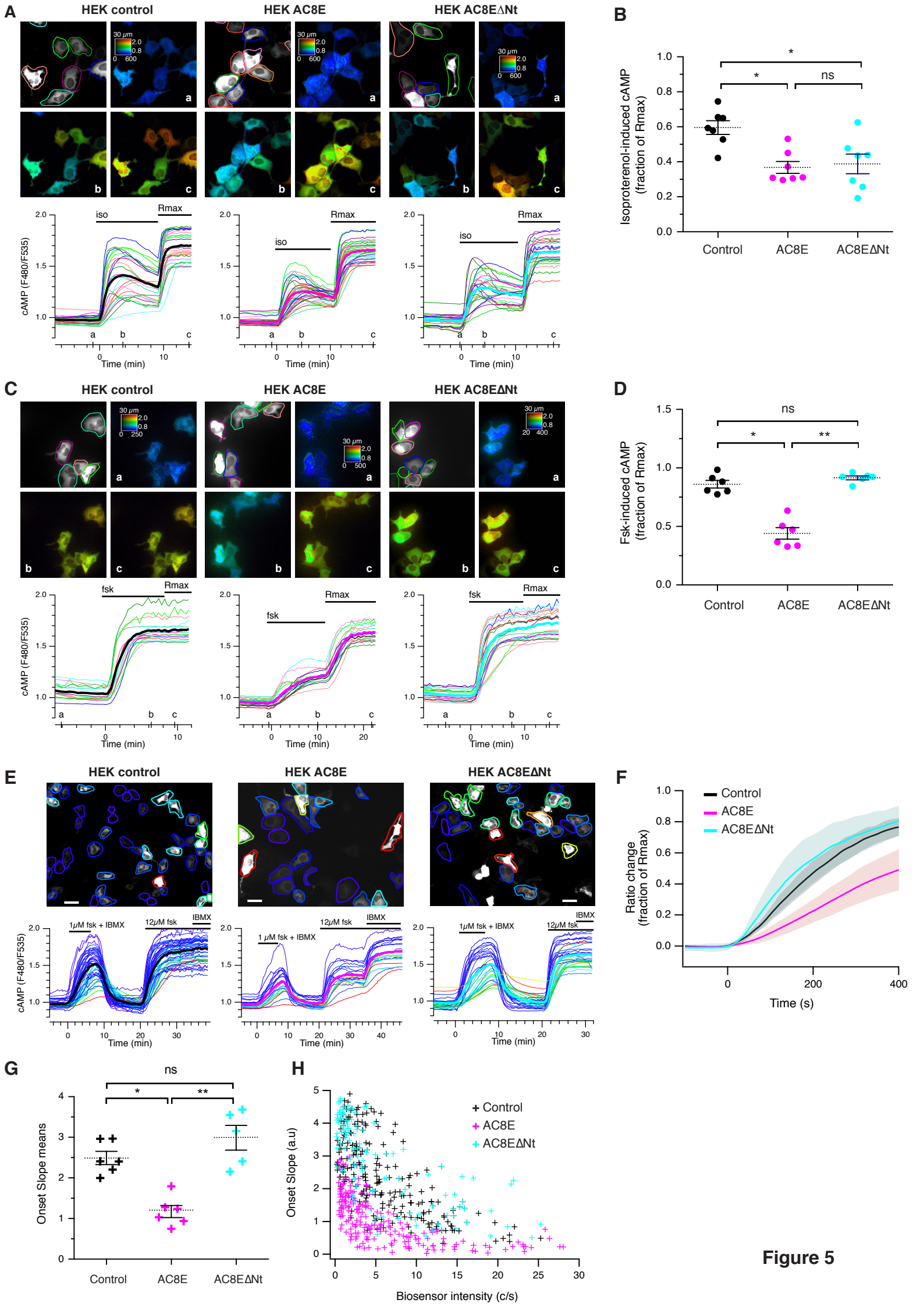
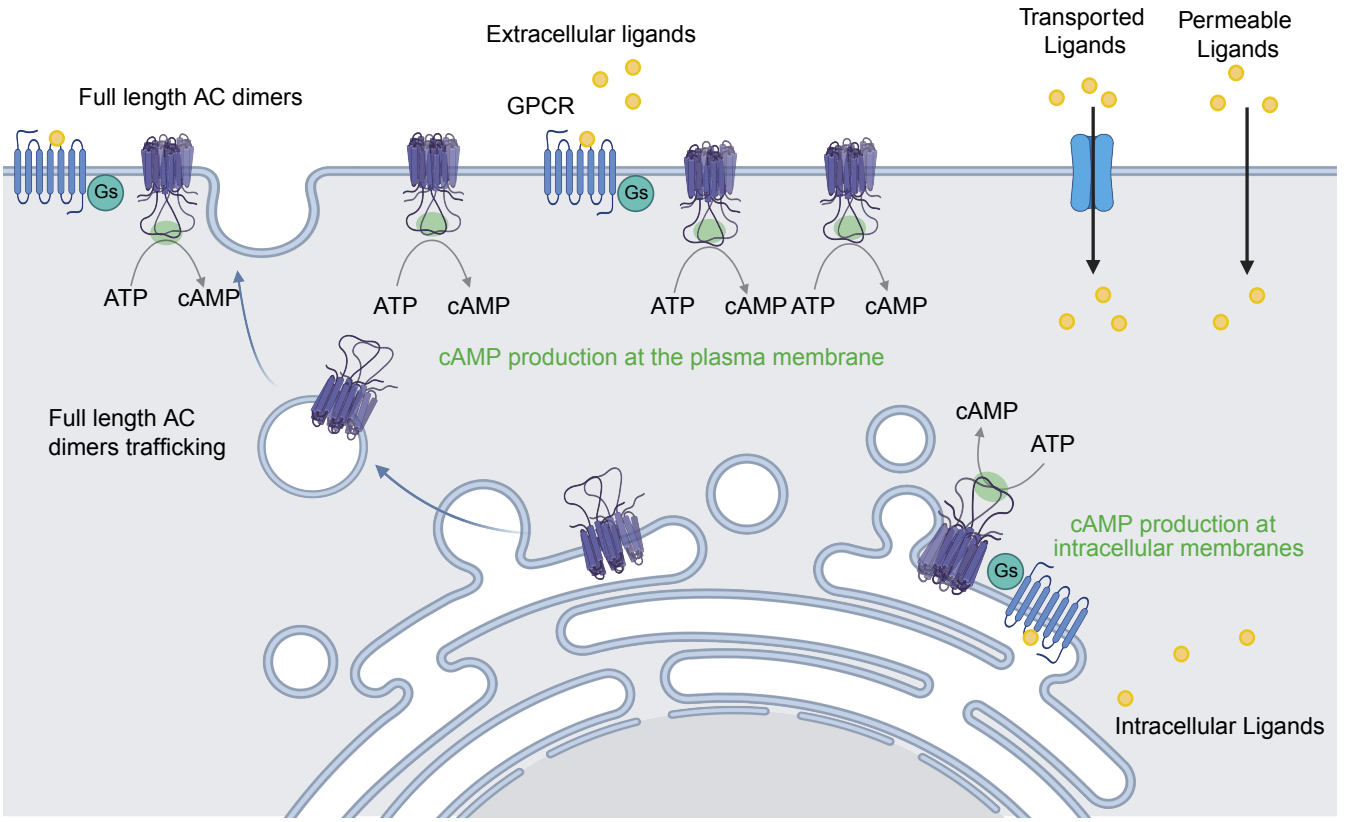
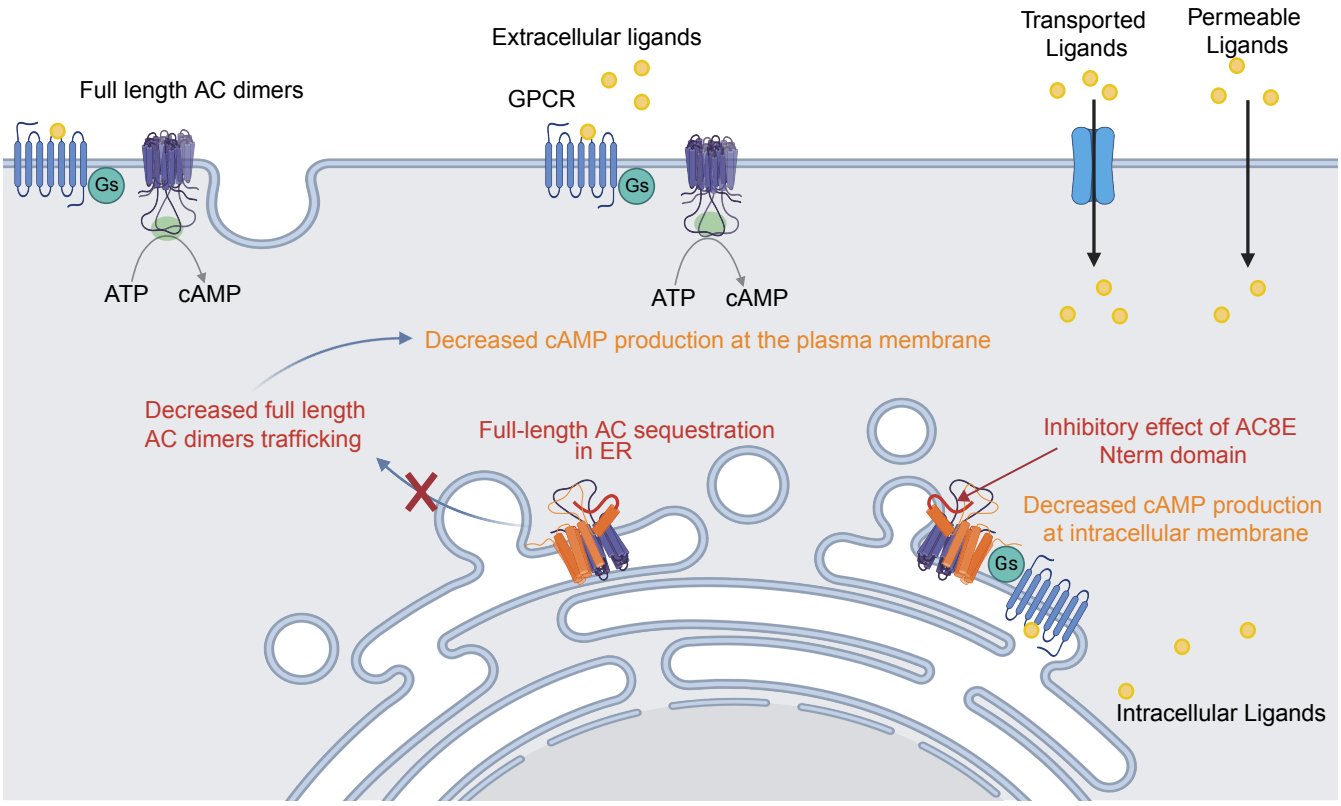

A
HEK control
HEK AC8E
HEK AC8EΔNt
30 μm
2.0
0.8
0 600
a
b
c
iso
Rmax
cAMP (F480/F535)
Time (min)
B
Isoproterenol-induced cAMP (fraction of Rmax)
Control
AC8E
AC8EΔNt
*
ns
C
HEK control
HEK AC8E
HEK AC8EΔNt
fsk
Rmax
D
Fsk-induced cAMP (fraction of Rmax)
ns
*
**
E
HEK control
HEK AC8E
HEK AC8EΔNt
1μM fsk + IBMX
12μM fsk
IBMX
F
Control
AC8E
AC8EΔNt
Ratio change (fraction of Rmax)
Time (s)
G
Onset Slope means
H
Onset Slope (a.u)
Biosensor intensity (c/s)

Figure 5





LEGENDS

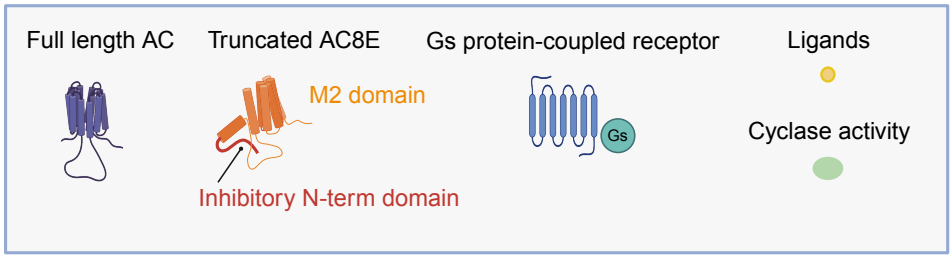
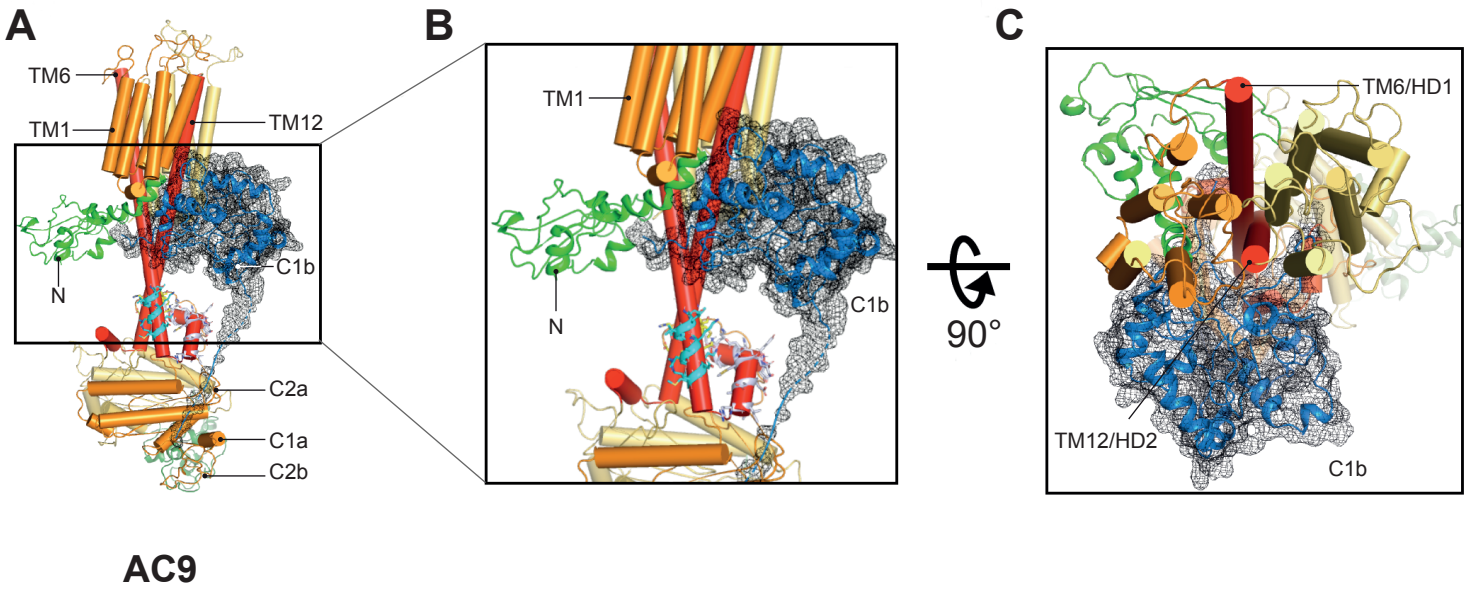
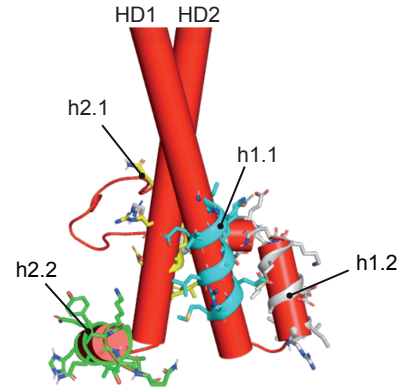


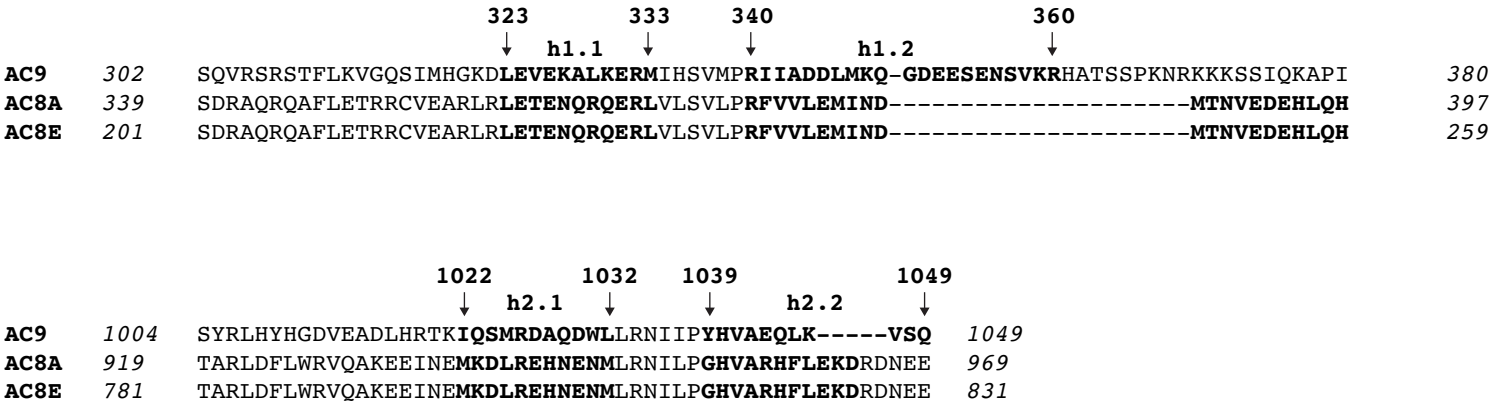
Figure 6



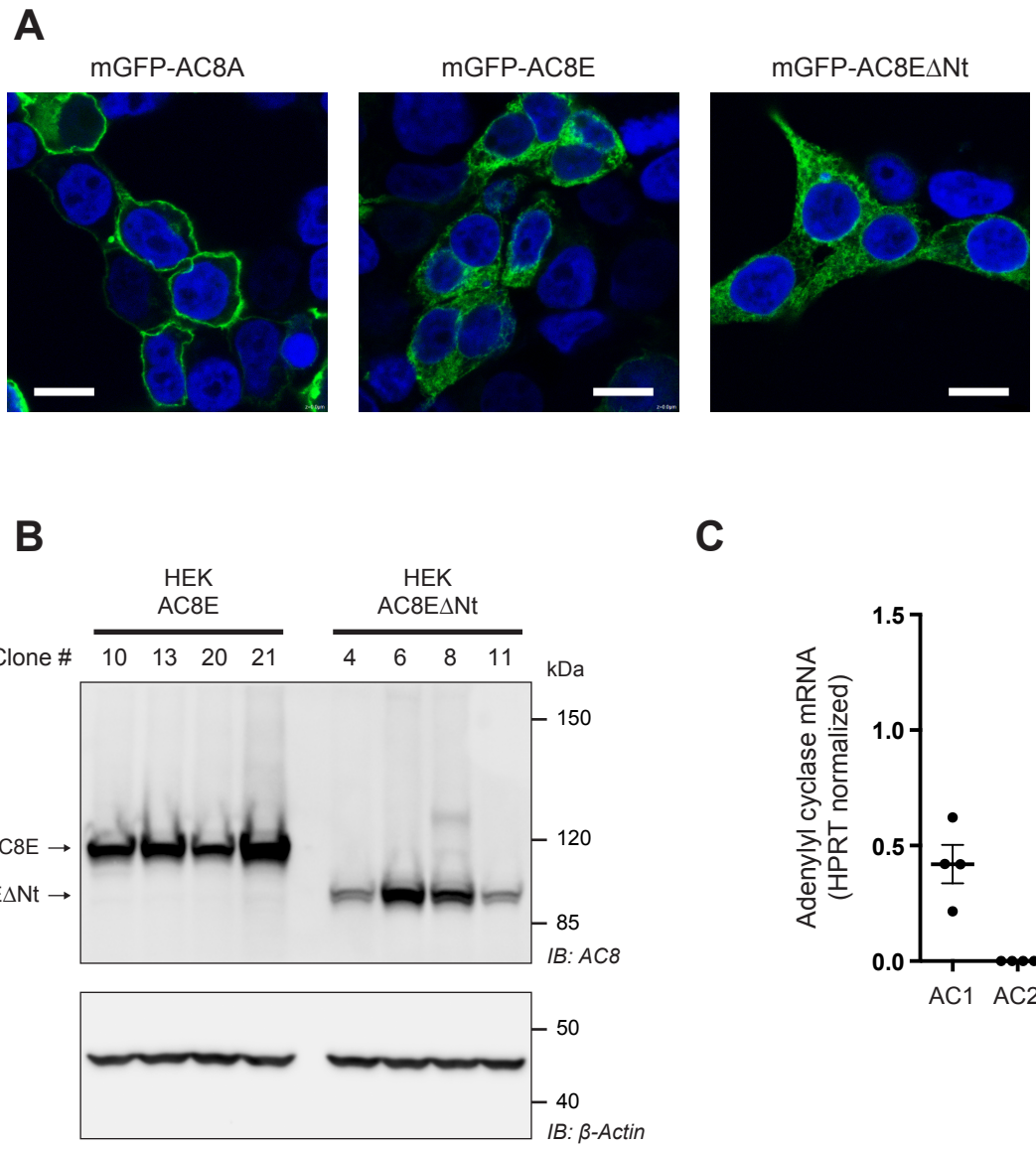
AC9



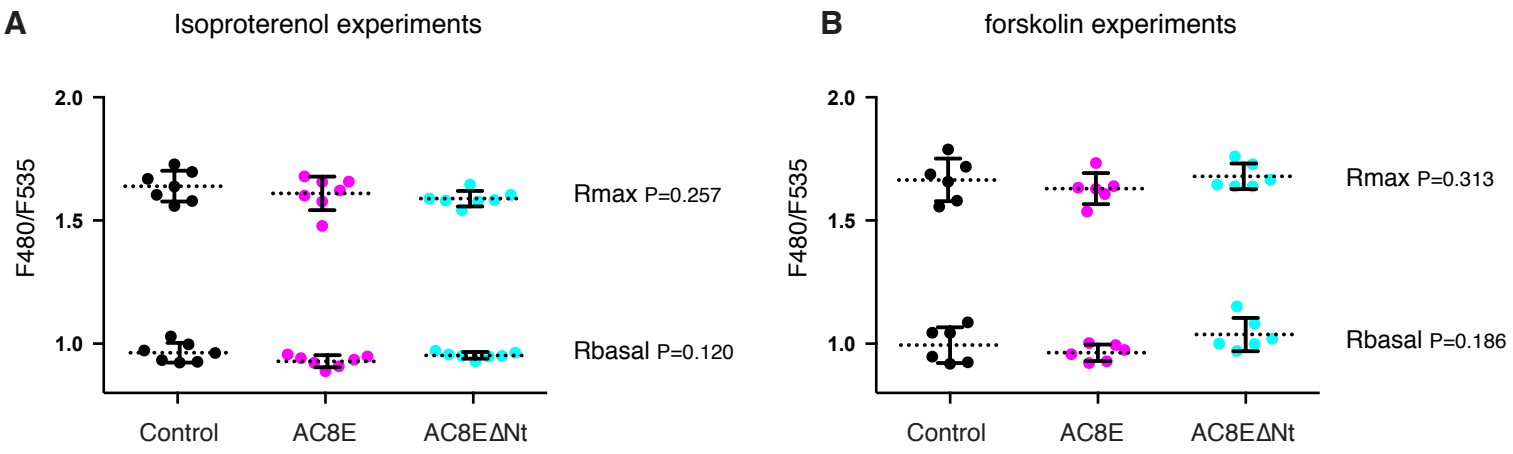
Supplementary Figure S1



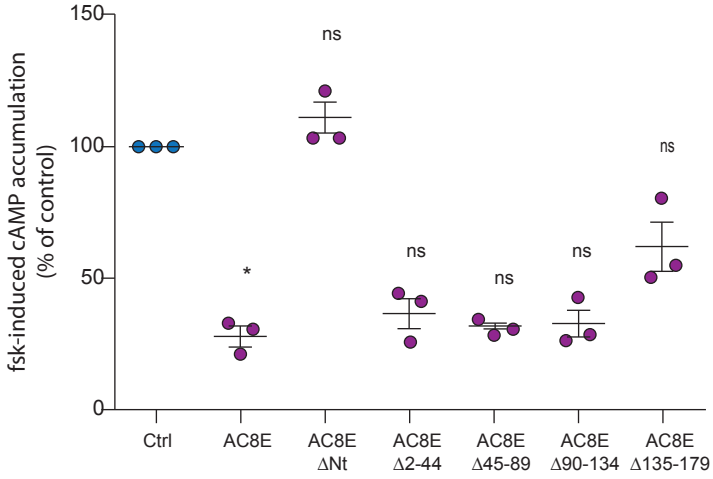
Supplementary Figure S2

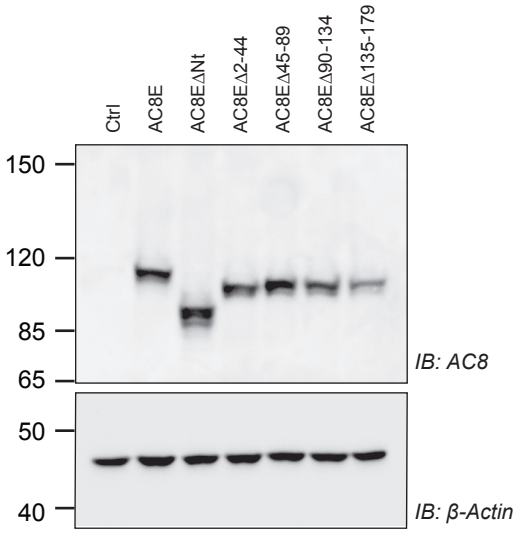


Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S4





Supplementary Figure S5

II. Résultats complémentaires non publiés

Nous avons mis en évidence que le domaine N-terminal est impliqué dans l'inhibition de l'activité cyclase du dimère AC3/AC8E mais pas dans la formation des hétérodimères AC8E/AC et donc dans le défaut d'adressage à la membrane plasmique. Or la formation du dimère est l'étape déterminante et critique de la rétention intracellulaire du dimère, ainsi cibler la dimérisation de l'AC8E avec ses partenaires pourrait supprimer l'effet dominant négatif et constituer une nouvelle stratégie pour limiter la transdifférenciation des CMLV.

Nous avons donc développé une stratégie pour identifier les régions impliquées dans cette interaction AC8E/AC et développer des peptides interférents sur la base des séquences identifiées afin de rompre cette interaction. Si cette partie a été intégralement conceptualisée par Yohan Legueux-Cajgfinger, notamment l'identification des séquences d'interaction par PEPscan, les tests et optimisation des peptides interférents ont été réalisés au cours de ma thèse. Pour plus de clarté, les travaux réalisés par Yohan LC seront indiqués.

II.1. Identification des séquences d'interaction AC3/AC8 par PEPSCAN

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie a été réalisé par Yohan LC.

Afin d'identifier les séquences en acides aminés impliquées dans l'interaction entre l'AC8E et l'AC3 ou l'AC6, nous avons utilisé une approche de PEPscan développée par le Dr Angelita Rebollo à la Pitié-Salpétrière (Bruzzoni-Giovanelli *et al.* 2018), avec qui nous avons collaboré.

Les adenylyl cyclases possèdent deux cassettes transmembranaires M1 et M2, au travers desquelles elles interagissent pour former des homo- ou hétéro-dimères (Gu *et al.* 2001b), c'est donc ces régions que nous avons criblées par PEPscan. Dans la mesure où l'AC8E ne possède plus de cassette M1, le criblage des régions d'interaction de l'AC8E avec les autres cyclases s'est donc fait sur la cassette M2. Cette technique consiste à greffer (ou "spotter") sur une membrane, des peptides de 12 acides aminés qui chevauchent de 10 acides aminés le peptide précédent et le peptide suivant, couvrant ainsi l'ensemble du domaine M2 de l'AC8E en 115 peptides différents les uns des autres de deux acides aminés. Cette membrane est ensuite incubée en présence des protéines AC3 ou AC6 entières, purifiées taggées HA et

un dot blot est réalisé, consistant à révéler par immunoblot anti-HA, l'interaction de l'AC3 ou l'AC6 purifiées avec un ou plusieurs des 115 peptides chevauchant l'ensemble du domaine M2 de l'AC8E. De cette façon, une séquence en acides aminés de l'AC3 ou de l'AC6 (proie) reconnue par la protéine appât (membrane AC8E) est considérée comme un motif d'interaction quand tous les dodecapeptides la composant sont hybridés (*Figure R1.1*).

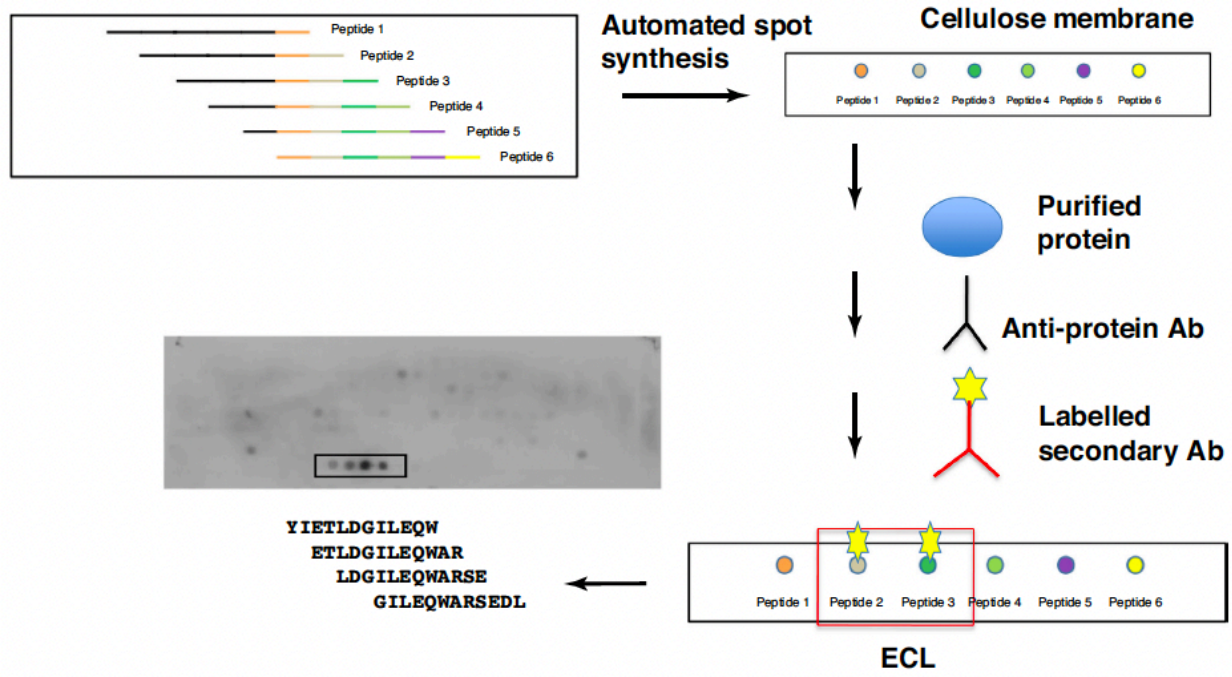


Figure R1. 1. Schéma représentatif de l'approche de PEPscan

Des dodécapeptides chevauchants (avec un décalage de deux acides aminés) couvrant la séquence complète de l'une des protéines du complexe sont préparés et spottés sur un support solide. La membrane est hybridée avec l'autre protéine purifiée qui est impliquée dans l'interaction du complexe. La présence d'un complexe est détectée à l'aide d'un anticorps contre la protéine purifiée, suivi d'un anticorps secondaire marqué. Depuis l'article (Bruzzoni-Giovanelli *et al.*, 2018)

Des expériences miroirs ont également été réalisées, avec des membranes sur lesquelles sont greffées les domaines M1 ou M2 de l'AC3 ou de l'AC6 et incubées avec l'AC8E entière, étiquetée HA et purifiée. Le PEPscan a été réalisé par Angelita Rebollo à qui nous avons fourni les protéines ultra pures. La quantité de protéines purifiées à fournir étant très importante (environ 10 µg par membrane), la purification a été réalisée sur les lignées monoclonales stables HEK surexprimant les protéines de fusion AC8E-HA ou l'AC3-HA ou l'AC6-HA, par des techniques d'immunoprécipitation (anticorps anti-HA couplé à des billes magnétiques) et de SDS page suivi d'une électroélution.

Les résultats du "dot blot" obtenu sur les membranes AC3 incubées avec de l'AC8E purifiée ou la membrane M2-AC8E incubée avec l'AC3 sont présentés en *figure R1.2*. Quatre

motifs peptidiques de l'AC3 susceptibles d'agir avec l'AC8E ont été identifiés : LPDR, acides aminés 130 à 133, localisés dans la première boucle intracellulaire ; RKAFLE, acides aminés 252 à 257, localisés dans la troisième boucle extracellulaire ; KT, acides aminés 406 et 407, localisés dans le domaine C1 ; KY, acides aminés 839 à 840, localisés dans le TM12. L'expérience miroir (membrane M2-AC8 hybridée avec l'AC3) a révélé deux motifs de l'AC8E susceptibles d'interagir avec l'AC3. Les expériences de PEPscan réalisées avec l 'AC6 et l'AC8E ont quant à elles permis d'identifier quatre motifs peptidiques d'interaction (résultats non présentés).

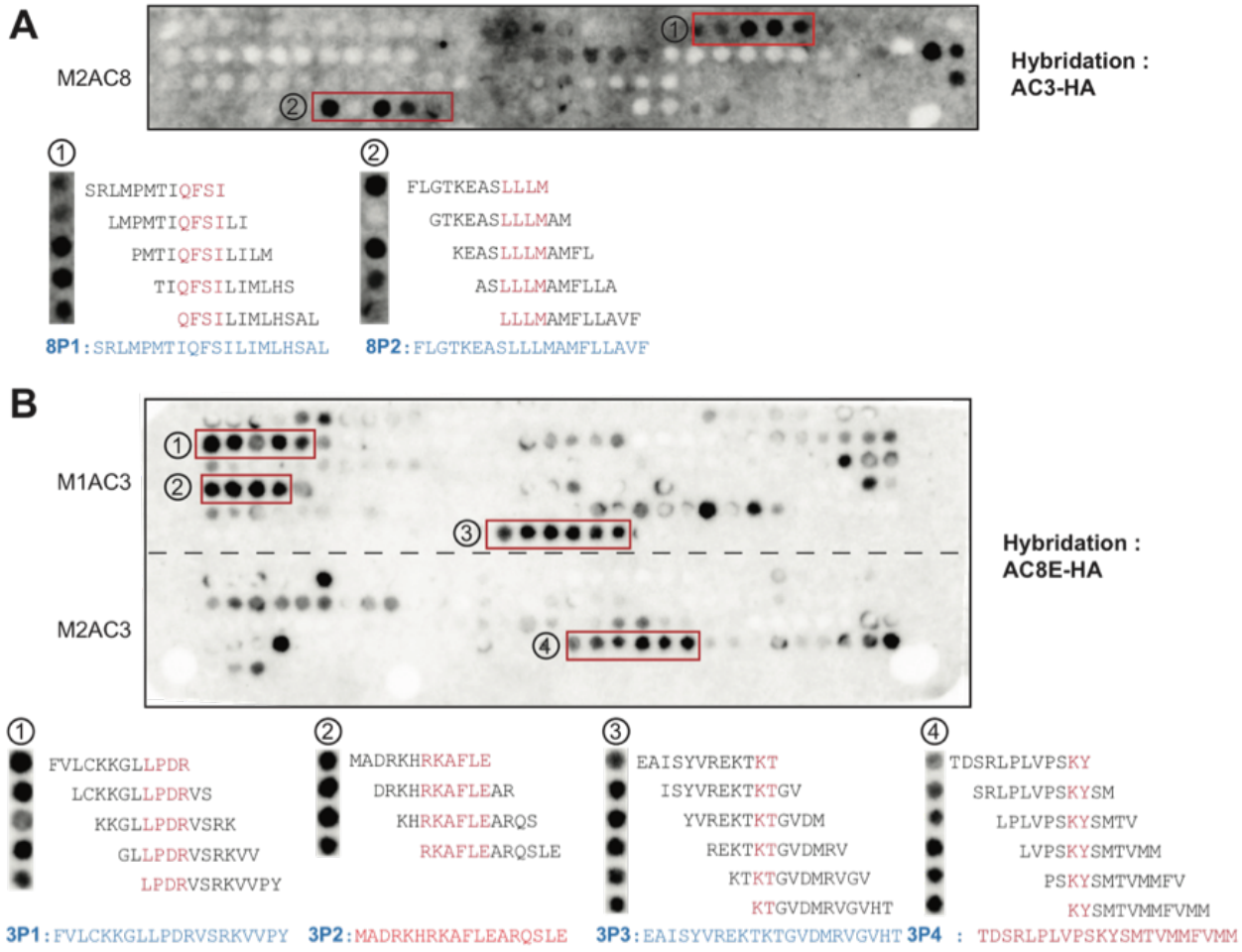


Figure R1. 2. Identification des motifs d'acides aminés impliqués dans l'interaction AC8E/AC3

A.Membrane de nitrocellulose sur laquelle sont déposés des dodécapeptides chevauchants, décalés de 2 aa par rapport au peptide précédent, constitutifs de la séquence de la cassette transmembranaire M2 de l'AC8E. 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. La séquence en acides aminés des peptides interagissant avec l'AC3-HA est donnée en bas. Les acides aminés en rouge sont communs aux peptides de la zone encadrée et constituent le motif peptidique. **B.** Expérience identique à celle présentée en **A**, mais avec les membranes AC3 et de l'AC8E-HA purifiée.

II.2. Design et Tests des peptides interférents

II.2.1. *Design des peptides*

Sur la base des résultats de PEPscan, 10 séquences d'interactions potentielles ont donc été identifiées ; 4 dans l'AC3, 2 dans l'AC8E et 4 dans l'AC6. Dix peptides interférents ont été synthétisés (GL Biochem, Shanghai, Chine) : les peptides 3P1, 3P2, 3P3 et 3P4, ainsi que les peptides 8P1 et 8P2, susceptibles d'interférer avec l'assemblage du complexe AC8E-AC3, ainsi que les peptides 6P1, 6P2, 6P3 et 6P4, susceptibles d'interférer avec l'assemblage du complexe AC8E-AC6 (Tableau R1.1). Une séquence peptidique cargo Mut3DPT (VKKKKIKAEIKI) a été ajoutée en position N-terminale de la séquence des peptides interférents, permettant aux peptides de passer les membranes cellulaires et leur confère une résistance aux peptidases (Fominaya *et al.* 2015a; Zhang *et al.* 2017).

Membrane Spottée	Nom du peptide	Séquence du peptide
M1-AC3	Mut3DPT-3P1	VKKKKIKAEIKIFVLCKKGLLPDRVSRKVVPY
	Mut3DPT-3P2	VKKKKIKAEIKIMADRKHRKAFLEARQSLE
	Mut3DPT-3P3	VKKKKIKAEIKIEAISYVREKTKTGVDMRVGVHT
M2-AC3	Mut3DPT-3P4	VKKKKIKAEIKITDSRLPLVPSKYSMTVMMFVMM
M1-AC6	Mut3DPT-6P1	VKKKKIKAEIKIAVLLAFHAAPARPQPAYVALLA
	Mut3DPT-6P2	VKKKKIKAEIKIVQVGGALAANPRSPSVGL
M2-AC6	Mut3DPT-6P3	VKKKKIKAEIKIREDKEKKYSRKVDPRFGAYV
	Mut3DPT-6P4	VKKKKIKAEIKIKALRRLSRSIVRSRAHSTVVGI
M2-AC8	Mut3DPT-8P1	VKKKKIKAEIKISRLMPMTIQFSILIMLHSAL
	Mut3DPT-8P2	VKKKKIKAEIKIFLGTKEASLLLMAMFLLAVF

Tableau R1. 1. Peptides interférents potentiels générés sur la base du PEPscan

Les acides aminés indiqués en bleu correspondent à ceux de la séquence peptidique cargo Mut3-DPT. Les acides aminés en noir correspondent aux séquences d'interaction identifiées par PEPscan.

II.2.2. *Tests des peptides*

Dans cette partie, j'ai réalisé l'ensemble de l'étude visant à évaluer la capacité des peptides à restaurer la production d'AMPc, ainsi que leur clonage dans des vecteurs plasmidiques.

Ces peptides ont d'abord été testés pour leur capacité à rompre l'interaction physique entre les dimères AC8E/AC. L'expérience de co-immunoprécipitation présentée dans la figure 1 de l'article soumis a été reproduite en présence de ces différents peptides mais nos résultats n'ont pas réussi à démontrer une rupture de l'interaction du dimère (résultats non présentés).

Nous avons ensuite, par imagerie de biosenseurs FRET (^{T}EPAC^{VV}), testé la capacité de ces peptides seuls ou combinés à augmenter la dynamique de production d'AMPc dans les CMLV transdifférenciées à l'IL1β (traitement de 72h à 10ng/mL), mais également dans les CMLV contrôles pour éliminer tout effet nocif du peptide. L'utilisation de ces peptides a nécessité une mise au point afin de déterminer la concentration maximale à utiliser sans induire de toxicité cellulaire, correspondant à un traitement à 500nM pendant 24h. Aucun des dix peptides testés dans ces conditions, n'a permis de ramener la production d'AMPc en réponse à la forskoline dans les CMLV traitées à l'IL1β à un niveau similaire à celui des cellules contrôles. Ces peptides semblent tout de même assez spécifiques pour ne pas altérer la production d'AMPc dans les CMLV contrôles (*Figure R1.3*).

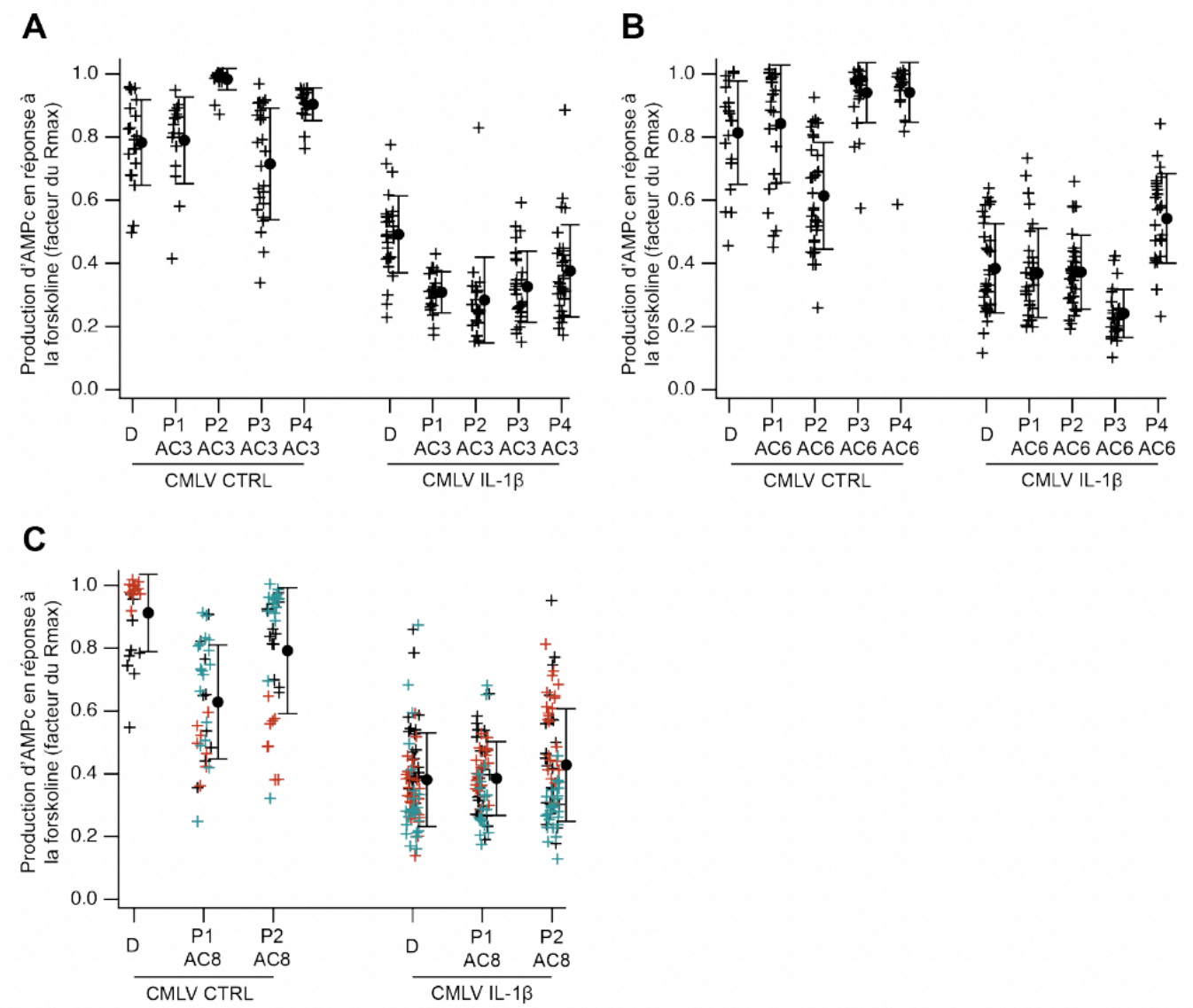


Figure R1. 3. Évaluation de l'effet des peptides interférents candidats sur la production d'AMPc

Les variations de la concentration intracellulaire en AMPc dans des cellules CMLV contrôles (CTRL) ou traitées à l'IL1β 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 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.

Face aux résultats peu concluants de cette première série d'expérience, nous avons développé des vecteurs d'expression pour ces peptides afin de nous affranchir de la toxicité cellulaire et de le produire directement dans la cellule. Ainsi, j'ai fait synthétiser des oligonucléotides correspondant à la séquence codante de ces peptides interférents, que j'ai cloné dans le vecteur d'expression pCDNA3. Les CMLV étant très difficiles à transfecter, ces 10 vecteurs d'expression ont alors été testés dans des HEK contrôles ou exprimant de façon stable l'AC8E (l'AC3 et l'AC6 étant exprimées de façon endogène dans les HEK).

Nous avons testé ces peptides de façon individuelle, ou combinée correspondant à un mix contenant 3P1+3P2+3P3+3P4 (séquences issues de l'AC3) ou un mix 8P1+8P2 (séquences issues de l'AC8E) ou un mix 6P1+6P2+6P3+6P4 (séquences issues de l'AC6), sur au minimum N=3 expériences indépendantes. Ces peptides ont été transfectés (500ng ADN total) dans les lignées HEK exprimant stablement l'AC8E afin d'évaluer 24h après leur capacité à restaurer la production d'AMPc par des expériences d'imagerie de biosenseurs. Les résultats obtenus avec ces expériences n'ont pas donné de résultats concluants, un exemple de résultat est présenté pour les peptides 8P1 et 8P2 en *figure R1.4*. Dans une expérience avec le peptide 8P2, j'ai pu observer un effet bénéfique sur la dynamique de production d'AMPc, mais ce résultat n'a pas pu être reproduit, ni avec le peptide 8P2 seul, ni combiné avec d'autres peptides.

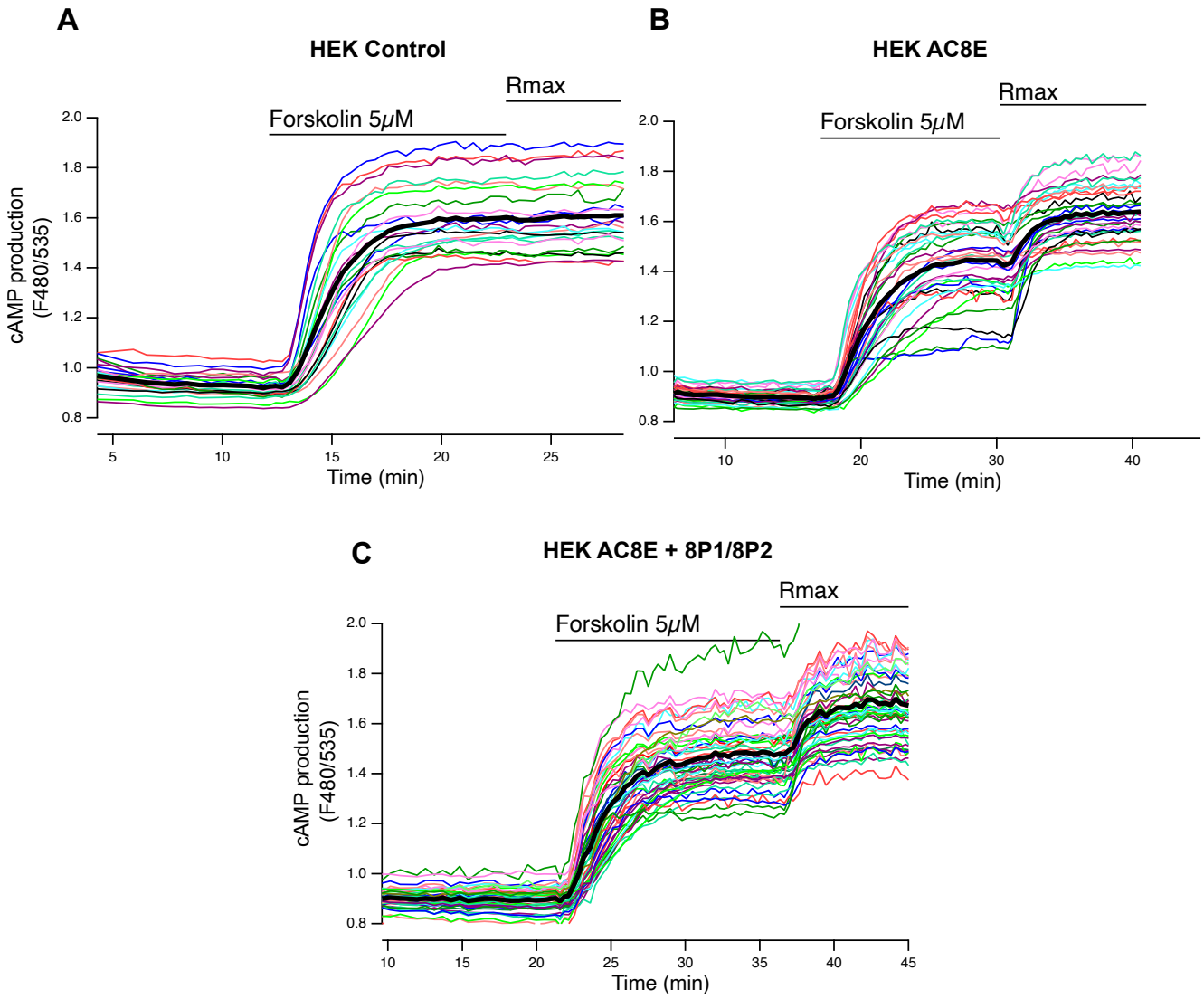


Figure R1. 4. Les peptides 8P1 et 8P2 ne restaurent pas la dynamique d'AMPc

Suivi de la dynamique d'AMPc par imagerie de biosenseur à l'aide de la sonde ^{T}EPAC^{VV} en réponse à 5µM forskoline dans des HEK contrôles **(A)**, des HEK AC8E **(B)** ou des HEK AC8E transfectées avec les peptides 8P1 et 8P2 **(C)**. Une expérience indépendante est représentative de N=3 expériences.

L'ensemble de notre étude menée avec les peptides interférents par traitement direct dans les CMLV transdifférenciées à l'IL1β ou par transfection dans les lignées monoclonales de HEK exprimant l'AC8E ou l'AC8EΔNt démontre que les peptides interférents tel qu'ils ont été conçus ne permettent pas de rompre l'interaction du dimère AC8E/AC3 ou AC6 ni de rétablir une production d'AMPc dans les cellules exprimant l'AC8E. Si dans la littérature, l'utilisation de peptides interférents pour inhiber l'interaction entre deux protéines cytosoliques a donné des résultats (Bruzzoni-Giovanelli *et al.* 2018; Tian *et al.* 2016a), il semble que pour les protéines transmembranaires et de grandes tailles, cette stratégie soit beaucoup plus délicate à mettre en place et nécessite une optimisation des peptides.

DISCUSSION

Les précédentes études menées par l'équipe ont identifié qu'un variant d'épissage alternatif de l'AC8, l'AC8E, est exprimé *de novo* lors de la transdifférenciation des CMLV par l'IL1β. Cette AC8E catalytiquement inactive, agit comme un dominant négatif en s'hétérodimérisant avec les AC fonctionnelles des CMLV (majoritairement AC3 et AC6) et les séquestrant dans les compartiments intracellulaires. C'est par ce mécanisme que l'expression de l'AC8E limite la production d'AMPc dans la cellule, favorisant la transdifférenciation des CMLV associée au développement des plaques athéromateuses et à la resténose post-angioplastie (Gueguen *et al.* 2010a; Gueguen *et al.* 2016b; Vallin *et al.* 2018).

Nous avons pour la première fois proposé un modèle théorique tridimensionnel d'une adenylyl cyclase (AC9), qui nous a servi de matrice pour modéliser l'AC8A et l'AC8E. La comparaison des modèles prédictifs de l'AC8A et l'AC8E a permis de montrer que la délétion des TM1-5 dans l'AC8E, pourrait entrainer un changement conformationnel des autres domaines de l'enzyme, notamment du domaine N-terminal. L'étude de modélisation a suggéré un rôle potentiel de cette modification de positionnement du domaine N-terminal dans l'inhibition de l'activité catalytique des dimères AC8E/AC, que nous avons confirmé par imagerie de biosenseurs en démontrant que la délétion de ce domaine rétablit une production d'AMPc normale en réponse à la forskoline, dans les cellules exprimant l'AC8E. En revanche, l'hétérodimérisation et la rétention intracellulaire des dimères AC8E/AC n'est pas modifiée par la délétion du domaine N-terminal, et ne lève donc pas l'inhibition de la production d'AMPc liée à la localisation intracellulaire des dimères AC8E/AC, qui ne sont plus accessibles pour des ligands extracellulaires, comme l'isoprotérénol.

Cependant, la formation du dimère reste le mécanisme clé dans la limitation de la production d'AMPc par l'AC8E. Nous avons donc, par criblage des séquences d'interactions entre l'AC8E et les AC partenaires (PEPscan), identifié les motifs impliqués dans l'hétérodimérisation et développé des peptides interférents potentiels. Malgré les diverses mises au point, les peptides en l'état n'ont pas fourni de résultats convaincants quant à leur effet sur la formation du dimère ou à leur capacité à restaurer la production d'AMPc. Une optimisation de ces peptides interférents est nécessaire pour améliorer leur efficacité,

d'autant plus qu'ils constitueraient une solution alternative aux molécules antiprolifératives éluées par les stents actuels.

I. Caractérisation fonctionnelle, biochimique et structurelle de l'AC8E

I.1. Effet dominant négatif de l'AC8E : un double mécanisme inhibiteur

I.1.1. *Le domaine N-terminal et l'inhibition de l'activité catalytique*

Pour la première fois, nous avons proposé en collaboration avec l'équipe de M.Dauchez une structure 3D complète d'une AC. La modélisation des AC8A et AC8E ainsi que leur superposition, démontrent une altération du positionnement du domaine N-terminal causée par la délétion des TM1-5 et la réorientation du TM6 perpendiculairement à la cassette M2 (*Figure 2, article 1*). Elle démontre également une modification de l'interaction de ce dernier avec les domaines HD et les régions coiled-coil et la création de potentielles liaisons hydrogène qui n'existent pas dans l'AC8A, qui pourraient impacter la conformation correcte du site catalytique, et en conséquence le « cœur » catalytique des dimères AC8E/AC. Ce résultat suggère donc de le domaine N-terminal est impliqué dans l'inhibition de l'activité catalytique, donc dans l'effet dominant négatif de l'AC8E. Ce qui a été confirmé par les résultats d'imagerie de biosenseurs, où la délétion du domaine N-terminal restaure un niveau de production d'AMPc dans les AC8EΔNt similaire aux cellules contrôles en réponse à la forskoline (*Figure 5C et D, article 1*). De plus, les mesures de pentes (mesure de la vitesse de production d'AMPc en inhibant les PDE) qui rendent comptent de l'activité cyclase globale de la cellule, montrent que dans les cellules exprimant l'AC8EΔNt, l'activité cyclase est similaire aux cellules contrôles contrairement à celles des cellules exprimant l'AC8E, plus faible. Ceci soutient l'hypothèse que le repositionnement du domaine N-terminal de l'AC8E inhibe l'activité catalytique en exerçant un encombrement sur le site catalytique, et témoigne que l'effet dominant négatif de l'AC8E possède une composante structurelle. L'utilisation de la modélisation moléculaire de la structure des AC comme une première étape dans la compréhension de l'activité catalytique de l'enzyme a déjà été décrite. Une étude voulant caractériser l'implication de variants génétiques de l'AC3 dans l'obésité sévère précoce a mis en évidence qu'une forme mutée de la protéine (T349A) modifie les interactions régulant le repliement symétrique des domaines

transmembranaires, ce qui pourrait alors affecter l'activité catalytique de l'enzyme (Toumba *et al.* 2022). Ce mécanisme rappelle les effets des modifications structurelles imposées par la délétion des premiers domaines transmembranaires sur la conformation du site catalytique de l'enzyme, que nous avons mis en évidence dans notre étude sur l'AC8E. La modélisation permet l'identification de cibles moléculaires au sein de ces variants et ouvre la voie à leur évaluation fonctionnelle et à la caractérisation de leur effet pathologique.

I.1.2. *L'hétérodimérisation et la rétention intracellulaire*

La délétion du domaine N-terminal n'affecte cependant pas l'effet inhibiteur sur la production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol (*Figure 5A et B, article 1*). L'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs β-adrénergiques, contrairement à la forskoline ne peut pas pénétrer à l'intérieur de la cellule, ainsi il n'est capable d'activer que les AC présentent au niveau de la membrane plasmique et associées à un récepteur. Or, nous avons démontré par immunofluorescence que l'AC8EΔNt reste localisée dans les compartiments intracellulaires (*Figure 4B, article 1*). Aussi, si les dimères AC8EΔNt/ACs sont fonctionnels (ce que suggèrent fortement les expériences d'imagerie de biosenseurs réalisées avec la forskoline), leur activation via des RCPG qui seraient colocalisés dans les membranes intracellulaires (Irannejad *et al.* 2017), ne sont pas accessibles à des ligands comme l'isoprotérénol.

Cette différence de réponse entre une activation par un ligand extracellulaire (isoprotérénol) et par un activateur qui pénètre les bicouches lipidiques (forskoline) nous laisse penser que les AC séquestrées pourraient toujours être activables et potentiellement couplées à des RCPG intracellulaires eux même activables par des ligands endogènes (Irannejad *et al.* 2017). En effet, le modèle classique de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), dans lequel les récepteurs, les protéines G, les adenylyl cyclases et les protéines de signalisation en aval sont localisés, dans ou au voisinage de la membrane plasmique et interagissent entre eux de manière stochastique pour générer un signal global via un second messager, ne rend pas compte de la réalité pharmacologique. Depuis plusieurs années, la théorie qu'un RCPG puisse être activé depuis les membranes des compartiments intracellulaires tels que les endosomes, le RE et l'appareil de golgi, est fortement soutenue (Crilly and Puthenveedu 2021; Radoux-Mergault *et al.* 2023; Fasciani *et al.* 2022). Des biosenseurs conformationnels associés à des « nanobodies » ont été développés afin

d'étudier la signalisation des RCPG depuis les compartiments intracellulaires. Leur utilisation a mis en évidence qu'en réponse à l'isoprénaline, les récepteurs β-2 adrénergiques et leur protéines G activées produisent de l'AMPc à la membrane plasmique mais également que ces récepteurs une fois internalisés dans les endosomes sont toujours actifs et produisent également de l'AMPc (Irannejad *et al.* 2013) dans les cinq minutes suivantes. L'internalisation ne peut donc plus être considérée uniquement comme un mécanisme d'arrêt du signal, d'autant plus que souvent les ligands sont internalisés avec les récepteurs ce qui maintient leur activité (Calebiro *et al.* 2009). En 2017, une autre étude réalisée à l'aide de ces biosenseurs conformationels, a cette fois démontré que les récepteurs aux opioïdes (MOR, DOR) ainsi que les récepteurs β-1 adrénergiques localisés dans le Golgi et qui ne sont pas internalisés depuis la membrane plasmique, sont fonctionnels et capables de se lier à des ligands et d'activer les protéines Gαs afin de produire de l'AMPc (Irannejad *et al.* 2017; Stoeber *et al.* 2018). N'étant pas internalisés avec leurs ligands, ces récepteurs ne peuvent être activés que par des ligands endogènes ou des ligands pouvant passer les membranes par diffusion ou transport actif (tel que le transporteur des catécholamines 3 OCT3) (Irannejad *et al.* 2017; Stoeber *et al.* 2018). Ainsi, l'existence de ces RCPG actifs depuis les membranes intracellulaires met en évidence un nouveau degré de régulation des signaux AMPc depuis l'intérieur de la cellule et nous éclaire sur un rôle physiologique possible des adenylyls cyclases séquestrées au niveau de ces compartiments intracellulaires. D'autant plus qu'il a déjà été démontré que les ACs sont présentes et activables dans les nombreux compartiments intracellulaires (Ostrom *et al.* 2012). L'équilibre de l'adressage de récepteurs et de cyclases à la membrane plasmique et dans les membranes intracellulaires pourrait correspondre à une réalité physiologique, qui pourrait être altérée par l'expression de variants qui vont séquestrer leurs partenaires dans des compartiments intracellulaires, comme nous l'avons montré pour l'AC8E, mais comme cela a également été démontré pour des variants tronqués de récepteurs comme par exemple le récepteur à la vasopressine (Zhu and Wess 1998) ou le récepteurs à la dopamine D3 (Karpa *et al.* 2000). Enfin, même si les RCPG sont actifs au niveau intracellulaire et qu'ils sont associés aux même protéines G, les signaux AMPc générés vont avoir des effets fonctionnels distincts de ceux générés par les RCPG classiques à la membrane plasmique. Par exemple, l'AMPc produit au niveau endosomal par les récepteurs β2-adrenergiques contrôle la transcription de gènes qui ne

sont pas « uprégulés » par la signalisation β2-adrenergique initiée à la membrane plasmique (Tsvetanova and von Zastrow 2014; Bowman *et al.* 2016). De même, l'activation des récepteurs β1-adrenergiques dans les cardiomyocytes induit l'hydrolyse du PIP4 dépendante de la PLC-epsilon, mais également l'hypertrophie cellulaire et l'expression d'ANF (*atrial natriuretic factor*), ce qui est différent de la signalisation des β1AR à la membrane plasmique. L'inhibition de ces récepteurs au niveau du golgi par un inhibiteur spécifique limite ces effets qui sont par ailleurs impliqués dans l'hypertrophie cardiaque (Irannejad *et al.* 2017; Nash *et al.* 2019). Ainsi, l'intégration de ces signaux intracellulaires joue un rôle particulier dans la physiologie et dans la pharmacologie et l'identification de cibles thérapeutiques.

Comme nos résultats le suggèrent, un double mécanisme sous-tend l'effet dominant négatif de l'AC8E, car bien que le domaine N-terminal inhibe l'activité catalytique de l'enzyme, il n'est pas responsable de la formation du dimère, qui repose quant à elle sur l'interaction du domaine M1/M2 des autres ACs avec le domaine M2 de l'AC8E (Gu *et al.* 2001a). Cependant, le domaine N-terminal de l'AC8E pourrait jouer un rôle dans l'adressage à la membrane plasmique. En effet, une étude a montré que l'adressage de l'AC8 pleine taille vers la membrane plasmique (plus précisément les radeaux lipidiques) dépend de la liaison de la cavéoline-1 à deux motifs de liaison, CBM1 et CBM2 localisés dans les domaines N-terminal et C-terminal, de l'AC8 respectivement (Tabbasum and Cooper 2019). Aussi, la rétention de l'AC8E dans les compartiments intracellulaires pourrait être la conséquence du shift du domaine N-terminal, qui ne serait plus accessible à la cavéoline-1, alors que dans l'AC8EΔNt, l'interaction avec la cavéoline-1 n'est plus possible en raison de l'absence du site CBM1 situé dans le domaine N-terminal. Ainsi, cela suggère la complexité du mécanisme d'inhibition de l'AC8E qui impliquerait le domaine N-terminal à la fois dans l'inhibition de l'activité cyclase, mais aussi, dans son intégrité pour un adressage correct à la membrane, rendant ainsi compliqué toute stratégie visant à corriger les deux effets du domaine N-terminal.

Les mécanismes précis de régulation de l'adressage des AC à la membrane plasmique ne sont pas clairement identifiés, mais nécessite un passage par le réticulum endoplasmique, étape clé de la maturation et de l'adressage des protéines vers la membrane plasmique (Schwarz and Blower 2016). L'AC8E qui est séquestrée dans le RE va normalement finir par

être dégradée (Araki and Nagata 2011; Adams *et al.* 2019), mais cela suppose également que les ACs associés à l'AC8E vont également subir le même sort. Des résultats préliminaires antérieurs de l'équipe (*Régis Blaise et Isabelle Limon, résultats non publiés*) ont d'ailleurs suggéré une diminution de l'expression protéique de l'AC6 endogène dans les CMLV, dépendante de l'AC8E (*Figure D1.1*). Cependant, la quantification de ces observations reste délicate et à confirmer, et ce mécanisme reste difficile à démontrer et n'est pas envisageable en surexpression dans les HEK.

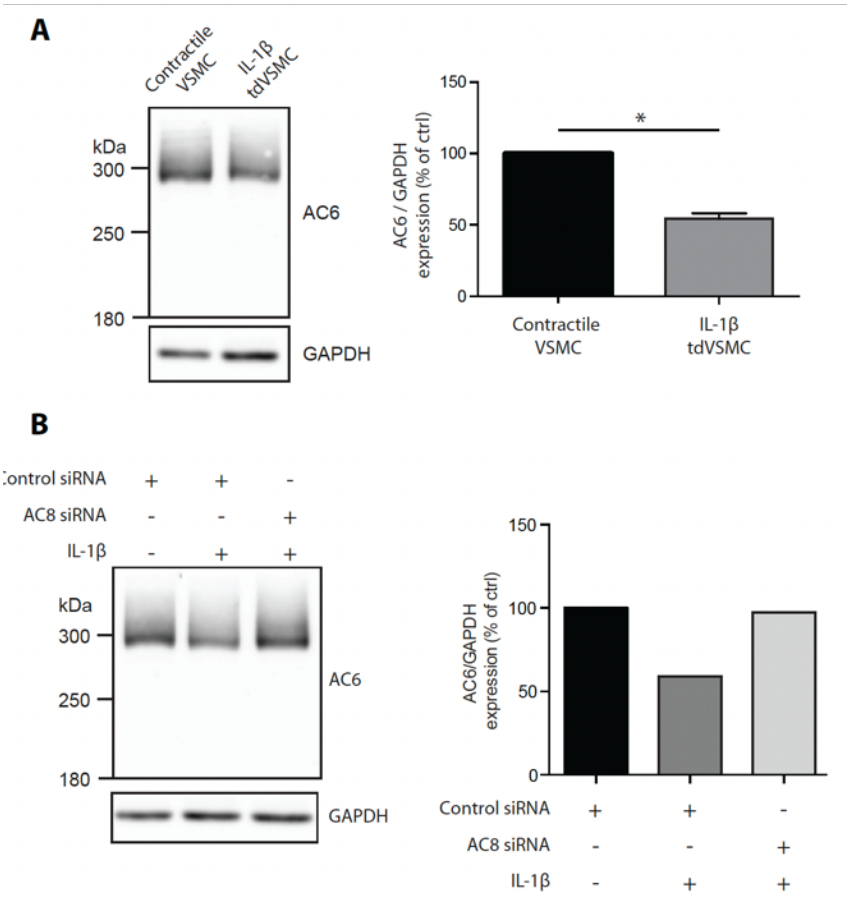


Figure D1. 1. Dégradation de l'AC6 dépendante de l'AC8E dans les tdCMLV

A. Expression de l'AC6 par western-blot dans des CMLV traitées ou non 48h avec 10 ng/ml d'IL-1β Les histogrammes (% of control) représente la moyenne ± SEM (n=3). *; P<0.05.
B. Expression de l'AC6 par western-blot dans des CMLV traitées ou non 48h avec 10 ng/ml d'IL-1β, en présence ou non de siRNA AC8

Il a été démontré que les domaines cytosoliques des cyclases sensibles au calcium telles que l'AC8 ou encore l'AC6 dictent leur adressage vers les rafts lipidiques de la membrane plasmique (Crossthwaite *et al.* 2005; Thangavel *et al.* 2009). Ainsi, même si l'AC8E possèdent toujours ses domaines C1 et C2, les interactions qui s'y produisent pourraient altérer cette

fonction d'adressage, comme nous l'avons montré pour les interactions entre le domaine N-terminal et les domaines HD (*Figure 2 et 3, article 1*) qui modifient la conformation du site catalytique.

Notre étude apporte un éclaircissement sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme (domaine N-terminal), mais met d'autant plus en avant l'importance de cibler la formation des dimères si l'on souhaite contrer l'effet dominant négatif de l'AC8E et limiter son effet sur la production d'AMPc afin d'empêcher la transdifférenciation des CMLV.

I.2. Spécificité tissulaire de l'AC8E

Il n'existe pas d'anticorps spécifiques de l'AC8E, mais des anticorps qui reconnaissent aussi bien l'AC8A que l'AC8E, et qui peuvent discriminer les AC8 par leur différence de taille. Cependant, les adenylyl cyclases endogènes sont difficilement détectables en Western Blot ; et en immunomarquage on ne peut pas distinguer l'AC8A de l'AC8E. Aussi le laboratoire avait développé une stratégie par PCR, qui permet de discriminer les transcrits AC8A et AC8E, par l'utilisation d'un couple d'amorces situées dans l'exon 1 et l'exon 2, permettant ainsi d'obtenir des produits de PCR de taille différente pour les deux variants (*Figure D1.2A*).

A ce jour, nous avons identifié des transcrits AC8E, uniquement *in vitro* dans les CMLV de rat traitées à l'IL1β, mais pas par d'autres cytokines pro-inflammatoires (*Figure D1.2B*). Ce transcrit AC8E n'est pas détectable dans d'autres tissus où l'AC8 pleine taille est exprimée, ce qui laisse supposer l'existence d'un promoteur alternatif ou de séquences cis-régulatrices spécifiques, sensibles à l'IL1β (*Régis Blaise, résultats non publiés*). Aussi, une stratégie pour contrer l'effet de l'AC8E était d'exprimer l'AC8A dans les tdCMLV. Des expériences réalisées au laboratoire en surexprimant l'AC8A à l'aide d'un adénovirus, dans les CMLV transdifferenciées, n'ont pas permis de limiter la transdifférenciation, bien au contraire (*Isabelle Limon, résultats non publiés*). L'utilisation des amorces de PCR décrites plus haut a permis de démontrer que lorsque l'on exprime le cDNA de l'AC8A dans des CMLV, une partie de ces cDNA va être épissée en AC8E, et que cette proportion de transcrits AC8E va augmenter avec le traitement à l'IL1β (*Figure D1.2C, Régis Blaise, résultats non publiés*). Cette découverte a été confirmée également *in vivo,* puisque l'expression de l'AC8A par adénovirus, dans des carotides avant « Balloon Injury », augmente la formation de la

néointima (*Figure D1.2D*, *Amélie Vromman et Isabelle Limon, résultats non publiés*). Aussi ces résultats de l'équipe suggèrent que l'expression de l'AC8E dans les tdCMLV est à la fois dépendante d'un promoteur ou de régions régulatrices spécifiques, mais également d'une machinerie d'épissage spécifique et sensible à l'IL1β, rendant tout concept de stratégie par thérapie génique inenvisageable.

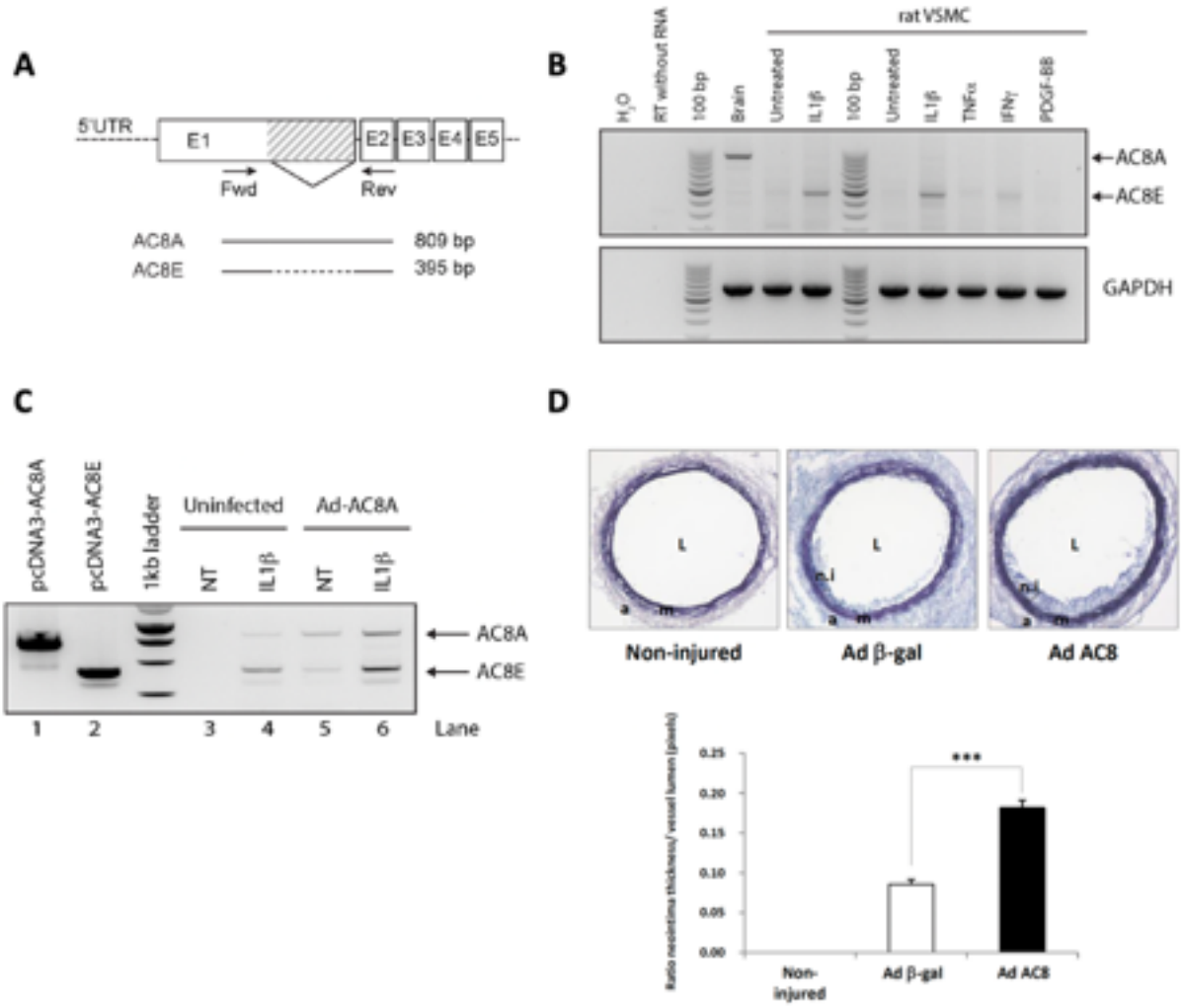


Figure D1. 2. Expression et épissage de l'AC8A et AC8E.

A. Stratégie de PCR permettant la discrimination entre AC8A et AC8E et les produits PCR résultants. **B.** Les CMLV ont été traitées ou non avec de IL1β (10 ng/ml), TNF-α (50 ng/ml), IFN-γ (100 UI/ml) et PDGF-BB pendant 48 heures. Les variants d'épissage d'AC8 et l'expression de GAPDH (témoin) ont été évalués par PCR. La PCR sur le cerveau de rat sert de témoin positif pour l'expression d'AC8A. **C.** L'expression des variants d'épissage AC8 a été évaluée par RT-PCR sur de l'ARN total provenant de VSMC infectées par un adénovirus codant pour AC8A (100MOI) pendant 48 heures. Les VSMC ont été transdifférenciées ou non avec de l'IL1β (10 ng/ml) pendant 48 heures supplémentaires. **D.** Les carotides ont été lésées ou non par ballonnet (ou non) ; les artères lésées ont été infectées par le virus Ad-βgal (contrôle) ou le virus Ad-AC8. De dix à vingt sections transversales colorées à l'hématoxyline-éosine provenant de 3 à 4 animaux ont été analysées. Images représentatives (panneau du haut) et analyse morphométrique (histogramme du bas) des sections transversales carotidiennes. Les barres représentent la moyenne ± SD des moyennes obtenues pour chaque animal. a, adventice ; m, média ; ni, néo-intima ; L, lumière. ***, p<0.001

I.3. Les variants d'épissages des AC et l'effet dominant négatif, un mécanisme spécifique de l'AC8E ?

L'AC8E est capable de s'hétérodimériser avec des AC membres de son groupe comme l'AC3 mais également avec des AC d'autres groupes comme l'AC2 du groupe 2 et l'AC6 du groupe 3, comme le démontre les expériences de co-immunoprécipitation (*Figure 1, article 1*). Ce résultat démontre que les AC, peu importe la famille à laquelle elles appartiennent peuvent être inhibées par une autre AC non fonctionnelle et on peut ainsi imaginer que ce mécanisme de dominant négatif s'étende à d'autres variants d'AC au-delà de l'AC8E. De nombreux variants d'épissage ou mutants de différentes isoformes d'adenylyl cyclases, actifs ou inactifs catalytiquement ont été identifiés, mais aucun n'a été caractérisé comme dominant négatif. On retrouve entre autres : i) un variant de l'AC5 dans le cœur du chien, qui génère une protéine tronquée catalytiquement inactive mais celle-ci n'impacte pas la production globale d'AMPc dans la cellule (Katsushika *et al.* 1993), ii) un autre variant de l'AC5 au niveau de son domaine N-terminal, cette fois identifié chez le rat, le chien et le lapin mais dont la modification n'altère pas la capacité de l'enzyme à produire de l'AMPc (Iwami *et al.* 1995), iii) un mutant de l'AC6 chez l'Homme caractérisé par une mutation A674S localisée dans le TM7 diminuant l'activité catalytique de l'enzyme (Gros *et al.* 2005), ou iv) un variant de l'AC9 présentant une délétion dans le domaine C2b identifié dans le cœur de la souris et de l'Homme, qui au contraire en levant l'auto inhibition de l'enzyme, conduit à une augmentation de la production de l'AMPc en réponse à l'activation d'un RCPG couplé Gαs (Pálvölgyi *et al.* 2018). Ces variants ont souvent été étudiés de manière indépendante sans analyser leur effet sur les protéines pleines tailles fonctionnelles ce qui laisse penser qu'ils exerceraient peut-être un effet dominant négatif sans que cela n'ait encore été démontré.

En revanche, l'existence de certains variants/mutants d'AC a été associée au développement ou à l'aggravation de certaines pathologies, parmi lesquels :

- Plusieurs variants de l'AC3 (mutation de type perte de fonction) ont été associés avec le développement précoce de l'obésité infantile (Saeed *et al.* 2018), et plus particulièrement le variant L117M retrouvé chez les patients obèses, affectant le positionnement des domaines transmembranaires et potentiellement l'activité catalytique de l'enzyme, semble jouer un rôle dans la pathologie (Toumba *et al.* 2022). Ce variant d'AC3 constituerait une cible thérapeutique intéressante.

- Des mutants d'AC9 (cinq polymorphismes identifiés : rs2531995, rs879620, rs2230742, rs2230741, and rs2531992) ont été associés soit à une augmentation de la susceptibilité aux gliomes ou à leur aggravation, soit à une diminution des facteurs de risques pour le gliome, pour autant l'impact de ces variants sur la production d'AMPc n'a pas été étudié (Zhang *et al.* 2021). Ces résultats sont principalement issus d'études de génotypages recherchant des SNP (*single nucleotide polymorphisme*).
- Des variants de l'AC5 identifiés par GWAS dans des populations européennes seraient impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique après le jeûne et dans le développement du diabète de type 2 (Dupuis *et al.* 2010), l'AMPc étant un régulateur de la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Si la découverte de ces variants et leur association à diverses pathologies est facilitée par les études de GWAS, leur caractérisation fonctionnelle et biochimique, ainsi que leur effet sur la production d'AMPc s'il en existe, doivent encore être approfondis. Malgré tout, leur existence et leur association à de nombreuses pathologies soutiennent l'importance de notre découverte sur le mécanisme dominant négatif de l'AC8E et son implication dans les remodelages vasculaires pathologiques.

Par ailleurs, l'AC8E n'est pas la seule protéine tronquée issue d'un épissage alternatif à exercer un effet dominant négatif en séquestrant ses partenaires fonctionnels dans le RE, bien au contraire il s'agit d'un mécanisme de régulation connu pour d'autres protéines transmembranaires. Ce mécanisme a été impliqué dans la régulation des RCPG suivants : le récepteur à la vasopressine de type V2 (Zhu and Wess 1998), le récepteur à la GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) (Grosse *et al.* 1997), le récepteur à la dopamine D3 (Karpa *et al.* 2000) et le récepteur des chémokines CCR5 (Benkirane *et al.* 1997). Un mécanisme similaire a également été identifié pour le variant d'épissage de l'aquaporine 4 humaine délétée de son exon 4 qui exerce un effet dominant négatif sur l'aquaporine sauvage (De Bellis *et al.* 2014), ou encore une version tronquée du transporteur ABCA1 qui inhibe l'activité de la forme pleine taille et induit une diminution du LDL-cholestérol circulant chez ces patients (Wellington *et al.* 2002; Rhyne *et al.* 2009).

II. AC8E comme cible thérapeutique chez l'Homme ?

II.1. Détection de l'AC8E chez l'Homme

Si notre étude démontre clairement le rôle de l'AC8E dans la transdifférenciation des CMLV, la démonstration indiscutable de son expression chez l'Homme est relativement compliquée et indirecte. En effet, l'identification de l'AC8E chez l'Homme est compliquée pour deux raisons :

L'indisponibilité d'un anticorps spécifique pouvant faire la différence entre la protéine pleine taille et la protéine tronquée, comme expliquée plus haut dans la discussion. Une solution pourrait être le développement d'un anticorps dirigé contre un épitope présent à la jonction entre les régions d'épissage de l'AC8E. Un anticorps de ce type, a été développé pour cibler l'épitope E200 spécifique au variant d'épissage non fonctionnel du récepteur P2X7 (nfP2X7R) fortement exprimé dans les cellules cancéreuses (mélanomes) chez l'Homme, et était en 2017 en phase 1 d'essai clinique (Gilbert *et al.* 2017). Cependant, le développement d'un tel anticorps pour l'AC8E nécessiterait beaucoup de temps et d'importantes ressources financières, sans réelle garantie de succès.

L'expression transitoire de l'AC8(E) durant la formation de la néointima démontrée chez le modèle de rat balloon injured (Gueguen *et al.* 2010a), explique que son identification sur des échantillons d'artères athérosclérosées humaines soit impossible. En effet, même en récupérant des échantillons chirurgicaux de patients, la plaque est déjà établie depuis longtemps et l'AC8E n'est probablement plus exprimée à ce stade. Notre laboratoire en collaboration avec l'équipe de Christophe Antoniewski (Plateforme ARTbio -IBPS) a également tenté d'identifier grâce à une analyse de bases de données de RNAseq, réalisées sur des échantillons de tissus humains de différentes pathologies, la présence de l'AC8E (par recherche de la jonction spécifique E1/E2), sans donner de résultats positifs. À nouveau, la nature transitoire de l'expression de l'AC8E rend cette identification compliquée puisque les échantillons humains utilisés pour les RNAseq sont réalisés sur des lésions tardives.

Cependant l'équipe a démontré de façon directe par immunofluorescence et immunohistochimie respectivement, l'expression d'une AC8 (sans pour autant pouvoir identifier le variant) au cours du développement de la néointima chez le modèle de rat ballon-injured et dans la néointima d'une aorte athérosclérosée chez l'Homme (Gueguen *et al.* 2010a). Elle a également démontré l'expression de l'AC8 dans l'athérosclérose, en

mettant en évidence qu'en l'absence d'AC8 les lésions athérosclérotiques étaient moins étendues dans le modèle murin APOE$^{-/-}$ x AC8$^{-/-}$ (Gueguen *et al.* 2016b). Bien que l'on n'ait jamais démontré directement qu'il s'agisse du variant AC8E dans ces études, sur la base d'une homologie des sequences des jonctions exons/introns très conservée entre l'Homme et les rongeurs, on peut suggérer sans trop de risque que l'AC8 exprimée est bien l'AC8E. En outre, on peut difficilement envisager que ce soit l'AC8A (forme pleine taille) quand on sait que l'AC8 n'est pas exprimée dans les CMLV en condition physiologique et que cette expression *de novo* est associée à une diminution de la production d'AMPc, mais également que l'AC8A est automatiquement épissée en AC8E comme démontré dans la *figure D1.2C*.

II.2. Cibler l'AC8E pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques

II.2.1. *Cibler l'interaction protéine-protéine (PPI)*

Les interactions protéine-protéine (PPI) jouent un rôle crucial dans la régulation des processus biologiques physiologiques ou pathologiques. Cependant, les PPI aberrantes (interaction entre protéines mal conformées, non fonctionnelles, etc.) sont associées à diverses maladies, notamment le cancer, les maladies infectieuses et les maladies neurodégénératives (White *et al.* 2008; Blazer and Neubig 2009; Rosell and Fernández-Recio 2018). Les résultats de notre étude, montrent que dans le contexte des remodelages vasculaires pathologiques, l'interaction de l'AC8E (une protéine tronquée et non fonctionnelle) avec ses partenaires limite leur activité catalytique et les séquestre dans les compartiments intracellulaires. Ces résultats illustrent l'implication d'une PPI aberrante dans une pathologie. Par conséquent, cibler les interactions protéine-protéine constitue une stratégie essentielle pour traiter les pathologies associées et développer de nouveaux médicaments. Au cours des dernières décennies, la modulation des PPI comme cible thérapeutique a été reconnue comme un vrai challenge (Lu *et al.* 2020).

L'approche classique consistant à utiliser des petites molécules pour cibler les interactions protéine-ligand est efficace car ces protéines ont un site de liaison de ligand bien défini avec lequel les petites molécules peuvent agir (Santos *et al.* 2017). Cette approche est beaucoup plus difficile à appliquer aux interactions protéine-protéine et représente un défi pour les raisons suivantes :

- Les PPI se produisent à l'interface d'un domaine spécifique où deux protéines identiques ou différentes sont en contact. La zone d'interaction de ces protéines atteint généralement 1500 à 3000 Å (Smith and Gestwicki 2012) ce qui est plus grand que la zone de contact récepteur-ligand (300 à 1000 Å2) (Cheng *et al.* 2007) et l'interface est très hydrophobe.
- L'interface des PPI tend à être plate et contient peu de sillons ou de poches, ce qui rend difficile la liaison des petites molécules (Buchwald 2010).
- Les résidus d'acides aminés impliqués dans les PPI sont soit continus, soit discontinus au sein de leurs structures protéiques respectives, ce qui entraîne une liaison de haute affinité entre les protéines, rendant difficile l'inhibition d'une telle interaction par des composés moléculaires de petite taille (Arkin and Wells 2004).

Cibler les interaction protéine-protéine est donc un défi en raison de leur interface unique et de leur nature plate contrairement aux poches de liaisons des ligands simples d'accès des cibles traditionnelles. Par conséquent, les méthodes classiques de biochimie (High-throughput screening ou Fragment-based drug discovery) sont moins efficaces pour la conception et l'identification de modulateurs de ces interactions protéine-protéine. Ainsi, il a été nécessaire de développer des approches plus efficaces pour le criblage des modulateurs d'interaction protéine-protéine ; et c'est ce qu'a réalisé le Dr.Angelita Rebollo avec la technique du PEPscan (Bruzzoni-Giovanelli *et al.* 2018) avec qui nous avons collaboré au cours de notre étude.

Par la suite nous avons choisi de développer des peptides interférents sur la base des séquences d'interaction identifiées par PEPscan, car leur efficacité dans la modulation des interaction protéine-protéine est bien supérieure à celles des petites molécules pour toutes les raisons citées plus haut. Cette stratégie sera discutée dans la partie suivante.

II.2.2. *Les peptides interférents*

La capacité de l'AC8E à s'hétérodimériser avec les AC fonctionnelles est le principal médiateur de l'effet dominant négatif, ainsi la meilleure stratégie à adopter pour limiter cet effet est de rompre le dimère AC8E/AC. Nous avons donc développé une stratégie pour identifier les régions impliquées dans cette interaction grâce au PEPscan (*Figure R1.1*) et

développer des peptides interférents sur la base des séquences identifiées afin de rompre cette interaction (*Tableau R1.1*). Cibler l'interaction protéine-protéine par l'utilisation de peptides interférents est une stratégie efficace démontrée dans plusieurs études (Bruzzoni-Giovanelli *et al.* 2018), notamment en oncologie avec l'interaction Ras-Raf (Tian *et al.* 2016b) ou encore dans la maladie d'Alzheimer en bloquant l'interaction entre EphB2 et les protéines ADDLs (Shi *et al.* 2016).

Les dix peptides générés ont donc été testés pour leur capacité à restaurer une production d'AMPc en réponse à la forskoline dans les CMLV transdifférenciées à l'IL1β qui soit similaire à celle des CMLV contrôles. Cependant, peu importe la méthode utilisée (par traitement direct ou par transfection de plasmides permettant l'expression de ces peptides), aucun des peptides candidats utilisé seul ou en combinaison n'a démontré de résultats concluants (*Figure R1.2 et R1.4*).

En effet, l'utilisation de peptides interférents pour cibler des protéines telles que les cyclases nécessite une mise au point pour remédier à certaines contraintes. Contraintes imposées par la taille importante et les nombreux segments transmembranaires de ces protéines, compliquant l'accessibilité des peptides aux domaines d'interaction. Si des stratégies de peptides interférents hydrophobes ont été développées pour cibler les domaines transmembranaires et empêcher la dimérisation de protéines transmembranaires, ces études se sont limitées en majorité à des protéines avec un seul domaine transmembranaire (Albrecht *et al.* 2020). Cependant une étude est parvenue à concevoir un peptide capable de rompre l'interaction entre les RCPG (sept domaines transmembranaires) A2AR (récepteur à l'adénosine) et D2R (récepteur à la dopamine D2) (Borroto-Escuela *et al.* 2013), même si ce résultat positif représente un espoir car l'AC8E comporte également sept domaines transmembranaires, elle interagit avec des AC pleine taille qui en comporte douze ce qui complique encore plus l'action d'un tel peptide interférent.

L'absence d'effets positifs des peptides sur la production d'AMPc (peptides incubés avec les cellules) pourrait également être liée à un défaut de localisation spécifique au niveau des membranes. Dans la littérature, la pénétration des peptides et leur stabilité sont deux problèmes souvent évoqués, pouvant être résolues en ajoutant une séquence peptidique de pénétration (CPP), en les circularisant ou en effectuant du "peptide stapling" par exemple (Sorolla *et al.* 2020). Dans cette optique, nous avons ajouté à nos peptides une séquence

Mut3DPT dont la stabilité et la résistance aux peptidases sont meilleures que d'autres séquences cargo connues (Mut1DPT et Mut2DPT) (Fominaya *et al.* 2015c; Fominaya *et al.* 2015b) et permettant aux peptides de pénétrer dans la cellule en contournant les propriétés hydrophobes de la membrane. Cependant, une fois le peptide entré nous ne pouvons pas nous assurer que sa localisation soit spécifiquement membranaire et qu'il ne diffuse pas ailleurs dans la cellule. Pour le vérifier, l'ajout d'un tag fluorescent aux peptides est à envisager tout en tenant compte du fait que ce tag puisse modifier leurs propriétés biochimiques, et par conséquent leur interaction avec la membrane . De plus, si le peptide pénètre dans le cytosol la fluorescence émise sera beaucoup trop importante pour la distinguer de celle émise spécifiquement par le compartiment membranaire dont la taille est négligeable en comparaison avec une cellule entière. Il sera donc nécessaire d'étudier et d'optimiser l'entrée et l'adressage des peptides interférents, et d'envisager de désigner des peptides fusion avec un fluorophore (ex : peptide-PP2A-NLS-mCherry) qui grâce à la séquence de clivage protéolytique (PP2A) conduirait à avoir un signal mCherry dans le noyau, témoin de la bonne expression du peptide, sans pour autant être certain que ce dernier n'est pas dégradé.

Un autre moyen d'optimiser ces peptides repose sur le développement de modèles 3D des dimères AC3 ou AC6/AC8E afin d'intégrer les séquences d'interactions identifiées par PEPscan dans des modèles dynamiques de membranes et vérifier avec plus de précision si elles sont réellement impliquées dans l'interaction. Ces modèles pourront alors être utilisés pour tester et optimiser les peptides interférents, avant d'envisager de nouveaux tests fonctionnels *in vitro*.

Enfin, l'objectif final du développement de ces peptides est de les délivrer grâce aux stents posés au cours de l'angioplastie, afin de remplacer les molécules antiprolifératives actuellement éluées et qui ne ciblent pas spécifiquement les CMLV. Cependant, une optimisation de la technologie des stents délivrant des peptides devra être effectuée, car actuellement dans des tests effectués chez le lapin, le signal fluorescent associé au peptide disparait environ 7 jours après l'implantation du stent (Bae *et al.* 2020). Cette cinétique de libération trop courte est problématique, puisque l'on a montré que 10 jours après une angioplastie au ballonnent chez le rat (Gueguen *et al.* 2010a), l'AC8(E) était toujours exprimée, ainsi on risquerait de ne pas intervenir dans un intervalle de temps suffisant afin

de limiter l'effet de l'AC8E et les bénéfices de ces peptides seraient limités. Aussi cette stratégie de peptides interférents reste envisageable mais nécessiterait d'améliorer la spécificité, la cinétique de libération ou la durée de vie du peptide.

II.2.3. *Stratégie de ciblage local et direct de l'expression de l'AC8E : les siRNA*

Face aux difficultés rencontrées dans le développement et l'utilisation des peptides interférents afin de rompre le dimère AC8E/AC, une autre solution est envisageable pour limiter l'effet dominant négatif de l'AC8E : les siRNA (small interfering RNA) dirigé contre l'AC8. En effet, si l'on ne peut agir sur la formation du dimère, on peut choisir d'éliminer l'AC8E.

L'idée consiste à développer des siRNA ciblant l'AC8 sans tenir compte de l'isoforme (A ou E) et de développer une stratégie permettant leur adressage uniquement au niveau des CMLV. L'isoforme ayant peu d'importance puisque qu'en condition physiologique l'AC8 n'est pas exprimée par les CMLV, ni dans aucun autre type de cellules murales et ainsi on n'impacterait que les CMLV transdifférenciées. D'autant plus que l'équipe a démontré que les siRNA AC8 restauraient une production d'AMPc dans les CMLV transdifférenciées (Vallin *et al.* 2018), et limitaient leur capacités migratoires et sécrétoires (Gueguen *et al.* 2010a). Cette stratégie de siRNA a été testée *in vivo* au laboratoire par la doctorante Amélie Vromman en 2013. Comme présenté sur la *figure D1.3* (*Isabelle Limon et Amélie Vromman, résultats non publiés*), l'utilisation de siRNA dirigé contre l'AC8, limite la formation de la néointima chez des rats ayant subi une angioplastie à ballonnet (*Figure D1.3*).

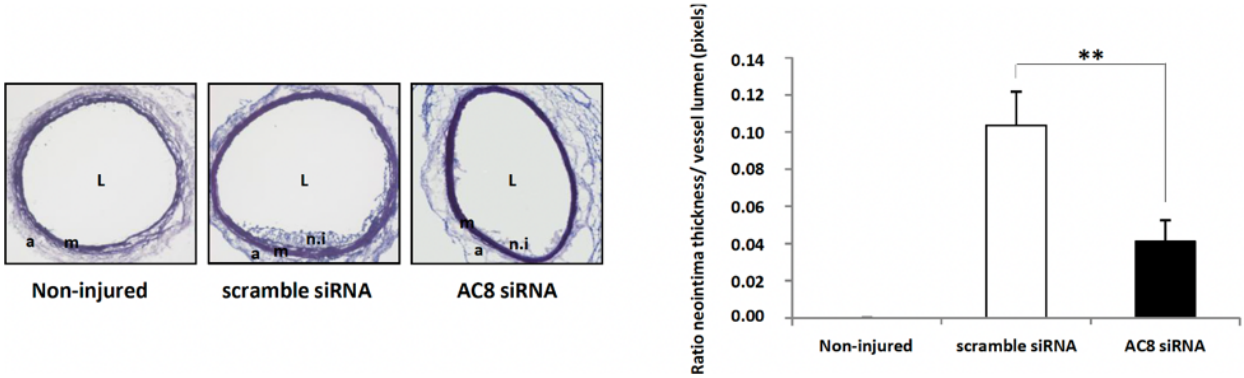


Figure D1. 3. Effet du siRNA AC8 sur la formation de la néointima par angioplastie à ballonnet chez le rat.

Les carotides ont été lésées par ballonnet (ou non) ; les artères lésées ont été perfusées avec des siRNA scramble marqué à l'Alexa Fluor 594 ou des siRNA AC8. De dix à vingt coupes transversales provenant de 3 à 6 animaux ont été analysées. Images représentatives (panneau de gauche) et analyse morphométrique (panneau de droite) de la coupe transversale de la carotide. a, adventice ; m, média ; ni, néo-intima ; L, lumière. *, $p<0,05$.

Dans le cas de la resténose post-angioplastie, afin d'assurer un adressage spécifique de ces siRNA au niveau des CMLV, un système de patchs (ou pansements périvasculaires) biocompatibles placés autour de l'artère après la pose de stent pourrait être développé. Ces patchs conçus à partir de matériaux biocompatibles tels que les hydrogels à base de chitosan permettent une délivrance du médicament au site d'action pendant 45 jours maximum (Ahmadi *et al.* 2015). Le chitosan est un polymère biocompatible, biodégradable et confère des propriétés mécaniques très stables, ce qui justifie l'engouement autour de son utilisation pour la délivrance de médicaments (Ahmadi and de Bruijn 2008). Les méthodes de fabrication de ces hydrogels, notamment la liaison du chitosan à des cross linkers qui peuvent limiter leur efficacité dans le temps, évoluent sans cesse afin d'améliorer leurs propriétés de délivrance comme avec l'utilisation de nano-chitosan (Saeedi *et al.* 2022). Ainsi, ces dispositifs de patch seraient une méthode intéressante pour délivrer spécifiquement et de manière ciblée, soit les siRNA dirigés contre l'AC8 soit les peptides interférents.

III. CONCLUSION

L'identification d'un variant de l'AC8, l'AC8E, agissant comme un dominant négatif et spécifiquement exprimé au cours de la transdifférenciation des CMLV a ouvert la voie à l'identification d'un nouveau mécanisme moléculaire dans les remodelages vasculaires pathologiques. La caractérisation fonctionnelle et biochimique de ce variant, a démontré qu'en s'hétérodimérisant avec ses partenaires, il les séquestre dans les compartiments intracellulaires, empêchant alors leur adressage à la membrane plasmique et de ce fait limite la production d'AMPc. La multiplicité des techniques utilisées (modélisation 3D, imagerie de biosenseurs, co-IP, IF, PEPscan et autres outils de biologie moléculaire) a fortement contribué à décrypter les composants de ce mécanisme. Grâce à ces approches, nous avons mis en évidence la dualité de ce mécanisme inhibiteur, agissant à la fois sur l'activité catalytique par un repositionnement du domaine N-terminal et sur la rétention intracellulaire par hétérodimérisation avec des ACs fonctionnelles. Si la délétion du domaine N-terminal a suffi à restaurer une production d'AMPc en réponse à la forskoline, elle n'a pas permis de restaurer la localisation à la membrane plasmique du dimère, le rendant toujours

incapable de répondre à des signaux extracellulaires. Ainsi, pour contrer cet effet dominant négatif nous avons opté pour une stratégie dont le but est de rompre l'interaction du dimère grâce à l'utilisation de peptides interférents. Cependant, aucun de ces peptides n'a permis de rompre le dimère ni de restaurer la production d'AMPc. Ainsi, l'optimisation du design de ces peptides grâce à la modélisation 3D ou en améliorant son adressage, constitue un des objectifs de ce projet, de même que le développement d'autres outils tel que les siRNA.

Le développement de tels outils s'inscrit dans un objectif à plus long terme visant à remédier à l'élution de molécules antiprolifératives par les stents posés lors des angioplasties à ballonnet, empêchant la ré-endothélisation du vaisseau en les remplaçant par des molécules qui cibleraient spécifiquement les CMLV et leur transdifférenciation pathologique. Ainsi, une fois ces outils mis au point *in vitro*, ils pourront être évalués *in vivo* pour leur capacité à limiter la resténose post angioplastie dans des modèles d'angioplastie à ballonnet chez le rat. Leur délivrance *in vivo* sera assurée par les stents eux-mêmes ou par des dispositifs de patchs péri- ou endovasculaires, qui nécessiteront eux aussi d'être optimisés.

In fine, ce projet a amélioré notre compréhension sur l'un des mécanismes moléculaires à l'origine de la transdifférenciation des CMLV et nous a permis d'identifier en l'AC8E, une cible thérapeutique potentielle dans le cadre des remodelages vasculaires pathologiques. Ce projet souligne l'importance de la signalisation des RCPG intracellulaires, qui a longtemps été ignorée mais qui, avec le développement de nouvelles méthodes d'études, est de plus en plus considéré dans la compréhension des mécanismes d'intégration des signaux extra- et intracellulaires. Notre perception des RCPG étant passée de simples interrupteurs « on/off » du signal à la membrane plasmique, à des régulateurs de signaux multiples dont les effets sur les voies de signalisation cellulaires peuvent varier selon leur compartimentalisation et leur régulation spatio-temporelle. Ainsi, comprendre comment la compartimentalisation de la signalisation des RCPG est régulée, offrira une opportunité unique pour développer de nouvelles approches pharmaceutiques ciblant les RCPG et ouvrir potentiellement la voie à de nouvelles approches thérapeutiques.

PARTIE 2 : MALADIE D'ALZHEIMER ET ANGIOPATHIE AMYLOÏDE CEREBRALE

INTRODUCTION

I. Maladie d'Alzheimer

I.1. Historique

Découverte au début du XX^{ème} siècle par le psychiatre Alois Alzheimer (Alzheimer *et al.* 1995), la maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative altérant les capacités cognitives au-delà de ce qui est imputable à un vieillissement naturel. La caractérisation des lésions à l'origine de la MA identifiées par Alzheimer a pris un certain nombre d'années et s'est fait en deux temps. D'abord la découverte des plaques amyloïdes (amas anormaux de fibrilles) en 1927 et l'association en 1963 des autres lésions de type dégénérescence neurofibrillaire correspondant à des filaments appariés en hélice ou PHF (*Paired Helical Filaments*) (KIDD 1963). Puis, l'identification dans les années 80 grâce à la biologie moléculaire du peptide amyloïde-β (Aβ) comme l'un des principaux constituants de la plaque (Glenner and Wong 1984) et des protéines tau hyperphosphorylées comme constituantes des (Brion *et al.* 1986). D'un point de vue histopathologique, la maladie d'Alzheimer se caractérise par la présence de plaques amyloïdes ou « plaques séniles » constituées principalement de peptides Aβ et d'un enchevêtrement intracellulaire de neurofibrilles (NFT pour *NeuroFibrillary Tangles*), constitué de protéines tau hyperphosphorylées. Ainsi deux hypothèses s'affrontent pour expliquer l'origine de la maladie, l'hypothèse amyloïde et l'hypothèse tau. L'hypothèse amyloïde soutenue par D.J Selkoe, propose que l'accumulation de peptide Aβ soit à l'origine des dégénérescences neuronales et synaptiques, de la neuro-inflammation et de l'enchevêtrement neurofibrillaire conduisant à la démence (Selkoe 1991). D'un point de vue moléculaire, en plus de 25 ans de recherche sur la pathologie, l'hypothèse amyloïde s'est imposée et de nombreuses études génétiques sont venues étayer l'importance du peptide amyloïde dans les altérations identifiées (Barage and Sonawane 2015; Selkoe and Hardy 2016).

I.2. Épidémiologie

La maladie d'Alzheimer c'est 225 000 nouveaux cas par an en France et 7,7 millions de nouveaux cas par an dans le monde. Actuellement plus de **35,6 millions de personnes** sont touchées par la MA dans le monde (Fondation Recherche Alzheimer). Selon les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de malades devrait presque doubler tous les 20 ans. Elle atteint le plus souvent les personnes âgées (15% des plus de 80 ans) mais de plus en plus de cas sont observés chez les moins de 60 ans (30000 patients en France).

La maladie d'Alzheimer est aujourd'hui considérée comme une maladie chronique et progressive, caractérisée par des capacités cognitives altérées au-delà de ce qui pourrait être considéré comme une conséquence du vieillissement normal, altérant la mémoire, la pensée, l'orientation, la compréhension, l'apprentissage, le langage et le jugement. Cette définition diffère légèrement selon qu'on se réfère aux données de l'OMS, de la HAS (Haute autorité de santé) ou encore des différents instituts de recherche.

I.3. Diagnostic

Un diagnostic certain et définitif de la MA repose uniquement sur les analyses post-mortem où l'on peut observer la neurodégénérescence fibrillaire et les dépôts amyloïdes. De nos jours seuls des tests neurologiques, neuropsychologiques, l'imagerie médicale ou des liens avec des antécédents familiaux permettent d'évaluer, indirectement, si le patient est atteint par la MA. Afin de guider les praticiens, une fois le diagnostic initial établi (*à l'aide du MMSE-Mini Mental State Examination*) plusieurs grilles d'évaluation sont fournies par la HAS afin de les aider à poser un diagnostic. On retrouve le DSM (*manuel diagnostic et statistiques des troubles mentaux*) et les documents de la NINCDS-ADRDZ (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* ou plus connue sous le nom *de Alzheimer Association*). Ces deux recommandations n'ont pas été modifiées depuis 2011, et les médecins n'ont aucune obligation à les suivre, rendant plus compliqué le diagnostic de la pathologie.

L'absence de biomarqueurs spécifiques, de marqueurs visibles par imagerie ou encore de tests neuropsychologiques précis empêche donc les patients d'être pris en charge à un stade précoce de la maladie et d'en limiter la progression. Des biomarqueurs potentiels font

tout de même l'objet de nombreuses études actuellement (Klyucherev *et al.* 2022) : les protéines plasmatiques pathologiques (Aβ et Tau) (Lee *et al.* 2019), les protéines associées avec la neurodégénérescence, l'inflammation, le métabolisme lipidique (Park *et al.* 2020), les miRNA (Swarbrick *et al.* 2019) ou encore la présence de peptide Aβ dans la rétine (Koronyo *et al.* 2023). Malgré tout, les scientifiques peinent à trouver des biomarqueurs simples à détecter et accessibles, car actuellement les plus grandes avancées se sont faites sur les outils diagnostiques tels que l'imagerie PET (*Positron Emission Tomography*) ou la détection de protéines dans le LCS (*Liquide Cérébro-Spinal, anciennement Liquide Céphalo-Rachidien*), qui sont malheureusement des techniques soit trop couteuses soit invasives. Aujourd'hui, l'identification d'outils diagnostiques précis, accessibles et faisant consensus au sein de la communauté scientifique est un vrai challenge dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

I.4. Signes et symptômes

L'un des signes les plus courants de la MA est la perte de mémoire et plus précisément le fait d'oublier des informations récemment apprises. Certaines personnes atteintes de déficience cognitive légère ou MCI (*Mid Cognitive Impairement*) peuvent présenter des troubles de la mémoire plus importants que la normale pour leur âge sans pour autant que cela n'impacte leur vie quotidienne. En revanche, ces personnes sont plus à risque de développer la MA. Au-delà de la perte de mémoire, les symptômes varient d'une personne à l'autre et apparaissent dans un ordre différent au cours du développement de la maladie. Parmi une liste de dix symptômes, établie par l'Alzheimer's Association, on retrouve la difficulté à planifier ou à résoudre des problèmes, la difficulté à exécuter les tâches quotidiennes, une confusion spatio-temporelle, les troubles de la vision, les changements d'humeur, les problèmes d'expression orale ou écrite, ou encore une altération du jugement et du raisonnement.

Une fois le diagnostic de la maladie d'Alzheimer posé suivant les étapes décrites dans la partie I.3, sept stades d'évolution de la pathologie basés sur le système BEHAVE-AD ont été décrits par le Dr. Barry Reisberg de la New York University School of Medicine's Silberstein Aging and Dementia Research Center (Reisberg *et al.* 1996). Il s'agit d'un système de classement lié à l'analyse du comportement d'un individu et de ses troubles cognitifs. Les trois premiers stades sont qualifiés de pré-démence et les stades 4 à 7 sont associés à des

démences dont la nature et l'intensité varient entre individus, en outre le diagnostic est rarement posé avant le stade 5. Malgré une définition assez précise des différents stades, ils peuvent se chevaucher et rendre difficile la détermination du stade réel auquel se trouve un malade, d'où l'importance du développement de biomarqueurs physiques.

Au-delà des différents stades de la maladie, les progrès en génétique ont permis d'identifier deux formes d'Alzheimer, une forme familiale (*FAD : Familial Alzheimer Disease*) et une forme sporadique (*SAD : Sporadic Alzheimer Disease*). Les formes familiales sont très rares (4-8% des patients atteints) et sont causées par des mutations autosomales dominantes sur trois gènes : APP (Goate *et al.* 1991), PSEN1 et PSEN2 (Campion *et al.* 1995; Sherrington *et al.* 1996). Une autre classification tenant compte de l'âge auquel les patients développent la maladie a été établie et distingue les Alzheimer précoces ou « *early onset* » touchant les moins de 60ans et les Alzheimer tardifs ou « *late onset* » touchant les plus de 60 ans.

I.5. Traitements

Aujourd'hui tous les médicaments approuvés ne font en majorité que réduire les symptômes de la MA, et même ceux qui réduisent la charge amyloïde ne parviennent pas à ralentir la progression de la pathologie (Passeri *et al.* 2022). Malheureusement, ces traitements sont associés à de nombreux effets secondaires et ne sont prescrits que dans des cas sévères, ainsi des progrès sont encore à faire dans la recherche de traitements. Dans ce sens, les scientifiques se tournent vers l'immunothérapie et deux traitements très récents semblent prometteurs : le lécanémab et le donanemab. Pendant longtemps, les traitements ciblant les acétylcholine transférases (dont l'activité était diminuée chez les patients Alzheimer et était associée à la dégénérescence des neurones cholinergiques) étaient majoritaires puis l'hypothèse amyloïde s'est imposée et la recherche s'est réorientée sur les peptides Aβ. Suite à cela de nombreuses études ont été et sont toujours menées autour de trois axes, qui seront développés plus loin (Barage and Sonawane 2015).

- La réduction de la production du peptide Aβ en altérant le clivage protéolytique de l'APP notamment via une inhibition de la β ou γ sécrétase ou une activation de l'α sécrétase.

- L'inhibition de l'oligomérisation ou de la fibrillation du peptide via l'utilisation de petites molécules telles que la nicotine, la mélatonine, les œstrogènes ou le développement d'anticorps anti-Aβ.
- La dégradation du peptide Aβ via l'activation de l'ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*), de l'IDE (*Insulin Degrading Enzyme*) ou l'EDE1 (*Endothelin I Converting Enzyme*), et l'amélioration des mécanismes de clairance.

Bien évidemment, la MA étant une pathologie multifactorielle, les recherches ne se focalisent pas uniquement sur le peptide Aβ. De nombreuses études ciblent la protéine Tau, l'inflammation ou encore les fonctions métaboliques et mitochondriales.

I.6. Démences dégénératives et vasculaires

La maladie d'Alzheimer est une pathologie complexe qui ne devrait pas être regardée sous un angle neurodégénératif seulement, comme le souligne Sydney Strickland dans une récente revue « *A better understanding of AD requires reconceptualizing the disorder as an amalgam of dysfunctions rather than one pathology.* » (Strickland 2018). Cette réflexion semble d'autant plus pertinente, quand on la superpose aux nombreuses études qui associent les dérégulations vasculaires au déclin de la fonction cognitive (Ogoh 2017).

Les démences de type dégénératives et de type vasculaires partagent une caractéristique commune, la perte neuronale, cependant les démences dites vasculaires se distinguent des atteintes dégénératives par une atteinte cérébrovasculaire. Même si les scientifiques ont tendance à séparer les deux, la majorité des patients présentent ce que l'on appelle des démences de type « mixte » et cela témoigne de la physiologie commune de ces deux pathologies. Longtemps ignorées car décrites comme étant une conséquence et non pas une cause de la MA, les atteintes vasculaires précèdent pourtant, souvent, les apparitions des symptômes cliniques de la maladie. Ainsi, le rôle commun des dépôts de peptide Aβ dans l'Angiopathie Amyloïde Cérébrale (AAC) et la maladie d'Alzheimer est sans doute le meilleur exemple d'interaction entre les processus neurodégénératifs et cérébrovasculaires. Par ailleurs, les voies pathogéniques de l'AAC et de la MA se rejoignent au niveau de la production des peptides Aβ, de sa circulation dans le liquide interstitiel et des voies de drainage périvasculaire, ainsi qu'au niveau des mécanismes de clairance cérébrale, mais divergent au niveau des mécanismes impliqués dans les lésions cérébrales et

dans les signes cliniques de la maladie (Greenberg *et al.* 2020). La coexistence et l'influence des deux pathologies l'une sur l'autre sont abordées dans la partie suivante.

I.7. AAC et MA

L'étude du système vasculaire dans la maladie d'Alzheimer (MA) est d'un grand intérêt car la démence liée à l'âge est souvent causée par une combinaison de pathologies neurodégénératives et cérébrovasculaires (Corriveau *et al.* 2016). Des recherches ont montré que les pathologies vasculaires, telles que l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) et l'athérosclérose, sont fréquemment associées à la pathologie de la MA (Boyle *et al.* 2018). Ces pathologies vasculaires contribuent significativement au déclin cognitif lié à l'âge. Par ailleurs, les effets cognitifs communs des pathologies neurodégénératives et vasculaires peuvent résulter des lésions cérébrales cumulatives causées par chacune de ces pathologies. De plus, les mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence partagent souvent des acteurs moléculaires communs avec ceux des pathologies vasculaires. Des exemples de ces interactions sont observés dans le cas de l'AAC et de la MA, où le dépôt de peptide Aβ joue un rôle commun dans le développement de la pathologie (Iadecola and Gottesman 2018). L'AAC peut par exemple influencer la pathogenèse de la MA en affectant le drainage péri-vasculaire, une voie majeure de clairance du peptide Aβ dans le cerveau (voir Partie II.3). Ainsi, les liens existants entre l'AAC et la MA soulignent l'importance de comprendre les interactions entre ces deux processus dans la pathogenèse de la maladie et pourrait permettre de développer des stratégies de prévention et de traitement plus efficaces pour la MA et l'AAC.

II. De la protéine APP à la formation de la plaque

II.1. Structure et isoformes de la protéine APP

Les peptides Aβ sont issus du clivage protéolytique d'une protéine transmembranaire appelée APP. La protéine APP (*Amyloid Precursor Protein*) est une glycoprotéine transmembranaire de type I, d'environ 87 kDa, comprenant un seul passage transmembranaire, un large domaine N-terminal extracellulaire et un petit domaine C-terminal intracellulaire. Plusieurs isoformes d'APP générées par épissage alternatif ont été identifiées et nommées selon leur nombre d'acides aminés, APP695, 751 et 770. L'APP770 est la forme pleine taille comportant 14 exons, l'APP695 est déletée des exons 7 et 8, et l'APP751 est délétée de l'exon 8. D'autres variants existent mais sont très peu exprimés. La protéine APP est ubiquitaire mais l'expression de l'APP695 est principalement localisée dans le système nerveux central (SNC) alors que l'expression des isoformes 751 et 770 est retrouvée en plus du SNC à la périphérie dans de nombreux tissus (thymus, rate, muscle lisse/ cardiaque/squelettique, rein, poumons thyroïde) (Tanaka *et al.* 1988). Chez l'Homme, seules les APP695 et APP751 sont exprimées. Chez les mammifères, le gène codant pour APP est localisé sur le chromosome 21, ce qui entraine une surexpression chez les personnes souffrant du syndrome de Down (Trisomie 21) et conduit souvent au développement d'un Alzheimer précoce (Prasher *et al.* 1998). Ce gène appartient à une famille de gènes très conservés qui codent également les protéines APP-like (*APLP*), APLP1 et APLP2. Ces trois protéines ont une structure et des domaines protéiques similaires à l'exception de la protéines APP qui possède une région « Aβ » à partir de laquelle sont générés par clivage protéolytique les peptides Aβ (Dawkins and Small 2014).

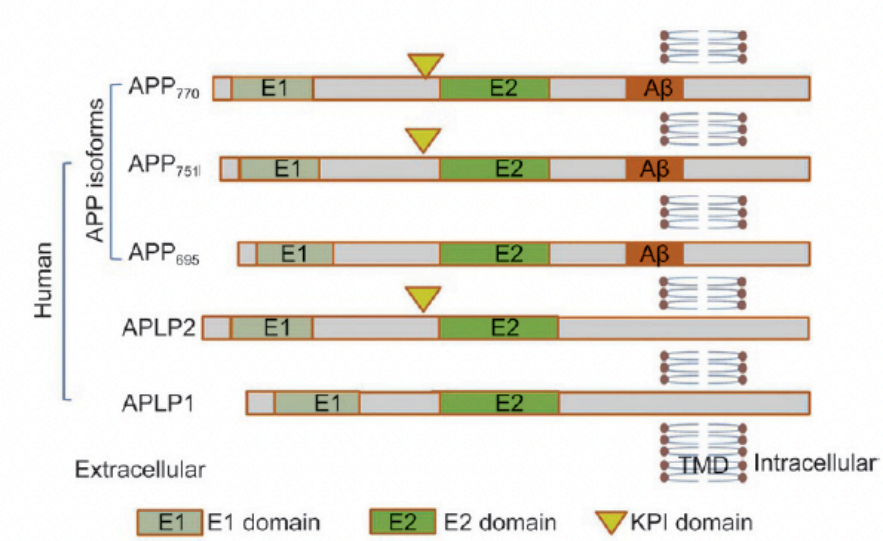


Figure I2. 1 Structure des domaines de la protéine APP et de protéines APP-like

D'après (Chen *et al.*, 2017)

Le domaine extracellulaire de la protéine APP est composé d'un domaine E1 riche en cystéine et d'un domaine E2 riche en hélices α, tous deux reliés par un domaine riche en acides glutamiques et aspartiques. La région Aβ est située à cheval entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire. Enfin le domaine intracellulaire très court, contient l'extrémité C-terminale dans laquelle on retrouve des sites de phosphorylation et un motif YENPTY qui permet à l'APP d'interagir avec les autres protéines et participe à son endocytose et à son trafic cellulaire (Lai *et al.* 1995). Cette extrémité C-terminale donnera naissance à un morceau de protéine APP intracellulaire (*AICD pour APP Intra Cellular Domain*), qui transloque dans le noyau et se comporte comme un facteur de transcription, à l'image de du domaine intracellulaire NICD des protéines de la famille Notch (Lazarov and Demars 2012). Le domaine E1 contient un domaine de liaison à l'héparine (HBD) structuré en hélices α et β, permettant l'interaction avec les protéines et la dimérisation de l'APP ainsi qu'un domaine de liaison au cuivre (CuBD) (Gralle *et al.* 2006). Quant au domaine E2, via sa richesse en hélices α et via un domaine HBD, il serait également impliqué dans la dimérisation de l'APP (Xue *et al.* 2011). A l'exception de l'isoforme 695, les APP possèdent un domaine KPI (*inhibiteur de la protéase de type Kunitz*) entre les domaines E1 et E2 qui jouerait un rôle dans la réparation des lésions en régulant les sérines protéases impliquées dans la coagulation sanguine lorsque ces isoformes sont exprimées dans les plaquettes (Van Nostrand *et al.* 1991). Enfin la région Aβ, adjacente à la région E2 contient un motif GxxxG

qui serait associé à la capacité de l'APP à s'homodimériser et serait impliqué dans la nature des fragments Aβ générés en réduisant la production de $A\beta_{1-42}$ au profit des formes plus courtes du peptide (Munter *et al.* 2007).

Les fonctions de l'APP ne sont pas clairement identifiées mais à travers son expression étendue à de nombreux tissus, elle semble impliquée dans des processus physiologiques variés. Sa capacité à s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec des molécules de la famille APP et à se lier à d'autres protéines lui permet d'activer plusieurs voies de signalisation. Entre autres, la protéine APP interagit via son domaine extracellulaire et via son motif GxxxG avec les composants de la MEC et ainsi participe à l'adhérence cellulaire mais régule aussi la migration neuronale, la croissance axonale et la plasticité synaptique (*pour revue voir* (Dawkins and Small 2014; Müller and Zheng 2012)).

II.2. Clivages protéolytiques de l'APP

II.2.1. *Voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique*

L'APP peut subir deux types de clivages protéolytiques, que l'on nomme voie amyloïdogénique, à l'origine de la production des peptides Aβ pathogéniques, et voie non amyloïdogénique (*Figure I2.2*). La localisation cellulaire de l'APP détermine quel type de clivage va être opéré. Une fois produit dans le RE, l'APP transite par l'appareil de golgi afin de subir des modifications post-traductionnelles et d'être maturée, puis la protéine est transportée vers la membrane plasmique où son clivage peut commencer soit directement soit après internalisation (Chen *et al.* 2017).

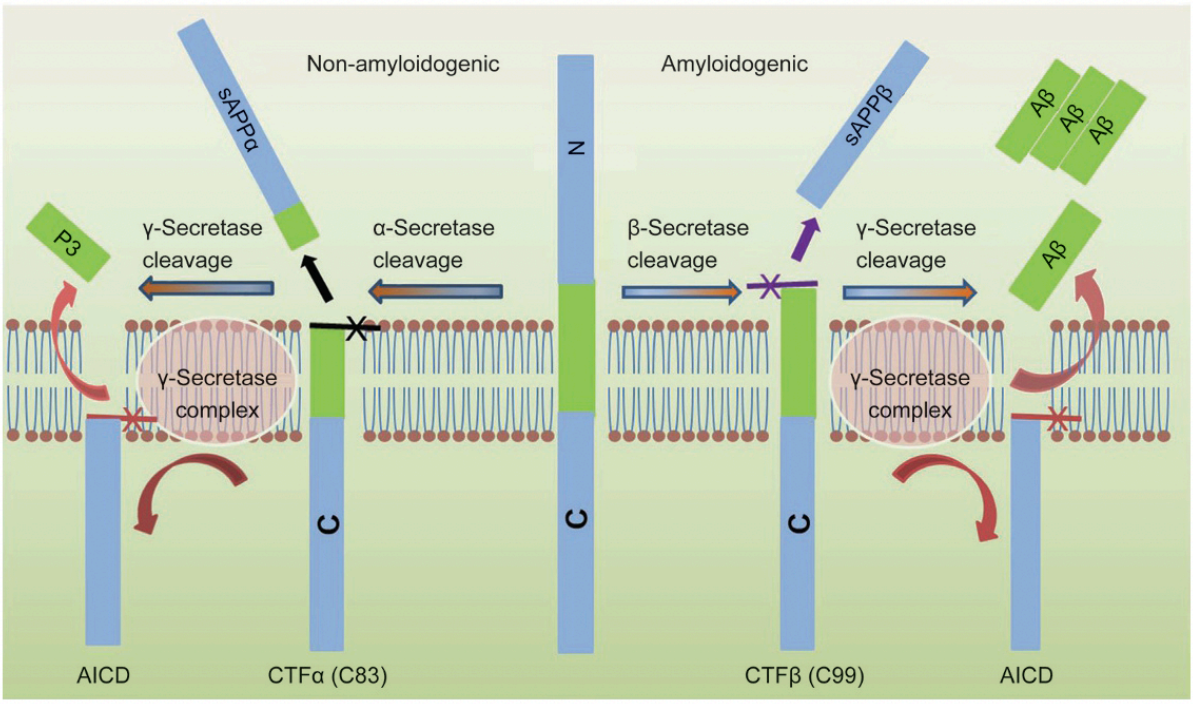


Figure I2. 2 Voie de clivage protéolytique de l'APP

Le clivage non amyloïdogénique de l'APP désigne le clivage séquentiel de l'APP par des α-sécrétases liées à la membrane, qui clivent dans le domaine Aβ pour générer le fragment α-C terminal lié à la membrane (CTFα ou C83) et le fragment N-terminal sAPPα. Le CTFα est ensuite clivé par les γ-sécrétases pour générer le peptide extracellulaire P3 et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD). Le clivage amyloïdogénique de l'APP est effectué par l'action séquentielle de β-sécrétases liées à la membrane et de γ-sécrétases. La β-sécrétase clive l'APP en un fragment C-terminal β lié à la membrane (CTFβ ou C99) et en un fragment N-terminal sAPPβ. Le CTFβ est ensuite clivé par les γ-sécrétases pour générer le peptide Aβ extracellulaire et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD).
D'après (Chen *et al.*, 2017)

Voie non amyloïdogénique

Une fois adressée à la membrane plasmique, la majorité de l'APP est traitée par la voie non amyloïdogénique. Dans cette voie, l'APP est clivée par l'α-sécrétase, une métalloprotéinase membranaire de la famille des protéines ADAM *(A Disintegrin And Metalloprotease*), dont l'isoforme ADAM10 est exprimée constitutivement et semble être prédominante dans le cerveau. Ce clivage par l'α-sécrétase dans le domaine Aβ entre les acides aminés Lys16 et Leu17, produit un fragment N-terminal soluble (APPs α) et un fragment C-terminal lié à la membrane, CTFα ou C83, qui peut être clivé ultérieurement par les γ-sécrétases et générant un peptide p3 soluble extracellulaire et un fragment AICD (*Amyloid Intracellular Domain*), empêchant ainsi la formation de peptide Aβ (*Figure I2.2*) (Sisodia 1992; Wilson *et al.* 1999).

Voie amyloïdogénique

Dans la voie amyloïdogénique contrairement à la voie non amyloïdogénique, la protéine APP est internalisée via les endosomes où est principalement localisée la β-sécrétase (Wilson *et al.* 1999). Dans cette voie l'APP est clivée par la β-sécrétase (*BACE1 ou 2, β-site APP cleaving enzyme*), générant un fragment N-terminal soluble (*APPsβ*) et un fragment C-terminal lié à la membrane, CFTβ ou C99 (Vassar *et al.* 1999). À l'intérieur de la membrane, le CFTβ est ensuite clivé par le complexe enzymatique γ-sécrétase, libérant un polypeptide cytoplasmique appelé AICD (*Amyloid Intracellular Domain*) du côté cytosolique et des peptides Aβ de l'autre côté de la membrane (Thinakaran and Koo 2008) (*Figure I2.2*), en fonction du site de clivage. L'AICD est alors transféré dans le noyau, où il agit comme facteur de transcription, tandis que les peptides Aβ sont sécrétés dans l'espace extracellulaire lors du recyclage de l'endosome à la surface cellulaire. La γ-sécrétase est un complexe constitué de quatre sous unités associées dans un ordre particulier : la nicastrine et APH1 forment un dimère recrutant le substrat, suivi du site catalytique formé par la préséniline (*PSEN1 et 2*), et se termine par PEN2 qui permet la maturation de la PSEN (Iwatsubo 2004). La présence de PSEN1 ou 2 dans la γ-sécrétase responsable de la synthèse du peptide Aβ, fait sens avec les mutations retrouvées dans les formes familiale de la MA. La γ-sécrétase clive l'APP à des sites variables dans le domaine transmembranaire, générant des peptides Aβ d'une longueur variant de 38 à 43 acides aminés. Cependant 90% des peptides Aβ générés sont du $A\beta_{1-40}$, alors que moins de 10% sont du $A\beta_{1-42}$, et les autres formes sont très peu exprimées (Thinakaran and Koo 2008).

II.2.2. *Fonctions physiologiques des différents fragments d'APP*

La protéine APP est surtout étudiée au regard de son rôle dans la production de peptides Aβ et pour les effets de ces derniers, mais les autres fragments générés lors du clivage d'APP ont eux aussi leurs propres fonctions physiologiques (Müller *et al.* 2017).

Les APP solubles (APPs), et plus particulièrement l'APPsα semble jouer un rôle dans la plasticité synaptique et la neuroprotection (par inhibition de l'apoptose caspase dépendante). L'action neuroprotectrice de l'APPsα est sujet à controverse puisque l'augmentation d'APP après des lésions cérébrales est au contraire associée au développement de la MA. Cependant, plusieurs études *in vivo* appuient cette action

protectrice (Corrigan *et al.* 2012; Plummer *et al.* 2016). Il s'avère que peu importe la quantité d'APP, c'est l'orientation vers une voie de clivage protéolytique ou l'autre qui détermine si l'effet sera bénéfique ou délétère. Tandis que l'APPsβ aurait une action opposée, parfois toxique pour les cellules en participant au processus de vieillissement et de mort cellulaire, via le récepteur DR6 (Nikolaev *et al.* 2009).

L'AICD (APP Intracellular Domain), est impliqué dans des voies de signalisations nucléaires. De nombreuses études ont montré qu'il serait en complexe avec d'autres protéines (telle que Fe65 ou promoteur de p53), impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles liés à l'apoptose (Ozaki *et al.* 2006).

CTF et p3, ont été peu étudiées mais il semblerait que le CTFβ induirait la neurodégénérescence et la gliose (Müller *et al.* 2017).

Les peptides Aβ, sont principalement connus pour leurs effets pathologiques dans la MA et l'AAC, et peu de données existent sur leurs fonctions physiologiques. Cependant, lorsque le peptide $A\beta_{1-42}$ est exprimé à des taux contrôlés (de l'ordre du picomolaire), il serait essentiel pour la plasticité synaptique, les fonctions cognitives et la mémoire (potentialisation à long terme) (Puzzo *et al.* 2008).En effet, les formes monomériques $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ ont été démontrées comme présentant des effets neuroprotecteurs (Parihar and Brewer 2010). Une activité antibactérienne a également été associée au peptide Aβ (Soscia *et al.* 2010; Kagan 2012).

II.3. Mécanismes de clairance du peptide Aβ

La clairance du peptide Aβ repose sur des échanges entre le système nerveux central et le sang, médiée via trois principaux mécanismes (*Figure I2.3*) : i) un efflux par transport à travers la BHE (*Barrière Hémato Encéphalique)* et drainage périvasculaire, ii) une dégradation par des enzymes spécifiques et iii) un influx par les récepteurs RAGE pour « *Receptor for Advanced Glycation End products* » (Nelson *et al.* 2016).

II.3.1. *Efflux du peptide Aβ*

L'efflux de peptide vers la circulation sanguine est principalement médié par transcytose à travers la BHE via les récepteurs LRP1 et LRP2 (*membre de la famille des LDLR*), et il est dans une moindre mesure, réalisé par drainage périvasculaire.

Transcytose du complexe ApoE/Aβ via LRP1. Le complexe Apoliprotéine E/Aβ cérébral se lit au récepteur LRP1 du côté abluminal de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et est rapidement internalisé dans les cellules endothéliales puis éliminé dans la circulation sanguine (Shibata *et al.* 2000). Ce processus implique tout d'abord une association des peptides Aβ avec les isoformes 2 et 3 de l'ApoE permettant sa liaison avec le LPR1 dont l'internalisation est très efficace, alors que les isoformes ApoE4 redirigent les peptides vers un transport via les VLDLR (*very low density lipoprotein receptor*), avec une internalisation beaucoup moins efficace. Le complexe Aβ/LRP1 est ensuite internalisé dans les cellules endothéliales par les vésicules à clathrine et PICALM (Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein). Après la dissociation rapide de la clathrine des vésicules internalisées, PICALM continue de guider le trafic intracellulaire des vésicules d'endocytose contenant le peptide Aβ à travers l'endothélium pour *in fine* fusionner avec les endosomes précoces Rab5+, puis avec les endosomes de sortie Rab11+, qui permettent l'exocytose d'Aβ du côté luminal de la BHE (*Figure I2.3*). Ce même récepteur LRP1 peut se présenter sous forme soluble dans le sang (sLRP1) et lier le peptide Aβ libre afin de le séquestrer (environ 70% de l'Aβ circulant est séquestré par sLPR1) jusqu'à ce qu'il soit dégradé par les reins ou le foie par exemple (Sagare *et al.* 2007).

Transcytose du complexe Clusterine/Aβ. En se liant à la clusterine (ou apolipoprotéine J), le peptide Aβ est ensuite transporté à travers la BHE via le récepteur LRP2 (*Figure I2.3*). La clusterine est l'apolipoprotéine la plus exprimée dans le cerveau et est connue pour ses fonctions anti-oligomérisation et anti-agrégation du peptide Aβ (Nelson *et al.* 2017).

Drainage périvasculaire. Le peptide Aβ peut également quitter le SNC par les voies périvasculaires lors du drainage du fluide interstitiel. Il diffuse à travers les espaces extracellulaires et passe dans la membrane basale entre les CMLV de la paroi artérielle (Weller *et al.* 2008).

II.3.2. *Dégradation enzymatique*

La dégradation enzymatique du peptide Aβ est un mécanisme important pour son élimination du cerveau. Plusieurs métalloprotéases, dont la néprilysine (NEP) (Marr *et al.* 2004) et l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) (de Tullio *et al.* 2008), contribuent respectivement à la dégradation enzymatique extracellulaire ou extra- et intra-cellulaire (*Figure I2.3*) (Kato *et al.* 2022). Les enzymes de conversion de l'endothéline 1 et 2 (ECE) ont également été démontrées comme dégradant au niveau intracellulaire le peptide Aβ produit au sein de la voie endosomale/lysosomale et des autophagosomes (Eckman *et al.* 2001). De plus, l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) a été montré capable de médier le détachement de la protéine LRP1 astrocytaire, ce qui augmente la perméabilité de l'unité neurovasculaire et facilite l'élimination de l'Aβ. D'autres enzymes de dégradation existent et comprennent : l'ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*), la Cat B (*cathepsine B*), la Cat D ou encore les MMP (*Métalloprotéinases Matricielles*) (Saido and Leissring 2012; Nelson *et al.* 2016).

II.3.3. *L'influx par les récepteurs RAGE*

Les RAGE, sont des récepteurs de surface multi ligands de la famille des immunoglobulines, qui permettent le passage du peptide Aβ du sang vers le SNC par transcytose à travers la BHE (Deane *et al.* 2003). Une version soluble de ce récepteur (sRAGE) permet au contraire de séquestrer le peptide Aβ dans le sang empêchant ainsi sa liaison à RAGE et le retour de Aβ vers le SNC. Les récepteurs RAGE constituent donc une cible lorsque l'on veut limiter l'accumulation de peptides Aβ dans le SNC (*Figure I2.3*).

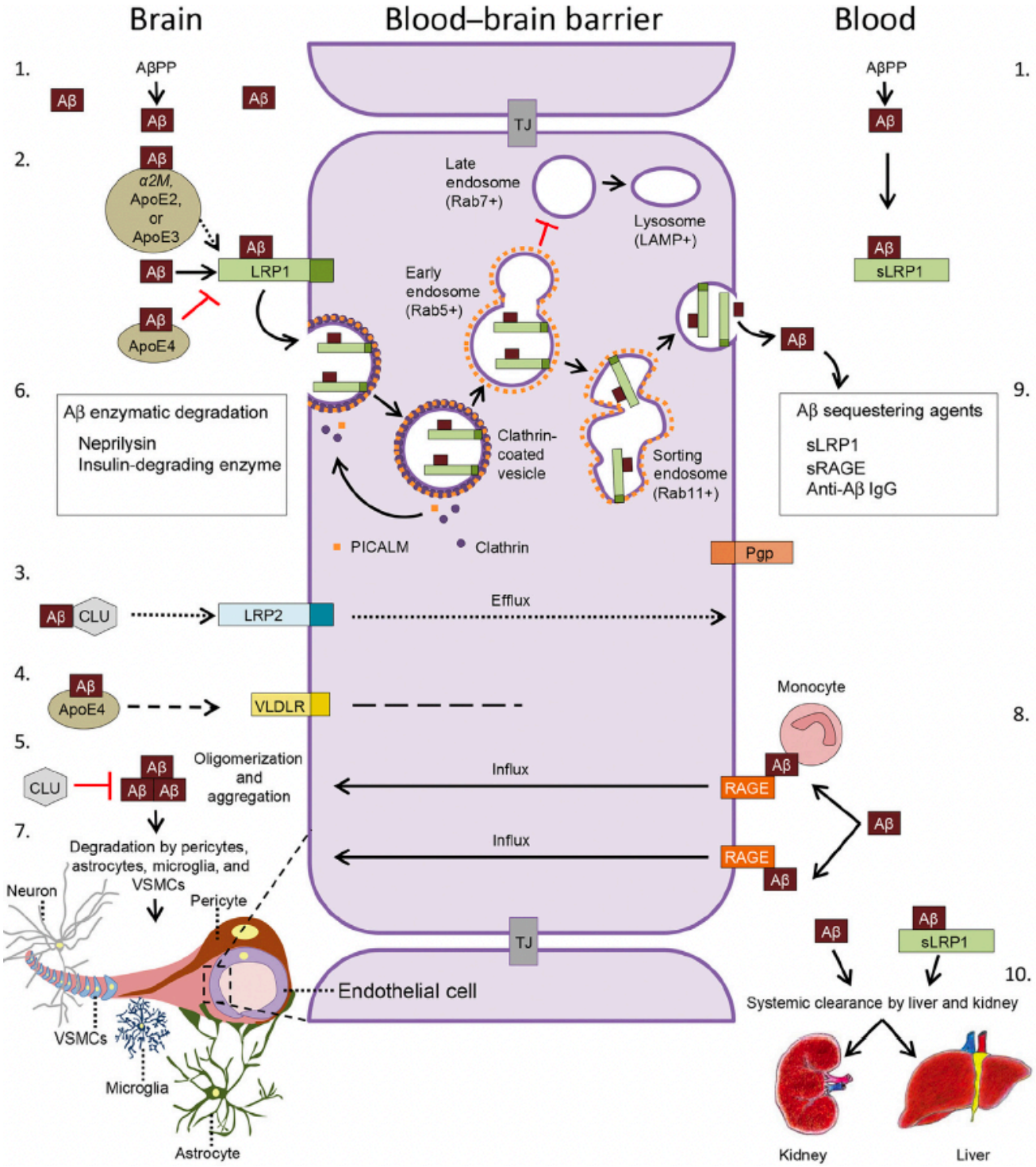


Figure I2. 3. Mécanismes de clairance du peptide Aβ à travers la BHE

(1) Le peptide Aβ est produit à partir de l'APP dans le cerveau et dans la périphérie. (2) Le peptide Aβ dérivé du cerveau est éliminé à travers la BHE par transcytose médiée par le LRP1. Le peptide Aβ libre ou associé à l'APOE2/3 se lie à LRP1 sur le côté abluminal de la BHE conduisant à une endocytose rapide du complexe LRP1-Aβ de manière dépendante de PICALM et de la clathrine. (3) La clusterine (CLU) médie l'efflux du peptide Aβ à travers la BHE via LRP2. (4) Le peptide Aβ lié à ApoE4 est éliminé par le VLDLR à une vitesse sensiblement plus lente que le peptide Aβ libre ou le peptide Aβ lié à l'ApoE2 ou l'ApoE3. (5) La clusterine empêche l'oligomérisation et l'agrégation du peptide Aβ. (6) Plusieurs enzymes, comme la NEP et l'IDE, contribuent à la dégradation enzymatique du peptide Aβ. (7) En plus de la clairance du peptide Aβ à travers la BHE, différents types de cellules comme les péricytes, astrocytes, les microglies, les CMLV et les neurones contribuent à la clairance du peptide. (8) RAGE médie l'influx du peptide Aβ circulant ou lié à des monocytes dans le cerveau à travers la BHE. (9) Le peptide Aβ séquestré dans le plasma par des agents tels que le LRP1 soluble (sLRP1), le RAGE soluble (sRAGE), et/ou des anticorps dirigés contre le peptide Aβ contribuent à la clairance du peptide en créant un gradient de concentration qui favorise l'efflux du peptide Aβ. (10) Elimination de la circulation du peptide Aβ par des organes excréteurs tels que le foie et le rein. D'après (Nelson *et al.*, 2016)

II.3.4. *Dérégulation des mécanismes de clairance*

La balance entre la production et la clairance du peptide Aβ, établit un équilibre physiologique essentiel, qui comme le suggère l'hypothèse amyloïde conduit aux évènements pathologiques déclencheurs de la MA et de l'AAC en cas de déséquilibre. Chez l'Homme, en condition physiologique, les taux de production et de clairance du peptide Aβ dans le LCS constituent un système à l'équilibre limitant l'accumulation de peptides Aβ. En conditions pathologiques, cette balance n'est plus maintenue (Bateman *et al.* 2006). Dans les formes familiales de la MA/AAC, le déséquilibre serait principalement dû à la surproduction du peptide Aβ liée aux mutations du gène de l'APP ou de la préséniline augmentant la production de peptide, tandis que les formes sporadiques résulteraient surtout d'une réduction de la clairance du peptide sous l'influence de facteurs de risque génétiques (comme l'APOE4), de facteurs environnementaux et de l'âge. De nombreuses études suggèrent que chez les personnes atteintes de la MA, la clairance du peptide Aβ est perturbée (Nelson *et al.* 2016). En effet, on observe chez ces patients une diminution des niveaux plasmatiques de sLRP1 ainsi que du complexe Aβ-sLRP1, conduisant à une augmentation des niveaux des peptides $A\beta_{1\text{-}40}$ et $A\beta_{1\text{-}42}$ libres dans le plasma (Liang *et al.* 2013; Sagare *et al.* 2011). De plus, chez les patients Alzheimer, l'expression du récepteur LRP1 est réduite dans les cellules endothéliales. L'isoforme ApoE4 de l'apolipoprotein E entraîne une réduction de l'efficacité de la transcytose du peptide dans des modèles murins (Bachmeier *et al.* 2013). En condition pathologiques, l'ApoE4 d'origine neuronale induit un métabolisme lipidique altéré dans les astrocytes, diminuant la clairance protéines Aβ mais est également impliqué dans la neuroinflammation, l'accumulation des dépôts amyloïdes et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Zhang *et al.* 2023). Enfin, les enzymes responsables de la dégradation du peptide Aβ, telles que la NEP et l'IDE, diminuent également avec l'âge dans le LCR et dans les régions où se forme des plaques amyloïdes.

L'altération progressive des mécanismes de clairance du peptide Aβ avec l'âge contribuent à l'accumulation et à l'agrégation du peptide, initiant la formation de plaques séniles dans le cerveau et les vaisseaux sanguins. Le drainage périvasculaire du peptide Aβ devient moins efficace en raison de la rigidification des artères liée au vieillissement, ainsi le peptide s'accumule et s'agrège dans les vaisseaux limitant la diffusion du peptide soluble

dans l'espace extracellulaire. *In fine*, les niveaux de peptide Aβ dans le cerveau augmentent et perturbent l'homéostasie du tissu neuronal.

II.4. Structure et propriétés des différents peptides Aβ

La séquence primaire du peptide Aβ composée de 42 acides aminés a été découverte en 1984 (Glenner and Wong 1984), mais la cristallisation de ce peptide par des méthodes classiques ne peut être réalisée du fait de son instabilité. La majorité des informations disponibles sur la structure 3D du peptide ont été obtenues par spectroscopie RMN (*résonance magnétique nucléaire*).

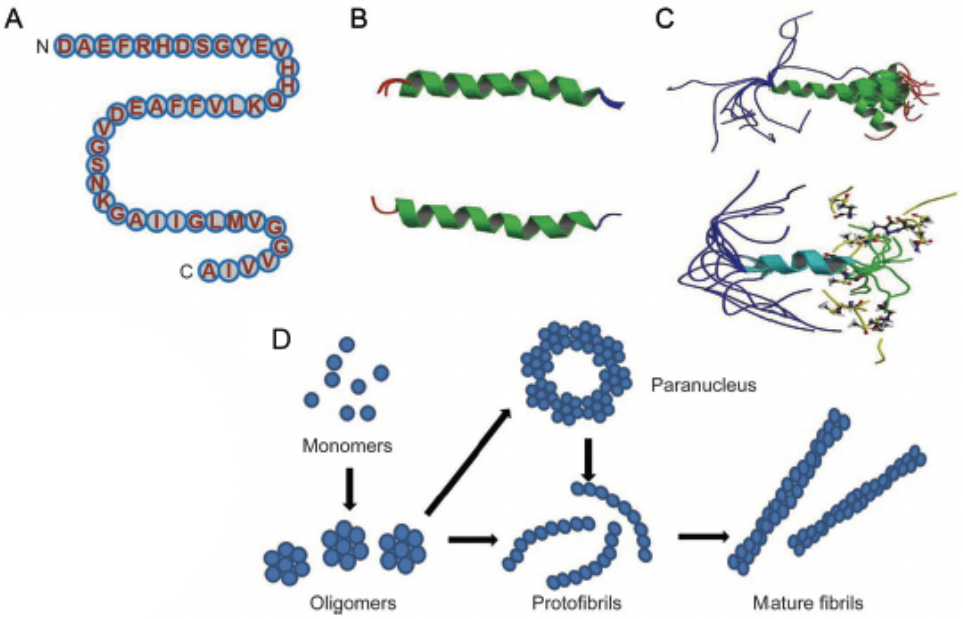


Figure I2. 4 Structure et différentes formes du peptide Aβ

A.Séquence en acides aminés du peptide $A\beta_{1-42}$. **B.** Structure en hélice α des 28 premiers aa du peptide Aβ. **C.** Structure du peptide Aβ1-40 dans laquelle acides aminés 15 à 36 adoptent une conformation en hélice α alors que les résidus 1 à 14 adoptent une conformation compacte de boucles, brins et coudes sans structure en hélice α et commencent à se réarranger en une structure en feuillets β-like, typique de fibrilles. **D.** Conversion du peptide amyloïde de la forme monomérique vers une forme oligomérique de faible poids moléculaire (dimère, trimère, tétramères et pentamères) ou haut poids moléculaire (hexamères, nonamères, dodécamères), ou vers la forme protofibrille et fibrille mature. D'après (Chen *et al.*, 2017)

Tous les peptides Aβ produits à partir de l'APP possèdent une structure amphiphile avec une extrémité N-terminale hydrophile, un petit fragment hydrophobe (du 17ème au 21ème acide aminé) suivi d'un fragment hydrophile et d'une extrémité C-terminale hydrophobe (à partir du 29ème acide aminé), variable selon les différents types de peptides (*Figure I2.4A*). Le peptide Aβ monomérique est organisé en hélices α mais peut subir un changement de conformation adoptant une structure en feuillets β, et ce changement est responsable de la fibrillation du peptide (Balbach *et al.* 2002). En outre, il a été montré que l'extrémité C-terminale très hydrophobe du peptide Aβ, constitue l'élément critique du passage de la structure en hélices α à une structure en feuillets β, et jouerait donc un rôle déterminant dans l'agrégation du peptide dans la MA. Ainsi le peptide $A\beta_{1-42}$ qui possède deux acides aminés hydrophobes supplémentaires par rapport au peptide $A\beta_{1-40}$, est relativement insoluble et forme plus facilement des fibrilles (Jarrett *et al.* 1993). L'insolubilité du peptide $A\beta_{1-42}$ explique aussi qu'il soit majoritaire dans les plaques séniles du parenchyme, contrairement au $A\beta_{1-40}$, de nature soluble et qui est donc capable de diffuser du SNC vers le sang.

Chez l'Homme, plusieurs isoformes de peptides Aβ sont retrouvées : $A\beta_{1-43}$, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-38}$ et $A\beta_{1-37}$. Ces différents peptides peuvent subir des modifications post-traductionnelles, modifiant légèrement leur cinétique d'agrégation (Vandersteen *et al.* 2012) et possèdent différentes propriétés de solubilité, de stabilité et de toxicité (Chen *et al.* 2017). En outre, une extension du domaine C-terminal ($A\beta_{1-43}$, $A\beta_{1-42}$) entraîne généralement une agrégation plus rapide et une transformation progressive en agrégats riches en feuillets β fortement interconnectés, en comparaison aux peptides plus courts ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-38}$ et $A\beta_{1-37}$) qui eux forment des fibrilles étendues caractérisées par une structure plus désordonnée. De plus, il a été observé que les formes $A\beta_{1-37}$ et $A\beta_{1-38}$ se comportent généralement de manière similaire à $A\beta_{1-40}$, tandis que le comportement de $A\beta_{1-43}$ ressemble fortement à celui de $A\beta_{1-42}$ (Vandersteen *et al.* 2012). Cependant, les études sur les fonctions des différents peptides Aβ se diversifient et démontrent que les formes les moins exprimées du peptide auraient elles aussi, une importance physiologique. Une de ces études a récemment mis en évidence que la forme $A\beta_{1-38}$ en interagissant avec la forme $A\beta_{1-42}$ empêcherait sa conversion en feuillets β et limiterait ainsi son agrégation (Quartey *et al.* 2021).

II.5. Les différents stades d'agrégation et toxicité du peptide

Dans l'hypothèse amyloïde, on suppose que l'agrégation du peptide Aβ sous forme de plaques conduit à la neurotoxicité et aux démences associées à la MA et à l'AAC. La réalité est plus complexe puisqu'il existe plusieurs formes (solubles et insolubles) et états d'agrégation des peptides Aβ qui coexistent, tels que les monomères, les oligomères, les protofibrilles, les fibrilles amyloïdes (Chen *et al.* 2017).

Le processus d'agrégation commence par la formation de dimères, qui ensuite forment des oligomères d'Aβ, d'environ 3 nm de diamètre. Ces oligomères co-agrègent pour former des fibrilles avec un aspect perlé caractéristique, appelées « protofibrilles », qui évoluent ensuite pour former les fibrilles amyloïdes qui sont des structures non ramifiées d'environ 6 à 10 nm de diamètre (*Figure I2.4D*). Une fois le réseau de fibrilles amyloïdes établi, il peut continuer à croître en ajoutant des monomères aux extrémités des fibrilles (Nichols *et al.* 2002). Ces fibrilles sont les principaux constituants des plaques séniles observées dans le parenchyme cérébral des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Elles sont souvent associées à d'autres composants, tels que des lipides et des protéines impliquées dans le métabolisme et le transport des lipides, comme l'ApoE. Les fibrilles amyloïdes peuvent se dissoudre et se reformer de manière continue plutôt que de rester irréversiblement emprisonnées dans les plaques, permettant ainsi la libération des formes oligomériques présentes aux extrémités des fibrilles contenues dans les plaques. Les lipides qui interagissent avec les fibrilles amyloïdes semblent favoriser la libération des formes oligomériques toxiques (Kiskis *et al.* 2015). Enfin plusieurs autres paramètres peuvent modifier le taux d'assemblage des fibrilles : la température, le pH, le temps d'incubation, la concentration du peptide ou l'expression d'autre protéines co-déposées avec le peptide (Kusumoto *et al.* 1998; Burdick *et al.* 1992).

Contrairement aux fibrilles, la structure des oligomères est moins bien étudiée du fait de son instabilité et de son caractère transitoire (Yu *et al.* 2009). Il n'est pas clair non plus si les structures oligomériques représentent les unités de base des protéines amyloïdes qui s'assemblent ensuite en fibrilles, ou si elles sont simplement en équilibre avec les monomères, qui formeraient directement des fibrilles sans passer par une structure oligomérique intermédiaire. En revanche, il est établi que les formes oligomériques (40 à 200kDa) sont beaucoup plus solubles que les fibrilles matures, et sont capables de diffuser

dans le parenchyme cérébral. Sur cette base, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, suggèrent que les formes oligomériques du peptide seraient plus toxiques et interféreraient avec les fonctions neuronales entrainant des dysfonctions synaptiques et la mort neuronale (Terry 1996; Kirkitadze *et al.* 2002). Il a également été rapporté que le peptide $A\beta_{1-42}$ plus hydrophobe, forme des oligomères à une concentration plus faible (2-200nM) que celle du peptide $A\beta_{1-40}$ (dizaines de µM)(LeVine 2004).

La toxicité des oligomères est médiée par divers mécanismes. L'un de ces mécanismes réside dans leur capacité à se lier à plusieurs récepteurs à la surface des neurones, tels que les récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA, les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, les récepteurs β-adrénergiques et d'autres (Kayed and Lasagna-Reeves 2013). Cette liaison peut activer différentes voies de signalisation, entraînant une dysfonction synaptique et la mort cellulaire. Ils peuvent également se lier aux récepteurs LRP1 ou RAGE pour être internalisés et leur accumulation intra-endosomale ou -lysosomale entraine une libération des protéines lysosomales déclenchant la mort cellulaire. De plus, les oligomères amyloïdes peuvent s'accumuler à l'intérieur des compartiments cellulaires et perturber de nombreux processus cellulaires, dont la fonction du protéasome, la fonction mitochondriale et l'autophagie (Sandwall *et al.* 2010). Cela peut entraîner l'accumulation de protéines toxiques et d'autres débris cellulaires, et finalement aboutir à la mort cellulaire. Un autre mécanisme est leur capacité à s'insérer dans la membrane neuronale et former des canaux ioniques ou des pores, ce qui peut entraîner des dérégulations de flux ionique, comme le calcium par exemple, favorisant de nombreux processus dégénératifs dont la formation de radicaux libres et l'hyperphosphorylation de la protéine tau, accélérant ainsi la neurodégénérescence (Kagan 2012).

III. Angiopathie Amyloïde Cérébrale

L'AAC, pathologie cérébrovasculaire liée à l'âge, se caractérise par l'accumulation progressive de peptides Aβ dans et autour des vaisseaux du cortex cérébral et des leptoméninges. Elle est retrouvée chez 80% des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer mais également chez les patients âgés n'ayant aucune atteinte neurologique. Pendant longtemps sous-estimée, elle est maintenant reconnue comme cause importante d'hémorragies intracérébrales spontanées et des déficiences cognitives chez les personnes âgées (Pinho *et al.* 2021; Jellinger 2002). Les mécanismes moléculaires partagés par l'AAC et la maladie d'Alzheimer soulignent l'importance de comprendre les interactions impliquées dans la pathogénèse de ces pathologies afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans le chapitre suivant, nous présenterons le système cérébrovasculaire avant de développer les caractéristiques physiopathologiques de l'ACC et ses conséquences sur ce système cérébrovasculaire.

III.1. Le système cérébrovasculaire

III.1.1. *Anatomie du système*

Le système cérébrovasculaire comprend l'ensemble des vaisseaux permettant le transport du sang vers et depuis le cerveau. Le cerveau reçoit entre 15 et 20% du débit cardiaque total, ce qui en fait un des organes les plus perfusés. À la différence de la circulation sanguine périphérique, où la résistance vasculaire est principalement opérée par les petites artères et artérioles, ce sont les artères de grand calibre qui assure la résistance vasculaire dans le cerveau. Cette résistance est plus importante dans le cerveau afin de maintenir un flux sanguin et un apport nutritif constants aux neurones, mais également de protéger la microcirculation cérébrale en cas de variation de la pression artérielle.

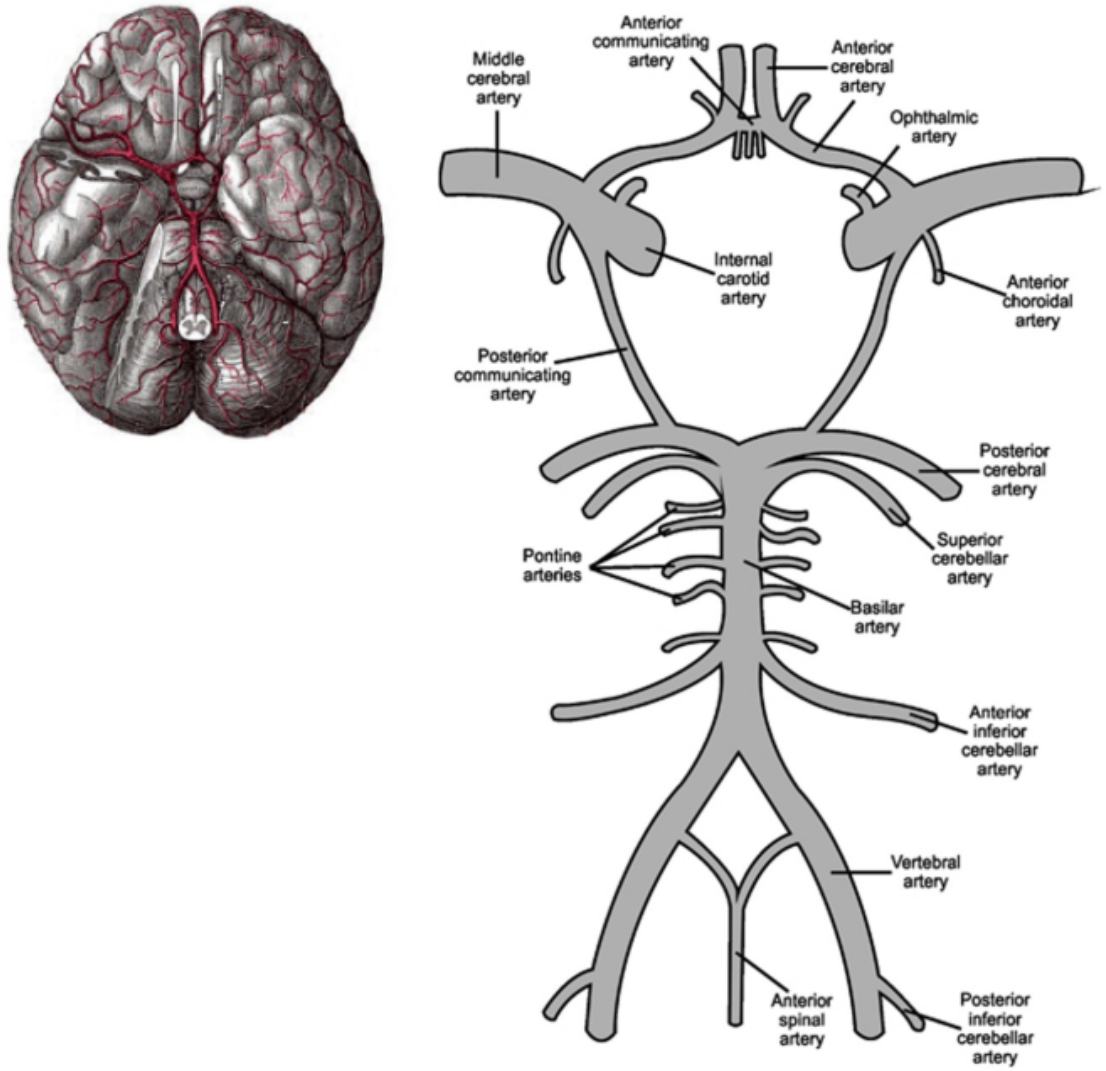


Figure I2. 5. Anatomie du cercle de Willis

L'artère carotide interne (Internal carotid artery ICA) ne possède que de petits embranchements sur le cercle de Willis et la partie intracrânienne de l'ICA est située dans l'espace sous-arachnoïdien, entourée du LCS, donnant lieu à une artère ophtalmique relativement petite puis se ramifie en deux artères terminales : l'artère cérébrale moyenne (Middle cerebral artery MCA) et l'artère cérébrale antérieure (Anterior cerebral artery ACA). Deux artères vertébrales sur la partie antérieure du tronc forment l'artère basilaire (BA), qui se ramifie ensuite. L'artère communicante antérieure (Anterior communicating artery) relie les deux ACA, alors que l'artère communicante postérieure (Posterior communicating artery) relie l'artère cérébrale postérieure (Posterior cerebral artery PCA) et l'ICA. Adapté depuis (Cipolla, 2009) et (Vrselja *et al.*, 2014)

Le réseau artériel cérébral est composé de deux paires de grandes artères, les carotides internes gauche et droite et les artères vertébrales gauche et droite. Les artères carotides internes vascularisent la plus grande partie du cerveau (80%) et les artères vertébrales se réunissent pour former l'artère basilaire. À la base du cerveau, l'artère basilaire donne naissance à un réseau de vaisseaux organisés en polygone, appelé cercle de Willis, qui comprend également trois paires d'artères principales : les artères cérébrales antérieures

(ACA), moyennes (MCA) et postérieures (PCA) (*Figure I2.5*). Ces artères leptoméningées localisées à la surface du cerveau et reposant sur la *glia limitans* (barrière mince composée de pieds astrocytaires associés à la lame basale parenchymateuse), se subdivisent ensuite en petites artères et en artérioles qui pénètrent dans le parenchyme, appelées artérioles parenchymateuses. Le cercle de Willis est également à l'origine de nombreuses autres artères qui irriguent différentes régions du cerveau. Les nombreuses connexions (anastomoses) entre le cercle de Willis et le réseau de vaisseaux leptoméningés permettent de réduire les risques d'ischémie si l'une des artères reliant le polygone est obstruée (pour revue (Vrselja *et al.* 2014; Cipolla 2009)).

Le système veineux cérébral se divise en veines cérébrales superficielles (externes) et veines cérébrales profondes (internes). Les veines superficielles comprennent les sinus veineux duraux situés à la surface du cerveau, tels que le sinus sagittal supérieur, les deux sinus transversaux et les sinus sigmoïdes qui finissent par former les deux veines jugulaires. En revanche, le drainage veineux profond est principalement constitué de veines à l'intérieur des structures profondes du cerveau, qui se rejoignent à l'arrière du cerveau moyen pour former la veine de Galien (Cipolla 2009).

III.1.2. *Structure et environnement des artères cérébrales*

d) La paroi artérielle

La structure et les types cellulaires composant la paroi des artères cérébrales sont similaires à ceux des artères systémiques présentés dans la partie I.2 de l'introduction générale. On peut tout de même relever quelques différences liées à leurs fonctions et à l'architecture cérébrale (Cipolla 2009). En effet, les artères cérébrales se distinguent par plusieurs caractéristiques : (i) elles ne possèdent pas de lame élastique externe, mais ont plutôt une limitante élastique interne bien développée; (ii) leur lame élastique interne est fenestrée, avec des ouvertures qui varient selon le segment artériel; et (iii) elles montrent une réduction du nombre de fibres élastiques dans la média et une adventice très mince, ce qui entraîne un rapport paroi/lumière plus faible que dans les artères périphériques. Une fois dans le parenchyme cérébral, les artères intracrâniennes ne sont pas vascularisées par le *vasa vasorum*, mais elles possèdent de petites fenêtres dans leur adventice agissant comme

des stomates, appelées *rete vasorum*, qui sont perméables aux grandes protéines et permettent les échanges avec le liquide cérébro-spinal (Zervas *et al.* 1982).

e) Unité neurovasculaire

Le système cérébrovasculaire par sa proximité et ses nombreuses ramifications interagit directement avec les cellules neuronales, rendu possible par les artères qui se ramifient et conduisent le flux sanguin jusqu'aux capillaires, qui forment alors la microcirculation sanguine cérébrale. Les capillaires sont constitués d'une seule couche de cellules endothéliales mais sont dépourvus de CMLV. D'un point de vue fonctionnel, ils assurent l'approvisionnement en oxygène et en nutriments essentiels du tissu cérébral. D'un point de vue structural, contrairement aux capillaires périphériques, les capillaires cérébraux ne sont pas fenestrés, mais ils forment des structures étanches grâce aux jonctions serrées présentes entre les cellules endothéliales, empêchant ainsi le passage des molécules entre les cellules. Les cellules endothéliales de ces capillaires sont entourées d'une lame basale synthétisée par l'endothélium lui-même, composée de collagène de type IV, de protéoglycanes d'héparine sulfate, de laminine, de fibronectine et d'autres protéines de la matrice extracellulaire. Quant à la lame basale, elle est associée aux neurones, aux péricytes et aux prolongements astrocytaires qui entourent les capillaires cérébraux. Ces différents types cellulaires adjacents aux capillaires forment une "unité neurovasculaire" (*Figure I2.6*), au sein de laquelle les différentes cellules qui la composent communiquent et interagissent, formant ainsi une barrière efficace contre les molécules plasmatiques et permettant la régulation du flux sanguin (Zhang *et al.* 2012). Le concept d'unité neurovasculaire (UNV) a révélé l'interdépendance des neurones et des vaisseaux sanguins dans le maintien du flux sanguin cérébral, ainsi toute altération de l'un des éléments de l'UNV peut potentiellement conduire au développement des pathologies cérébrovasculaires ou neurodégénératives.

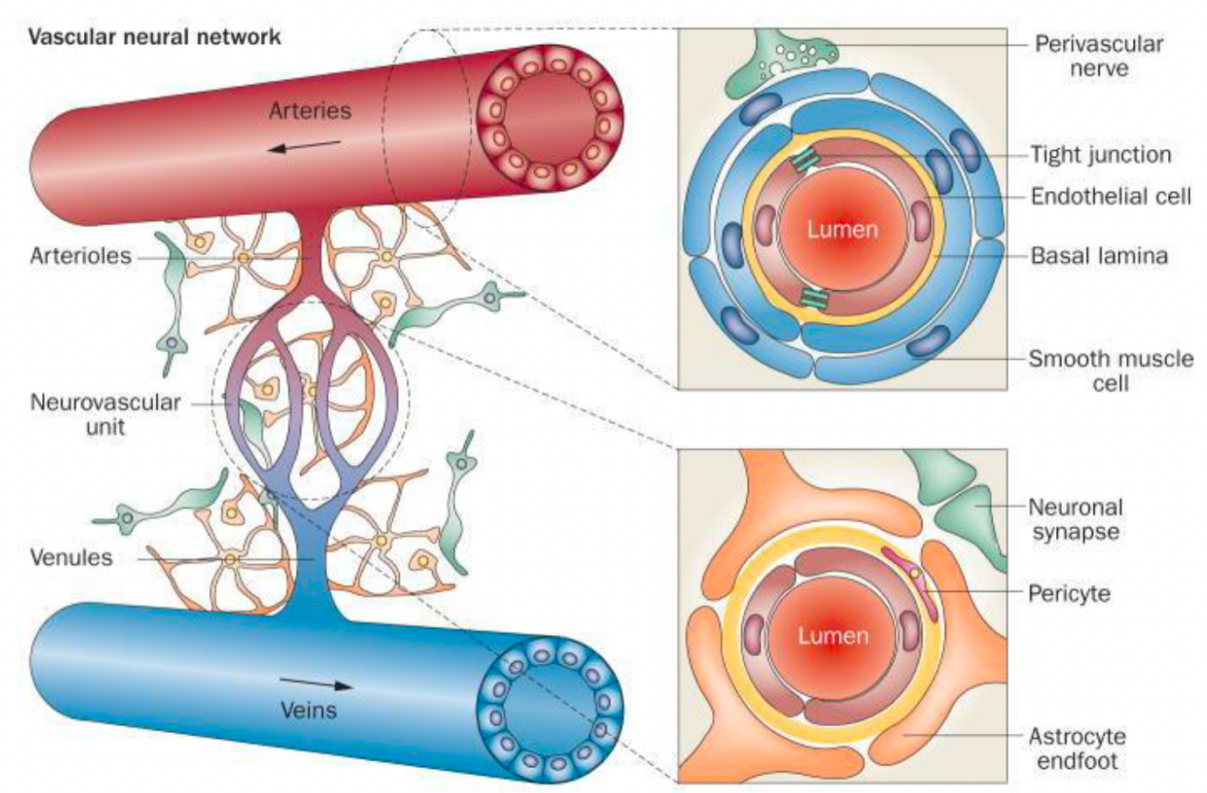


Figure I2. 6. Réseau vasculaire et unité neurovasculaire

Le réseau vasculaire cérébral comprend toutes les cellules et les structures nécessaires pour maintenir le flux sanguin cérébral. Il est constitué des artères (cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales), des nerfs périvasculaires, des fibroblastes, des cellules du système immunitaire (microglies), ainsi que du rete vasorum et des veines. Il comprend également l'unité neurovasculaire, composée de capillaires, de péricytes et d'une lame basale entourée par les pieds astrocytaires. Ces astrocytes communiquent avec les neurones adjacents par échange de métabolites. D'après (Zhang *et al.,* 2012)

f) Les péricytes

Les péricytes sont considérés comme des cellules contractiles isolées et insérées dans la lame basale le long des capillaires. Dans le SNC, ils sont impliqués dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE), dans la régulation de l'entrée de cellules immunitaires et dans le contrôle du débit sanguin cérébral, mais ils régulent également la perméabilité des cellules endothéliales. Les péricytes partagent au-delà d'une capacité contractile, un marqueur protéique commun avec les CMLV, la SMA22α (Attwell *et al.* 2016). Les péricytes et les CMLV sont communément appelés les cellules murales.

g) La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est un terme utilisé pour décrire les propriétés uniques de la microvasculature du SNC (Daneman and Prat 2015). La BHE est une barrière formée par les cellules endothéliales (CE) des capillaires cérébraux et interagit avec les cellules murales et les cellules constituantes de l'unité neurovasculaire (*Figure I2.7*). Elle régule l'entrée et la sortie des ions et d'autres petites molécules (glucose, acides aminés, peptides, etc.), participant ainsi à l'homéostasie du SNC nécessaire à la protection de la fonction neuronale mais permettant également de protéger le SNC des toxines, pathogènes, molécules inflammatoires circulantes. Ces cellules endothéliales sont solidement reliées entre elles par des jonctions serrées limitant le flux paracellulaire et forçant ainsi la plupart des molécules à passer par transcytose. Les jonctions serrées sont constituées de protéines spécifiques, comme les occludines, les claudines, les Zonula Occludens (ZO), les molécules d'adhésion JAM, les MAGI (*membrane-associated guanylate kinase*), les PAR (*partitioning defective proteins*), et la protéine kinase dépendante du Ca2 + (CASK), permettant ainsi de réguler le flux dans l'endothélium cérébral (*Figure I2.7*). La présence de systèmes de transport spécifiques sur les membranes des cellules régule le trafic cellulaire permettant l'entrée des nutriments requis et la sortie des déchets. Enfin, la nature restrictive de cette barrière constitue un obstacle à l'administration de traitements ce qui amène les scientifiques à concevoir de nouvelles méthodes permettant de « bypasser » ou moduler cette BHE (Sethi *et al.* 2022).

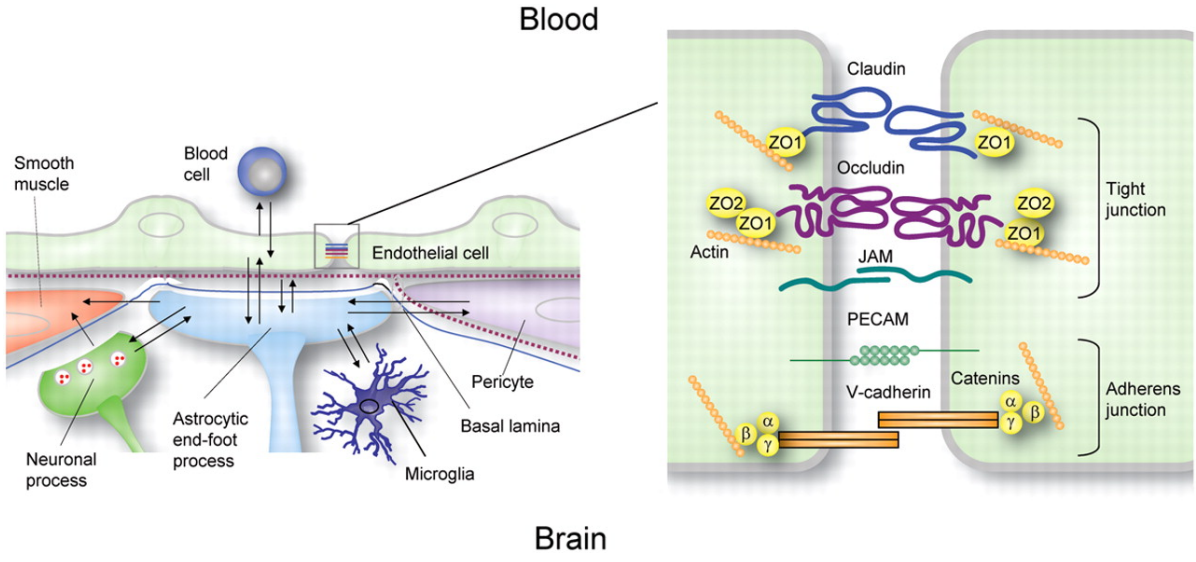


Figure I2. 7. Structure de la BHE et des jonctions serrées

D'après (Benarroch, 2012)

III.2. Physiopathologie de l'AAC

III.2.1. *Définition et Épidémiologie*

L'Angiopathie Amyloïde Cérébrale (AAC) est caractérisée par une accumulation de dépôts amyloïdes à l'intérieur et autour de la paroi des vaisseaux cérébraux de petits et moyens calibres avec une atteinte préférentielle des artères leptomeningées et corticales, ainsi que des capillaires (Gatti *et al.* 2020; Smith and Greenberg 2009). La pathogenèse de l'AAC reste peu connue, bien qu'il soit admis que dans la plupart des cas, cette accumulation est due à une production anormale ou une moindre efficacité dans l'élimination des peptides Aβ (*Figure I2.8*). Cette accumulation de peptides Aβ conduit à une altération de l'intégrité de la paroi due à une dégénérescence des cellules pariétales et plus précisément des CMLV, ayant pour conséquence une modification du flux sanguin (hypoperfusion), des accidents vasculaires de type micro-hémorragiques, tous deux impliqués dans le déclin des fonctions cognitives (Frangione *et al.* 2001).

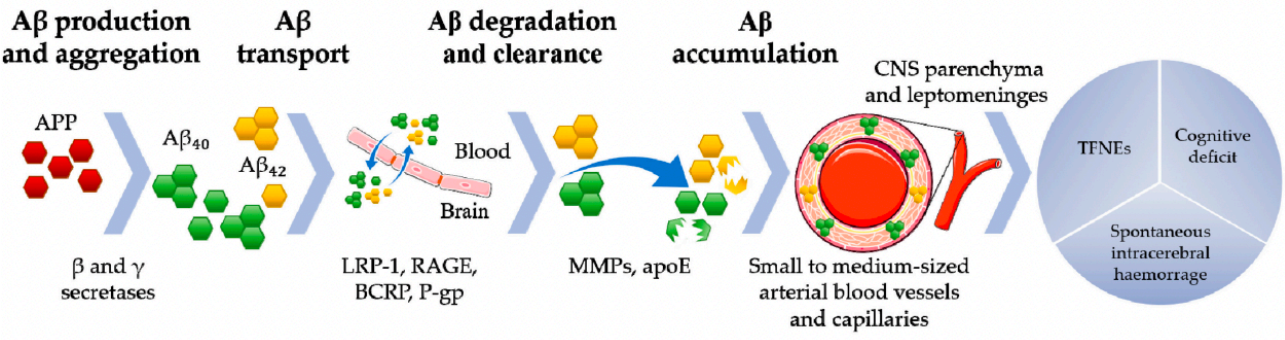


Figure I2. 8. De la production du peptide à l'AAC

L'APP est clivée par la voie amyloïdogénique par les sécrétases β et γ pour former principalement les peptides $A\beta_{1\text{-}40}$ et $A\beta_{1\text{-}42}$. $A\beta_{1\text{-}40}$ est le principal peptide associé à l'AAC. Ces peptides sont transportés à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) par des récepteurs membranaires et des transporteurs (par exemple, la protéine 1 apparentée au récepteur des lipoprotéines de faible densité, LRP-1 ; le récepteur des produits finaux de glycation avancée, RAGE ; la protéine de résistance au cancer du sein, BCRP ; la glycoprotéine de perméabilité, P-gp) et dégradés par des enzymes spécifiques, telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP) et l'apolipoprotéine E (ApoE). L'accumulation de dépôts amyloïdes dans les parois des artères leptoméningées et corticales de petit et moyen calibre peut résulter d'une production accrue ou d'un transport et d'une dégradation altérés des peptides Aβ. Cette voie pathologique peut entraîner une hémorragie intracérébrale spontanée, un déclin cognitif et des événements neurologiques focaux transitoires (TFNEs).D'après (Gatti *et al*., 2020)

La prévalence et l'incidence de l'AAC sont difficiles à chiffrer car le diagnostic est établi post-mortem par identification de dépôts amyloïdes dans les vaisseaux cérébraux, mais des estimations sont faites par autopsie et sur la base des marqueurs d'hémorragies intracrâniennes par IRM (principal signe clinique de l'AAC). Ces AAC, bien que très fréquemment associées à la maladie d'Alzheimer (chez 50 à 80% des patients, la prévalence augmentant avec l'âge et l'avancement de la maladie), se retrouvent également chez 10 à 50% des personnes âgées (60-65ans) sans maladie d'Alzheimer associée (Jellinger 2002; Jäkel *et al.* 2022). On estime également que l'AAC est la cause d'environ 20% de toutes les hémorragies intracrâniennes chez les patients âgés de plus de 60 ans et jusqu'à 50% des hémorragies intracrâniennes chez les patients de plus de 70 ans (Jäkel *et al.* 2022).

Le principal facteur de risque de l'AAC sporadique est le vieillissement, qui au travers d'une réduction d'efficacité des mécanismes de clairance et de drainage périvasculaire favorise l'accumulation de peptide Aβ. D'autres facteurs de risques de l'AAC ont été identifiés, tels que l'hypertension artérielle, les traitements anticoagulants/antiplaquettaires ou les immunothérapies anti-Aβ (Yamada 2015).

Des facteurs de risques génétiques pour l'AAC sporadiques sont également proposés, dont certains tels que le gène ApoE est commun avec la MA. L'expression de l'allèle ApoE3 est protecteur dans les deux pathologies, en revanche l'expression de l'ApoE2 ou 4, qui sont moins favorables à la clairance du peptide Aβ, constituent respectivement des facteurs de risques dans les AAC capillaires et vasculaires (Yamada 2015). Il est intéressant de noter que l'ApoE2 est un facteur de risque hémorragique dans l'AAC alors qu'il est protecteur dans la MA. D'autres facteurs de risques génétiques tels que des modifications géniques du TGF-β1, de la néprilysine, de LRP1 ou encore de l'ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*), ont été identifiés.

III.2.2. *Types d'AAC et sévérité*

On distingue deux types d'AAC selon le type de vaisseaux touchés : l'AAC capillaire dite de type I, caractérisée par une accumulation de peptide amyloïde autour des capillaires cérébraux et l'AAC vasculaire dite de type II, caractérisée par dépôts amyloïdes progressifs dans la média des artères, remplaçant au fur et à mesure les couches de CMLV (Gatti *et al.* 2020; Thal *et al.* 2002). Ces deux types d'AAC se distinguent également par la composition des dépôts amyloïdes. Dans les AAC capillaires tout comme pour les dépôts parenchymateux de la MA, les dépôts amyloïdes sont principalement constitués de peptide $A\beta_{1-42}$, tandis que les dépôts retrouvés dans les AAC vasculaires sont majoritairement constitués de peptides $A\beta_{1-40}$ (Miller *et al.* 1993). Quant à l'origine du peptide amyloïde, dans les AAC capillaires, il provient principalement du peptide $A\beta_{1-42}$ produit dans le parenchyme cérébral alors que dans les AAC vasculaires on retrouve du $A\beta_{1-40}$ produit dans le parenchyme et qui a passé la BHE mais également du peptide produit par les CMLV elles mêmes exposées au peptide $A\beta_{1-40}$.

Le diagnostic de l'AAC tout comme celui de la MA ne peut être certain que par autopsie post-mortem mais un diagnostic probable peut être établit par différentes techniques associées à l'IRM afin de détecter des microhémorragies ou des ARIA (*Amyloide-related imaging abnormalities*) (Greenberg *et al.* 2020; Haller *et al.* 2018).

Trois degrés de sévérité permettent de classifier les deux types d'AAC : légère, modérée et sévère (*Figure I2.9*) (Thal *et al.* 2008). Pour les AAC capillaires légères à modérées on observe des dépôts amyloïdes autour des capillaires qui progressivement conduisent à une occlusion du capillaire dans les AAC sévères. Tandis que les paramètres définissant la sévérité des AAC vasculaires sont plus précis. En effet, l'AAC légère est caractérisée par de faibles dépôts amyloïdes au niveau de la membrane basale entre la média et l'adventice et à quelques couches de CMLV. L'AAC modérée, est définie par la dégénérescence des CMLV et par de plus grands dépôts amyloïdes dans la média remplaçant au fur et à mesure les couches de CMLV, où aucune altération de la structure vasculaire n'est encore observée. L'ACC sévère, quant à elle, présente, en plus d'une dégénérescence des CMLV, des altérations vasculaires comme un amincissement de la paroi, des hémorragies et des nécroses fibrinoïdes.

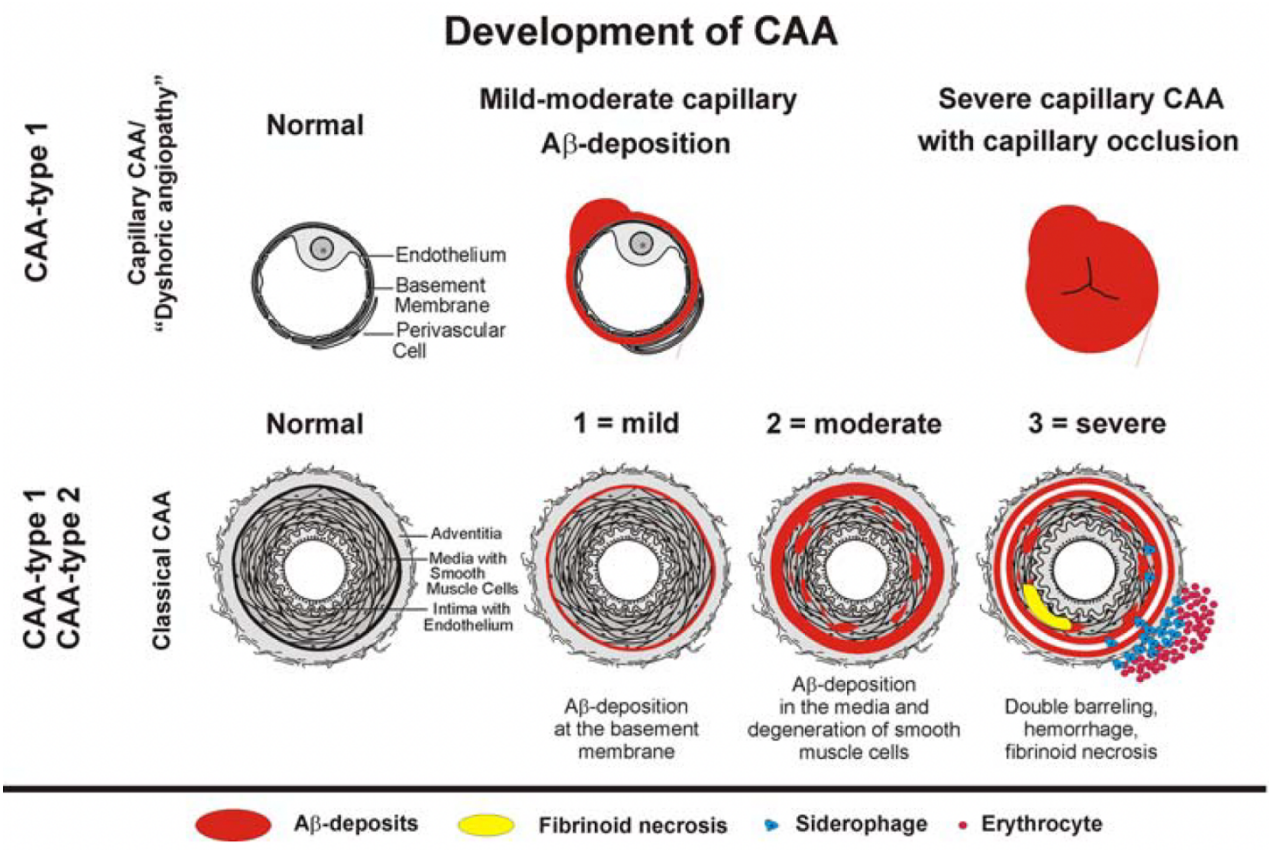


Figure I2. 9.Différents types d'AAC et sévérité

L'AAC de type 1, est caractérisée par des dépôts amyloïdes autour de la membrane basale et conduisent dans les cas sévères, à une occlusion capillaire et à des perturbations du flux sanguin. L'AAC de type 2 est définie au stade 1 par des dépôts amyloïdes atteignant la membrane basale. Au stade 2, ces dépôts atteignent la média où ils entrainent une dégénérescence des CMLV. Dans les cas sévères (stade 3), ces dépôts conduisent à des altérations vasculaires et des accidents vasculaires comme des hémorragies. D'après (Thal *et al.,* 2008)

III.2.3. *Formes familiales des AAC*

L'AAC est un facteur de risque important d'accident vasculaire cérébral, de déclin cognitif, ainsi que de divers troubles neurocomportementaux et neuropsychiatriques. Bien que la majorité des cas d'AAC soient sporadiques, il existe plusieurs formes familiales héréditaires qui se manifestent sous forme de troubles familiaux monogéniques et sont caractérisées par le développement précoce d'accidents vasculaires hémorragiques ainsi que de démences et une évolution plus sévère par rapport à la forme sporadique. Diverses mutations du gène APP près des sites de clivage des β- et γ-sécrétases, ou dans la séquence codante pour le peptide Aβ sont à l'origine des AAC familiales ou des formes familiales de la MA (*Figure I2.10*). Les mutations London ou Florida retrouvées près des sites de clivages enzymatiques ont tendance à augmenter les niveaux relatifs ou totaux de peptides $A\beta_{1\text{-}40}$ ou

$A\beta_{1-42}$ causant la formation de plaques séniles associées à la MA précoce tandis que les mutations telles que les Dutch, Flemish, Iowa, Italian ou Piedmont, affectant la séquence codante du peptide Aβ, produisent un peptide muté et provoquent les formes d'AAC familiales les plus sévères (Biffi 2022).

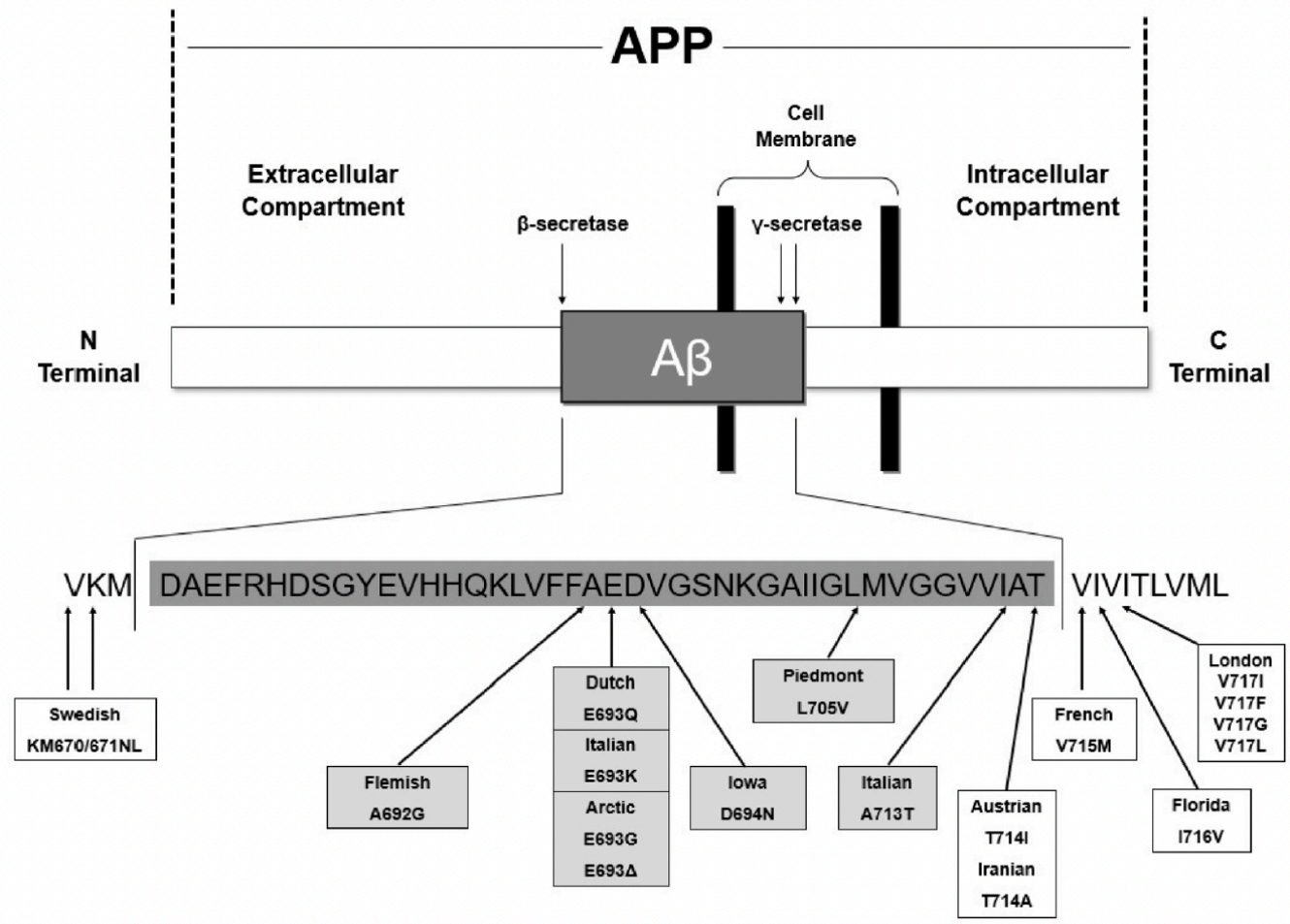


Figure I2. 10. Représentation schématique des mutations de l'APP associées aux formes familiales d'AAC

Les mutations présentées dans un fond gris causent les formes les plus sévères d'AAC familiales car elles touchent la séquence codante du peptide Aβ et produisent des peptides mutés dont la toxicité et la capacité d'agrégation sont amplifiées. D'après (Biffi, 2022)

Chacune de ces mutations induit des effets différents, tels qu'une modification du clivage de l'APP, une augmentation de la production du peptide Aβ ou encore une modification des propriétés d'agrégation du peptide augmentant ainsi sa toxicité. Par exemple, le peptide produit par la mutation Dutch est l'espèce Aβ la plus toxique puisqu'il s'accumule presque instantanément, tandis que la mutation Flemish produit un peptide Aβ

qui s'agrège bien plus lentement que le peptide sauvage favorisant la présence de formes oligomériques plus toxiques (Kumar-Singh *et al.* 2002). Enfin, le peptide Italian a une capacité augmentée à produire des fibrilles, de manière similaire au peptide Dutch. Les mutations Dutch et Flemish conduisent aussi à une augmentation de la production de peptide Aβ en raison d'une augmentation du clivage de la β-sécrétase (Farzan *et al.* 2000). De plus, ces trois mutations produisent des peptides qui sont résistants à la dégradation protéolytique par la Néprilysine (Tsubuki *et al.* 2003). L'ensemble de ces mutations induisent une dégénérescence des CMLV cérébrales et des accidents vasculaires cérébraux. *In fine*, quel que soit la nature de ces mutations familiales elles ont tendance à accroitre les symptômes de l'AAC, notamment les hémorragies et les infarctus cérébraux. Il est à noter que les études *in vitro* sur les AAC sporadiques utilisent, à tort, le peptide $A\beta_{1-40}$Dutch en raison de sa toxicité et de ses effets rapides. En effet, notre laboratoire a démontré que certains mécanismes impliqués dans la dégénérescence de CMLV induit par le peptide $A\beta_{1-40}$Dutch étaient différents de ceux induit par le peptide $A\beta_{1-40}$, impliqué dans les AAC sporadiques (Blaise *et al.* 2012).

Les mutations retrouvées en dehors de la région Aβ conduisent principalement au développement de la MA, mais peuvent également provoquer des AAC. On peut citer les mutations Indiana, Florida et London près du site de la γ-sécrétase qui augmentent le clivage enzymatique de l'APP induisant préférentiellement la production de peptide $A\beta_{1-42}$, forme majoritaire des plaques parenchymateuses, résultant en une augmentation du rapport $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ (Tamaoka *et al.* 1994). La double mutation Swedish près du site de clivage de la β-sécrétase, quant à elle, conduit à une augmentation des niveaux de peptide $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ (Haass *et al.* 1995). Cette mutation est d'ailleurs l'une des plus utilisées dans les modèles de souris transgéniques pour la MA. Parmi ces mutations en dehors de la région Aβ, seule la mutation London semble provoquer des AAC légères.

III.2.4. *Importance du ratio $A\beta_{1\text{-}40}$ /$A\beta_{1\text{-}42}$*

La principale différence dans la composition des dépôts amyloïdes formant les plaques retrouvées dans le parenchyme et celles des dépôts vasculaires est déterminée par le ratio $A\beta_{1\text{-}40}/A\beta_{1\text{-}42}$. Ce ratio est beaucoup plus élevé dans les dépôts vasculaires en comparaison aux plaques du parenchyme (Greenberg *et al.* 2020). En effet, le peptide $A\beta_{1\text{-}42}$ est majoritaire dans les plaques amyloïdes du parenchyme cérébral alors que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ est prédominant dans les dépôts retrouvés dans et autour des artères cérébrales (Miller *et al.* 1993). Cependant le mécanisme à l'origine de cette distribution préférentielle n'a pas encore été clairement élucidé. Certains suggèrent que les peptides Aβ retrouvés dans les dépôts vasculaires sont issus d'une source différente et seraient générés localement dans les CMLV (Wisniewski and Wegiel 1994; Frackowiak *et al.* 1994). Mais d'autres études *in vivo*, proposent que la source soit *in fine* la même, et que les peptides Aβ produit par les neurones seraient transportés et s'accumuleraient dans les vaisseaux loin de leur site de production (Calhoun *et al.* 1999; Herzig *et al.* 2004). Cela est en accord avec la nature du $A\beta_{1\text{-}40}$ et avec le fait que ce soit le peptide majoritaire dans les dépôts vasculaires, puisqu'il est beaucoup plus soluble que le $A\beta_{1\text{-}42}$ (peu soluble et formant des fibrilles plus rapidement) et peut diffuser grâce au drainage périvasculaire. Par ailleurs, une étude suggère que le dosage sanguin du ratio $A\beta_{1\text{-}40}/A\beta_{1\text{-}42}$ prédit avec une précision comprise entre 71% et 81% (en accord avec les résultats d'imagerie PET) la formation de dépôts amyloïdes cérébraux et le développement d'amyloïdoses cérébrales chez des personnes à risques pour la MA (Vergallo *et al.* 2019). Ainsi, le ratio $A\beta_{1\text{-}40}/A\beta_{1\text{-}42}$ est actuellement parmi les biomarqueurs sanguins les plus étudiés et fait partie des principales pistes de recherche pour le diagnostic de la MA et des AAC.

IV. AAC et dysfonctionnement vasculaire

Les microhémorragies cérébrales sont une complication majeure de l'AAC à un stade tardif, et résultent d'une altération des vaisseaux sanguins par les dépôts amyloïdes. Cependant, bien avant l'apparition de ces microhémorragies l'AAC peut avoir des effets sur la réactivité vasculaire et sur les acteurs qui la régulent, conduisant au développement d'ischémies cérébrales.

IV.1. Effets des peptides Aβ sur les cellules pariétales et leur environnement

De nombreuses études se sont intéressées aux effets des peptides Aβ sur les cellules de la paroi vasculaire : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires.

IV.1.1. *Cellules endothéliales*

Au niveau des cellules endothéliales (CE), les peptides Aβ peuvent induire des modifications morphologiques affectant leur perméabilité et déclenchant leur apoptose (Gonzalez-Velasquez *et al.* 2008; Miravalle *et al.* 2000). En effet, l'interaction de formes oligomériques $A\beta_{1\text{-}40}$ avec les récepteurs de la mort cellulaire TRAIL (*Tumor necrosis factor related Apoptosis Inducing Ligand*), DR4 etDR5 (*Death Receptor 4 and 5*) entraine l'apoptose des cellules endothéliales dépendantes des caspases 8 et 9. Les peptides Aβ peuvent également provoquer la sécrétion de médiateurs de l'inflammation modifiant l'expression des molécules d'adhésion (Suo *et al.* 1998) et favorisant l'infiltration de monocytes et macrophages (Vukic *et al.* 2009), le tout affectant la perméabilité de la BHE.

IV.1.2. *Cellules musculaires lisses vasculaires*

Dans le contexte de l'AAC, l'accumulation de peptides Aβ dans la membrane basale a été associée à la dégénérescence des cellules musculaires lisses vasculaires voisines. En effet, il a été démontré *in vitro* que les peptides Aβ réduisent les propriétés d'adhérence des CMLV ce qui conduit à la dégénérescence des CMLV mais aussi à une destruction de la lame basale (Mok *et al.* 2006). De plus, les peptides Aβ sous forme oligomérique induisent plusieurs changements morphologiques dans les CMLV, tels que le rétrécissement des corps

cellulaires, la perturbation du réseau d'actine intracellulaire, ainsi que la condensation et la fragmentation des noyaux cellulaires (Davis *et al.* 1999). Ces modifications s'accompagnent également d'altérations biochimiques dans les CMLV menant à l'apoptose des CMLV, notamment une activation de caspases-8 et -9 (Fossati *et al.* 2010). De plus, les dépôts amyloïdes vasculaires s'autoamplifient car ils conduisent les CMLV à produire elles-mêmes des peptides Aβ, favorisant ainsi l'augmentation des plaques et les effets délétères du peptide (Wisniewski and Wegiel 1994). En effet, comme l'a mis en évidence une étude *in vitro*, les CMLV expriment l'APP, ce qui permet la production de peptide Aβ soluble en réponse au peptide lui-même (Davis-Salinas *et al.* 1995). Enfin, les peptides Aβ joueraient un rôle dans l'établissement d'un contexte inflammatoire vasculaire que ce soit au niveau des cellules endothéliales (Suo *et al.* 1998) ou au niveau des CMLV. En effet, l'équipe d'Isabelle Limon a montré que la réponse inflammatoire des CMLV est exacerbée lorsque les cellules sont exposées préalablement au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ (Vromman *et al.* 2013b).

IV.1.3. *Perturbation de la MEC et de la BHE*

Comme expliqué précédemment, les peptides Aβ affectent l'intégrité des CE et des CMLV, entrainant de nombreuses altérations vasculaires. Ces anomalies sont amplifiées par une dégradation de la matrice extracellulaire et des cellules la paroi vasculaire. En effet, il a été démontré *in vivo* que l'activité et l'expression protéique de la MMP-9 (*métalloprotéinase matricielle 9*), enzyme impliquée de la dégradation de la MEC, sont augmentées dans les cellules endothéliales par le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, mais également que la MMP-9 colocalise *in vivo* avec les dépôts amyloïdes vasculaires et les hémorragies à un stade avancée de la pathologie, confirmant le rôle du peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ dans l'induction de l'activité MMP-9 contribuant aux AAC (Lee *et al.* 2005). Les cellules endothéliales en culture exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ peuvent également sécréter de la MMP-2. Quant aux CMLV, notre laboratoire a mis en évidence que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ induit l'expression de la MMP-2 et augmente son activation via l'expression de MT1-MMP et la relocalisation membranaire de TIMP2 (Blaise *et al.* 2012).

Le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ peut également endommager la BHE, par exemple en interagissant avec les récepteurs RAGE et en entrainant la production de MMP-2 altérant l'intégrité de la BHE (Du *et al.* 2012). De plus, dans des CE de rongeurs et humaines, le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$

augmente leur perméabilité suite à une diminution de l'expression des protéines d'adhésions et des jonctions serrées ce qui, *in fine,* permet au peptide de diffuser à travers la BHE (Tai *et al.* 2010). La rupture de la BHE contribue à la neurodégénérescence en perturbant le transport des nutriments et autres éléments essentiels aux neurones. Ces défauts de la BHE sont associés à une réduction de la cognition dans l'AAC (Bell and Zlokovic 2009).

IV.2. Altération du débit sanguin cérébral par les dépôts amyloïdes

La réactivité cérébrovasculaire est un indicateur intrinsèque de la capacité du vaisseau à se contracter ou à se dilater en réponse à un stimulus vasoactif, afin de maintenir un débit sanguin constant ou adapté aux besoins, permettant de maintenir les fonctions neuronales. Cela est rendu possible grâce à un système d'autorégulation du débit sanguin cérébral (*présenté dans la partie suivante*). Les anomalies vasculaires sont l'un des premiers signes cliniques dans les MA ou les AAC sporadiques et familiales. Il a été montré *in vivo*, une corrélation entre la diminution du débit sanguin cérébral et la sévérité des symptômes de démence, témoignant d'une contribution potentielle des altérations de débit sanguin cérébral (*Cerebral Blood Flow ou* ***CBF***) dans le déclin cognitif associé à la MA et aux AAC (Bracko *et al.* 2020). Plus précisément, un grand nombre de données d'imagerie clinique et d'études épidémiologiques, ainsi que pharmacologiques indiquent que les changements vasculaires jouent un rôle majeur dans la pathogénèse de l'Alzheimer précoce (de la Torre 2004; Bell and Zlokovic 2009).

En effet, l'imagerie par résonance magnétique (*IRM*), les mesures Doppler transcrâniennes et la tomographie par émission de photons uniques (*SPECT*) chez l'Homme ont établi que le débit sanguin cérébral au repos est significativement réduit chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ce qui pourrait être un événement précoce dans la pathogenèse de la MA. L'IRM par marquage de spins artériels (*Spin Arterial Labeling MRI*) a démontré une hypoperfusion cérébrale chez les patients atteints de la MA (Johnson *et al.* 2005). Enfin, des études d'IRM fonctionnelle (*IRMf*) utilisant le contraste BOLD (*blood oxygenation level dependent*) pour mesurer les augmentations du CBF pendant la réalisation d'une tâche permettant d'évaluer la mémoire épisodique, ont établi qu'il existe un retard dans l'adaptation du CBF chez les patients atteints d'un trouble cognitif léger (*mild cognitive*

impairement ou ***MCI***) et que ce retard du signal BOLD en IRMf devient plus prononcé chez les patients atteints de la MA (Rombouts *et al.* 2005). Cela suggère que les réductions du CBF sont présentes aux premiers stades du développement de la MA, car le MCI est considéré comme un état de transition potentiel entre le vieillissement normal et la démence.

Concernant les études épidémiologiques, les données issues d'une grande étude populationnelle (1 730 participants de l'étude de Rotterdam) ont montré que des vitesses de CBF plus élevées, mesurées à l'aide de la transcranial doppler flowmetry, étaient associées à une prévalence plus faible du déclin cognitif (Ruitenberg *et al.* 2005). Par ailleurs, les images IRM ont montré moins d'atrophie de l'hippocampe et de l'amygdale chez les patients âgés ayant un CBF plus élevé. De plus, cette étude suggère qu'un CBF réduit peut contribuer précocement à la progression de la démence, avant même le déclin cognitif et l'atrophie cérébrale. Une autre étude examinant la conversion du MCI en MA à l'aide de l'imagerie SPECT a montré que des réductions significatives du CBF dans le lobule pariétal, le gyrus angulaire et le précuneus (gyrus de la face interne du lobe pariétal du cortex cérébral) des patients atteints de MCI pouvait avoir une forte valeur prédictive de transition vers la MA (Hirao *et al.* 2005). Ces données suggèrent également que la réduction régionale du CBF, conséquence de l'accumulation de peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ dans les artères cérébrales (AAC), est un événement précoce dans la MA. En effet, dans les AAC l'hypoperfusion conduisant aux ischémies (Chung *et al.* 2009) ou les microhémorragies (Pinho *et al.* 2021), résultent d'altérations du débit sanguin cérébral.

L'ensemble des données d'imagerie présentant des altérations du débit sanguin cérébral, suppose une altération de la réactivité vasculaire. Certaines études mettent en évidence un effet vasoconstricteur du peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ lorsqu'il est sous forme soluble monomérique ou oligomérique (Dietrich *et al.* 2010; Paris *et al.* 2003; Niwa *et al.* 2001), alors que d'autres montrent qu'à des stades sévères d'AAC, le peptide Aβ sous sa forme insoluble et fibrillaire altère de manière plus prononcée la fonction vasculaire, en réduisant la vasodilatation (Zipfel *et al.* 2009; Christie *et al.* 2001). Cependant les mécanismes moléculaires et les types cellulaires impliquées dans cette altération de la réactivité vasculaire reste peu étudiés.

IV.3. Régulation de la tonicité vasculaire en condition physiologique

Compte tenu d'une capacité de stockage des nutriments limitée et des grands besoins métaboliques du cerveau, la régulation du débit sanguin cérébral (CBF) est critique pour le maintien d'un approvisionnement constant en nutriments et en oxygène. Ainsi, une réduction du CBF conduit très rapidement à la perte de conscience (Van Lieshout *et al.* 2003) et si elle perdure cela peut engendrer des dommages cérébraux irréversibles (Smith *et al.* 2011). Le débit sanguin cérébral est sensible à plusieurs paramètres environnementaux, dont la Pa_{CO2} et la Pa_{O2}, mais est surtout sensible à la pression artérielle. En 1895, Bayliss, Hill et Gulland ont conclu dans The Journal of Physiology que « dans toutes les conditions physiologiques, une augmentation de la pression artérielle accélère le flux sanguin dans le cerveau, et une baisse le ralentit » (Bayliss *et al.* 1895). Ce concept a prévalu jusqu'à ce que Lassen en 1959, construise à partir de sept études différentes, un graphique reliant la pression artérielle moyenne (PAM) et le débit sanguin cérébral (CBF) (Lassen 1959). Ce graphique a révélé une zone en plateau dans laquelle le débit sanguin cérébral semble être complètement stable sur un intervalle relativement large de pressions artérielles (50-150 mmHg) (*Figure I2.11*) (Madhok *et al.* 2018). Une telle relation physiologique nécessite des ajustements réflexes de la résistance cérébrovasculaire coordonnés aux changements de la pression artérielle, ce mécanisme porte le nom d'« *autorégulation cérébrale* ». Depuis une cinquante d'années, les limites, paramètres et mécanismes moléculaires de cette zone d'autorégulation sont souvent sujets à controverse, mais le principe reste inchangé (Willie *et al.* 2014).

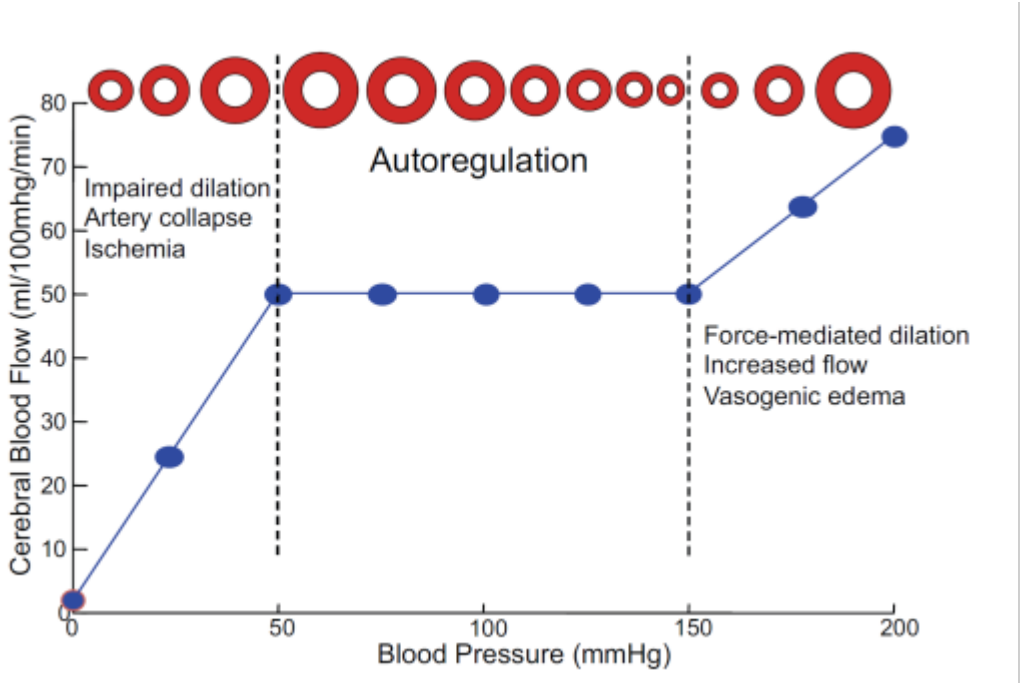


Figure I2. 11. Graphique représentant l'autorégulation du débit sanguin cérébral en fonction de la pression

D'après (Madhok *et al.* 2018)

L'autorégulation peut donc être définie comme la capacité d'un vaisseau à maintenir un CBF constant face à des variations de pression artérielle moyenne physiologiques (50 et 150mmHg), et cela en faisant varier sa résistance en se contractant ou en se dilatant (*Figure I2.11*). Ainsi le débit sanguin cérébral est inversement proportionnel à la résistance exercée par les vaisseaux cérébraux (Paulson *et al.* 1990). Il peut arriver qu'en condition pathologique, l'autorégulation ne soit plus assurée, ce qui signifie que lorsque l'on s'éloigne des valeurs de PAM physiologiques le vaisseau n'est plus capable de réagir en réponse aux signaux environnementaux et devient tributaire des forces mécaniques. Par exemple, si la PAM passe au-dessus de la valeur seuil (>150 mmHg), le vaisseau ne pouvant plus se contracter, on aura alors une augmentation du débit conduisant à une dilatation mécanique exercée par le flux (*Figure I2.11*). Ceci peut déclencher les micro-hémorragies observées dans les AAC. De la même manière, si la PAM passe en dessous de la valeur seuil (<50 mmHg), les cellules n'étant plus capables de se dilater peuvent collapser et provoquer une hypoperfusion responsable d'ischémies cérébrales, souvent associées à la maladie d'Alzheimer.

Le tonus vasculaire est donc un élément essentiel de la régulation du débit sanguin cérébral. Le principal régulateur de ce tonus vasculaire est la cellule musculaire lisse, dont l'état de contractilité dépend d'un équilibre entre deux seconds messagers : AMPc et calcium, respectivement pro-dilatateur et pro-contractile. Ces deux seconds messagers modulent l'état de phosphorylation de la MLC_{20}, qui est l'élément déterminant final de l'état contractile de la cellule. Ainsi le tonus vasculaire et l'état de contractilité des CMLV sont à l'intersection entre deux voies de signalisation (*présentées dans l'introduction générales partie IV*) finement régulées par divers acteurs moléculaires intracellulaires (AC, PDE, AMPc, Ca^{2+}, MLCK, MLCP, etc.), extracellulaires (ligands activateurs des RCPG) et membranaires (canaux calciques et RCPG) (*Figure I2.12*).

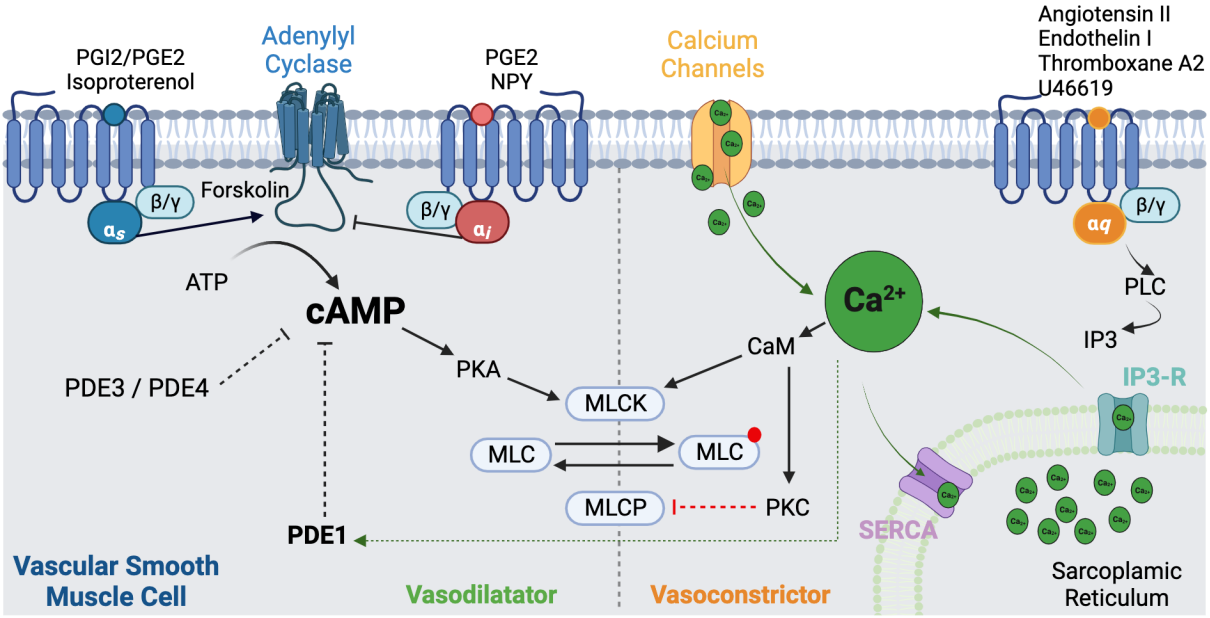


Figure I2. 12. Régulation de la contractilité des CMLV

Dans les AAC, il est certes acquis que le tonus vasculaire est altéré, et que les CMLV régulant ce tonus vasculaire sont elles aussi altérées par les peptides Aβ (*voir partie IV.1.2*). Cependant très peu d'études ont été menées pour expliquer l'effet du peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ sur les CMLV dans le cadre des altérations de la contractilité et encore moins sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la tonicité vasculaire. Pourtant, dans les AAC comme dans la MA, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de la tonicité vasculaire par le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

OBJECTIFS

L'Angiopathie Amyloïde Cérébrale et la Maladie d'Alzheimer sont souvent associées chez les patients âgés, ces pathologies résultant d'une accumulation de peptides Aβ. La nature des peptides composant ces dépôts et leurs localisations diffèrent, mais les effets vasculaires et le déclin cognitif associés sont similaires. De nombreuses études et données cliniques suggèrent même que l'AAC et les altérations vasculaires seraient à l'origine de la MA. Si de nombreuses études suggèrent qu'une réduction du débit sanguin cérébral (CBF) est associée au déclin cognitif observé dans la MA et l'AAC, et que cette réduction s'explique par une altération de la réactivité vasculaire (causée par l'accumulation de peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ dans les artères) ; les mécanismes moléculaires à l'origine de cette altération du CBF sont peu étudiés. En effet, le tonus vasculaire est régulé par l'état de contractilité des CMLV, lui-même dépendant de l'état de phosphorylation de la MLC_{20} qui est sous le contrôle d'un équilibre entre deux seconds messagers : l'AMPc et le calcium, respectivement pro-dilatateur et pro-contractile. Or les CMLV exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, sont dans un premier temps peu affectées (AAC légère à modérée) puis avec l'accumulation du peptide Aβ finissent par dégénérer complétement (AAC sévère), altérant ainsi le tonus vasculaire et conduisant à des microhémorragies ou hypoperfusions.

L'objectif principal de cette étude est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de la vasoréactivité dans les AAC et à fortiori dans la MA, afin de mieux comprendre les premiers symptômes de ces deux pathologies et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Plus précisément, si nous identifions les acteurs moléculaires à l'origine de l'altération de la contractilité, nous pourrions limiter les altérations du débit sanguin cérébral afin de i) améliorer l'approvisionnement en nutriments et oxygène des neurones, ii) réduire les microhémorragies et/ou les ischémies et iii) ralentir la progression du déclin cognitif résultant. L'hypothèse principale de cette étude est que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ altèrerait la contractilité des CMLV qui *in fine* altérerait la réactivité vasculaire. Dans ce but, nous avons évalué l'effet du peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ sur les principaux acteurs des voies de signalisations (AMPc et calcium) impliquées dans la capacité contractile et dilatatoire des CMLV puis sur la réactivité *ex vivo* d'artères cérébrales.

Pour étudier l'effet exercé par le peptide $A\beta_{1-40}$ sur les capacités contractiles et dilatatoires des CMLV, nous avons à l'aide de divers agents vasoconstricteurs ou vasodilatateurs et d'inhibiteurs pharmacologiques, suivi *in vitro* (sur des cultures primaires de CMLV aortiques et cérébrovasculaires traitées ou non au peptide $A\beta_{1-40}$) les dynamiques d'AMPc par imagerie de biosenseur ($^{T}EPAC^{VV}$) et de calcium par utilisation de la sonde chimique Fura-2AM. Nous avons également évalué l'effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur l'expression génique des divers acteurs impliqués dans les voies de signalisations AMPc et calcique. Enfin nous avons étudié *ex vivo* les effets du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la réactivité vasculaire d'artères basilaires de rat par wire-myographie.

Les résultats présentés dans la suite de ce manuscrit vont nécessiter pour certains des expériences complémentaires ou des expériences supplémentaires et commencer la rédaction d'un article. Les résultats présentés ont nécessité de nombreuses mises au point de nouveaux protocoles expérimentaux que j'ai mis en place au laboratoire (Cultures primaires de CMLV cérébrales de rats avec l'aide de Bernard Brugg), mais également la mise en place d'un nouveau poste d'imagerie dédié à l'imagerie calcique (grâce à l'expertise de Pierre Vincent), mais également plusieurs mois passés à UMR-S 1180, « signalisation et physiopathologie cardiovasculaire » pour apprendre avec Boris Manoury la technique de wire-myographie et réaliser l'ensemble des acquisitions et analyses présentées.

RESULTATS

I. Effets du peptide amyloïde dans les CMLV Aortiques

I.1. Effet du peptide amyloïde sur la production d'AMPc

Afin de caractériser l'effet du peptide amyloïde sur l'intégration des signaux vasodilatateurs, nous avons suivi la dynamique de production d'AMPc à l'aide du biosenseur $^{T}EPAC^{VV}$ dans des cultures primaires de CMLV d'aorte de rats (rAo-VSMC) traitées avec 50µM de peptide $A\beta_{1-40}$ (CMLV $A\beta_{1-40}$ ou VSMC $A\beta_{1-40}$) ou non traitées (CMLV ou VSMC Ctrl) pendant 48h.

Nous utilisons en premier lieu la forskoline (un pan-activateur des adenylyls cyclases) afin d'évaluer si les mécanismes intracellulaires de production d'AMPc sont fonctionnels sans tenir compte de la signalisation RCPG ou de toute autre régulation en amont des cyclases. Dans les CMLV traitées au peptide $A\beta_{1-40}$, la production d'AMPc en réponse à la forskoline est diminuée par rapport aux cellules non traitées (CMLV Ctrl : 0,6275 ± 0,057 vs CMLV $A\beta_{1-40}$: 0,3966 ± 0,050), (*Figure R2.1A et B*). Cette diminution de production d'AMPc pourrait s'expliquer soit par une réduction de l'activité ou de l'expression des adenylyls cyclases soit par une augmentation de l'activité ou de l'expression des phosphodiestérases (PDE).

Pour évaluer l'activité cyclase, nous avons mesuré la vitesse de production d'AMPc. En effet, la mesure de pente de la production d'AMPc, en réponse à une faible dose de forskoline tout en inhibant les PDE avec de l'IBMX, est le reflet de l'activité cyclase des cellules (Vallin *et al.* 2018). La moyenne des pentes mesurées dans les CMLV $A\beta_{1-40}$ (0,7421 ± 0,2273) ne diffèrent pas des CMLV Ctrl (0,7750 ± 0,1942) (*Figure R2.1D*), indiquant que l'activité cyclase n'est pas modifiée par le traitement amyloïde. Cependant, pour une même activité cyclase, la pente de production d'AMPc sera d'autant plus importante que le biosenseur est peu exprimé dans les cellules, en raison de l'effet tampon du biosenseur. Aussi, il est impératif de comparer les vitesses de production d'AMPc entre cellules ayant le même niveau d'expression de biosenseur. Comme présenté sur la *figure R2.1E*, on observe que pour une même intensité de biosenseur (*i.e* même niveau d'expression), les valeurs de pente des cellules contrôles (*Figure R2.1E, croix bleues*) et des cellules traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ (*Figure R2.1E, croix roses*) sont similaires. Nous nous sommes également assurés que

le traitement au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ n'altérait pas les niveaux basal (Rbasal) et maximal (Rmax) d'AMPc, qui ont été mesurés sur N=28 ou 32 expériences indépendantes et aucune différence significative n'est observée entre les CMLV Ctrl et $A\beta_{1\text{-}40}$ (*Figure S 2*). Enfin, l'analyse par RT-qPCR de l'expression des transcrits codant les principales AC exprimées dans les CMLV ne montre aucune différence entre les cellules traitées et non traitées (Figure *R2*.1F).

Ces premiers résultats mettent en évidence que le peptide Aβ induit une diminution de la production d'AMPc en réponse à la forskoline. Cette diminution n'est pas la conséquence d'une réduction de l'activité ou de l'expression des adenylyl cyclases.

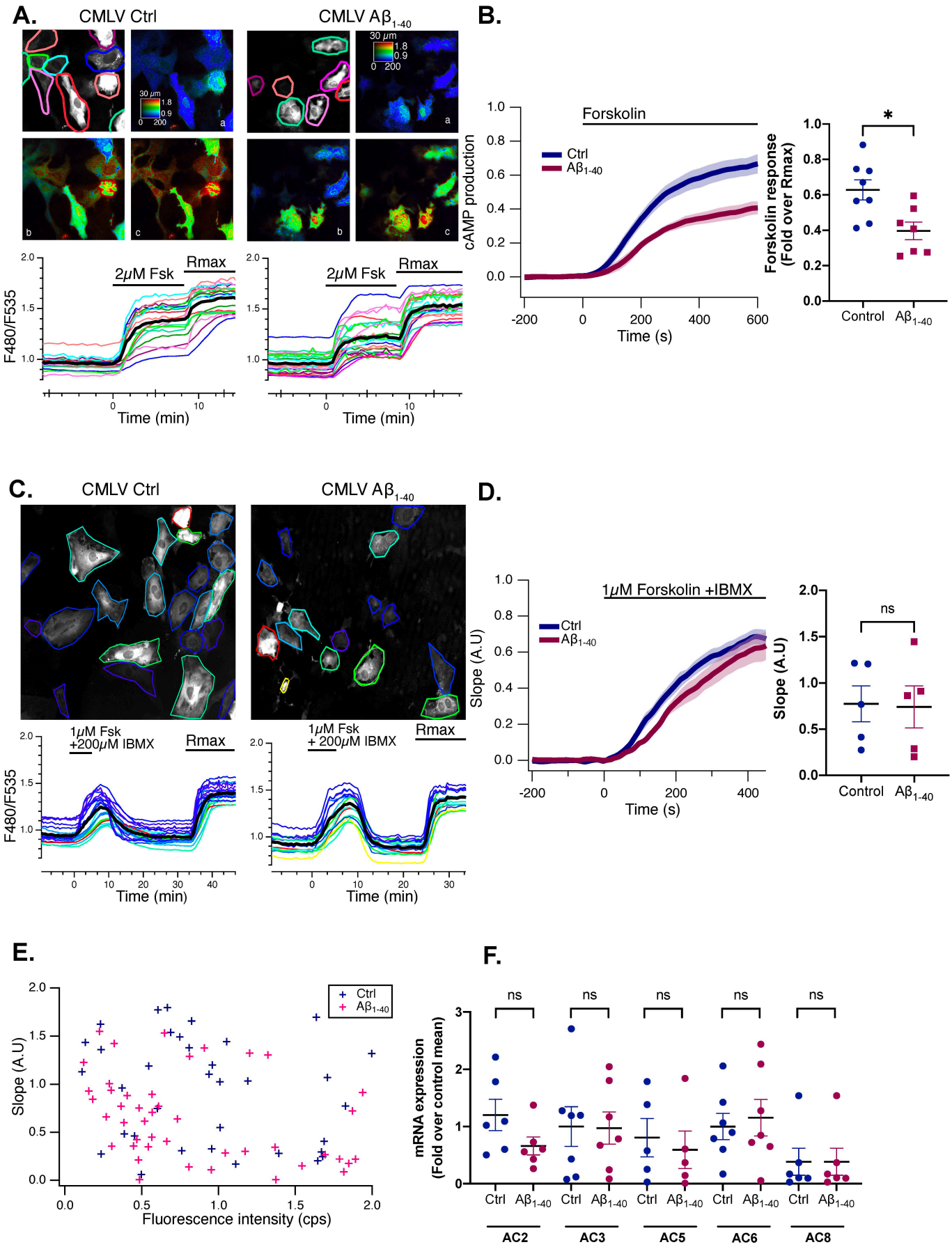

A.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
30 μm
1.8
0.9
0 200
a
b
c
2μM Fsk
Rmax
F480/F535
Time (min)
B.
Forskolin
Ctrl
Aβ1-40
cAMP production
Time (s)
Forskolin response (Fold over Rmax)
*
Control
Aβ1-40
C.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
1μM Fsk +200μM IBMX
Rmax
F480/F535
Time (min)
D.
1μM Forskolin +IBMX
Ctrl
Aβ1-40
Slope (A.U)
Time (s)
ns
Control
Aβ1-40
E.
Ctrl
Aβ1-40
Slope (A.U)
Fluorescence intensity (cps)
F.
mRNA expression (Fold over control mean)
ns
Ctrl
Aβ1-40
AC2
AC3
AC5
AC6
AC8

Figure R2. 1 Le traitement Aβ_{1-40} diminue la production d'AMPc dans les CMLV aortiques

Le niveau d'AMPc a été mesuré sur des CMLV contrôles (Ctrl) ou traitées au peptide Aβ_{1-40} (48h), après traitement à 2 µM de forskoline **(A)** ou 1 µM de forskoline + 200 µM d'IBMX **(C)**, en utilisant le biosenseur ^{T}EPAC^{VV}. **A et C, panneaux supérieurs** : l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 535 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F480/F535, indicatif de la concentration intracellulaire de [AMPc] (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement et (c), avec 12,5 µM de forskoline et 200 µM d'IBMX (Rmax, correspondant à la saturation du biosenseur). **A et C, panneaux inférieurs** : courbe des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (traces colorées). La trace noire représente la moyenne de toutes les cellules. **B et D, figure de gauche** : les traces moyennes en réponse à 2 µM de forskoline **(B)** ou 1 µM de forskoline + 200 µM d'IBMX **(D)** sont calculées à partir des traces moyennes de 8 et 4 expériences indépendantes respectivement. L'ombrage indique la SEM à 95 %. **B et D, figure de droite** : valeurs moyennes ± SEM (N = 5 à N = 8 expériences indépendantes) de la réponse en AMPc induite par le traitement à la forskoline **(B)** ou à la forskoline+IBMX **(D)**, exprimée comme une fraction du changement de Rmax. Chaque valeur représente une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour données non appariées. * : P < 0,05. **(E)** Graphique représentant la mesure de la pente en fonction de l'intensité de fluorescence du biosenseur pour chaque cellule sur N = 4 ou 8 expériences. **(F)** Expression relative des transcrits d'ARN messagers des principales AC des CMLV mesurée par RT-qPCR.

La forskoline est activateur direct des adenylyl cyclases mais ne relève pas de la réalité physiologique d'une cellule. C'est pourquoi nous avons évalué l'effet du peptide Aβ_{1-40} sur la production d'AMPc en réponse à deux activateurs de RCPG couplés Gαs (*Figure R2 et R3*) : l'isoprotérénol (agoniste des récepteurs β-adrénergiques) et la prostaglandine E2 (PGE2). En réponse à 100nM d'Isoprotérénol, on observe une production d'AMPc importante dans les CMLV non traitées. Cette production est transitoire en raison de la désensibilisation des récepteurs β-adrénergiques due au maintien de la stimulation (*Figure R2.2A*). Les CMLV traitées au peptide Aβ_{1-40} présentent une réponse à l'isoprotérénol significativement diminuée (CMLV Ctrl : 0.8864 ± 0.0025 vs CMLV Aβ_{1-40} : 0.7189 ± 0.0471), avec un processus de désensibilisation maintenu (*Figure R2.2B*).

Une diminution de la production d'AMPc est donc également observée lorsque l'on active un RCPG couplé Gαs comme les récepteurs β-adrénergiques. Cependant, aucun effet du traitement au peptide Aβ_{1-40} n'est observé lorsque l'on induit la production d'AMPc avec la PGE2 (*Figure R2.3A et B*). A la dose de PGE2 utilisée, plusieurs sous-types de récepteurs vont être activés : les récepteurs EP1 (Gαq), les récepteurs EP3 (Gαi) et les récepteurs EP4 (Gαs). Aussi, la production d'AMPc mesurée en réponse à la PGE2 est un bilan de l'activation de ces sous-types de récepteurs. C'est pourquoi nous avons réalisé de nouvelles mesures de production d'AMPc en réponse à la PGE2, en inhibant les différents sous types de récepteurs avec du SC51322, du L798,106 ou de l'ONO AE3208, antagonistes sélectifs des récepteurs EP1, EP3 et EP4 respectivement. Comme présenté sur la *Figure R2.3C*, l'inhibition des

récepteurs EP1 et EP3 ne modifie pas la production d'AMPc en réponse à la PGE2, qui est donc due à l'activation du récepteur EP4, puisque son inhibition supprime la production d'AMPc. Cependant, l'inhibition du récepteur EP4 ne supprime pas totalement la production d'AMPc par la PGE2, ce qui suggèrerait que le récepteur EP2 (couplé Gαs) serait exprimé dans ces cellules. Son implication sera vérifiée par l'utilisation d'un agoniste EP2 sélectif, le butaprost.

L'ensemble de ces résultats met en évidence que le traitement au peptide amyloïde diminue la production d'AMPc dans les CMLV en réponse à la forskoline et à l'activation des récepteurs β-adrénergiques, mais pas en réponse à la PGE2. Ce résultat sera discuté ultérieurement.

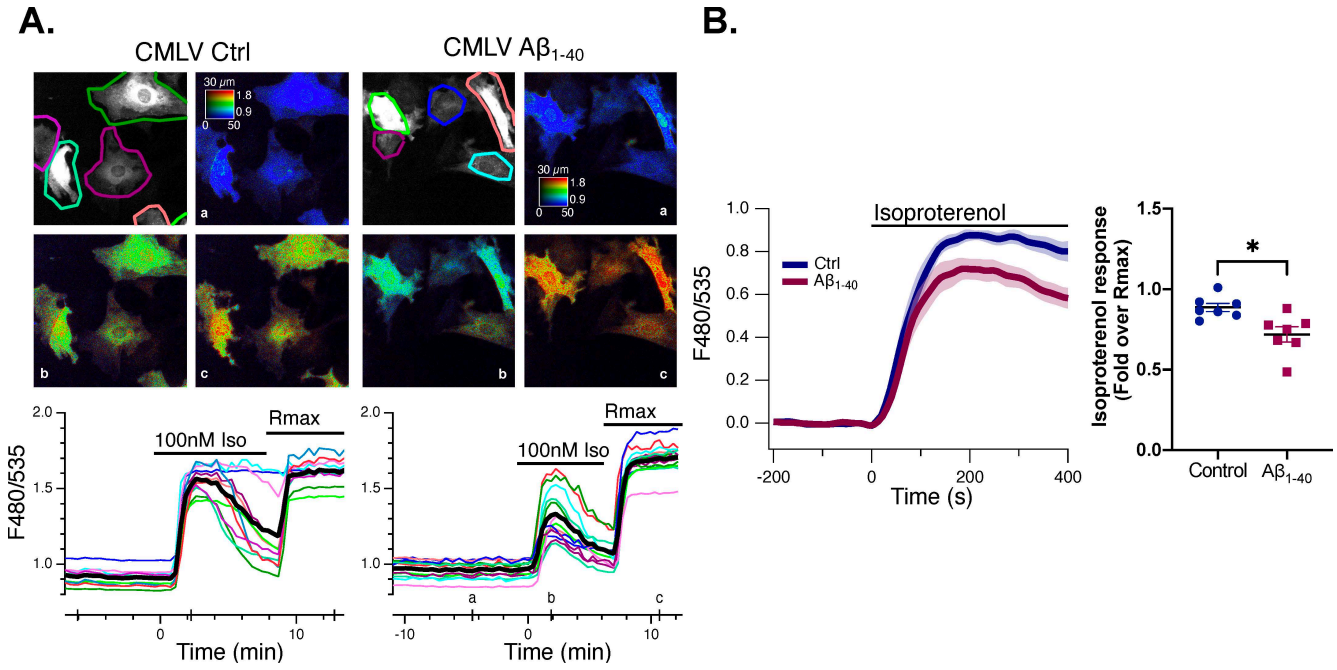


Figure R2. 2.Le traitement Aβ$_{1-40}$ diminue la production d'AMPc en réponse à l'Isoprotérénol

Le niveau d'AMPc a été mesuré sur des CMLV contrôles (Ctrl) ou traitées au peptide Aβ$_{1-40}$ (48h), après traitement à 100nM Isoprotérénol (en utilisant le biosenseur ^{T}EPAC^{VV}). **A, panneaux supérieurs** : l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 535 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F480/F535, indicatif de la concentration intracellulaire de [AMPc] (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement et (c), avec 12,5 µM de forskoline et 200 µM d'IBMX (Rmax, correspondant à la saturation du biosenseur). **A, panneaux inférieurs** : courbe des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (traces colorées). La trace noire représente la moyenne de toutes les cellules. **B, figure de gauche** : les traces moyennes en réponse à 100nM Isoprotérénol sont calculées à partir des traces moyennes de 7 expériences indépendantes. L'ombrage indique la SEM à 95 %. **B, figure de droite** : valeurs moyennes ± SEM (N =7 expériences indépendantes) de la réponse AMPc induite par le traitement à l'Isoprotérénol, exprimée comme une fraction du changement de Rmax. Chaque valeur représente une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour données non appariées. * : P < 0,05.

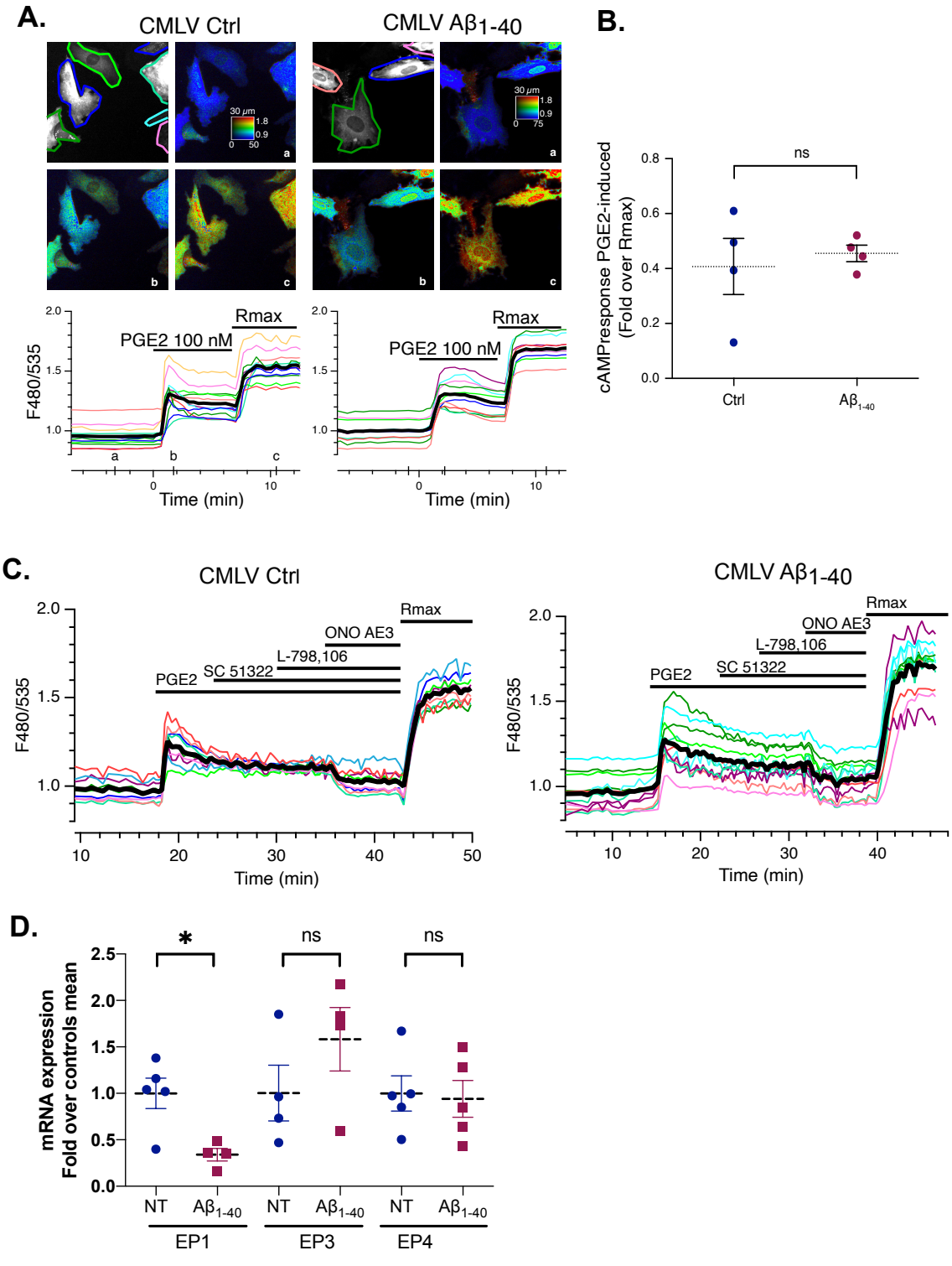

A.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
30 μm
1.8
0.9
0
50
75
a
b
c
Rmax
PGE2 100 nM
F480/535
2.0
1.5
1.0
Time (min)
B.
cAMPresponse PGE2-induced
(Fold over Rmax)
ns
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Ctrl
Aβ1-40
C.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
Rmax
ONO AE3
L-798,106
SC 51322
PGE2
F480/535
Time (min)
D.
mRNA expression
Fold over controls mean
*
ns
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NT
Aβ1-40
EP1
EP3
EP4

Figure R2. 3 Le peptide Aβ$_{1-40}$ ne modifie pas la production d'AMPc en réponse à la PGE2 dans les CMLV aortiques

Le niveau d'AMPc a été mesuré sur des CMLV aortiques contrôles (Ctrl) ou traitées au peptide Aβ$_{1-40}$ (48h), après traitement à 100nM PGE2 en utilisant le biosenseur ^{T}EPAC^{VV} **(A) +/-** inhibiteurs des récepteurs à la PGE2 (SC51322 : EP1 inhibiteur, L-798,106 : EP3 inhibiteur et ONO AE3 : EP4 inhibiteur) **(C)**. **A, panneaux supérieurs** : l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 535 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F480/F535, indicatif de la concentration intracellulaire de [AMPc] (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement et (c), avec 12,5 µM de forskoline et 200 µM d'IBMX (Rmax, correspondant à la saturation du biosenseur). **A, panneaux inférieurs et C** : Tracés représentants les mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (traces colorées). La trace noire représente la moyenne de toutes les cellules. **B, figure de droite** : valeurs moyennes ± SEM (N =4 expériences indépendantes) de la réponse AMPc induite par le traitement à la PGE2, exprimée comme une fraction du changement de Rmax. Chaque valeur représente une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann Whitney pour données non appariées. ns : P > 0,05. **(D)** Expression relative des transcrits d'ARN messagers des principales isoformes de PDE1 exprimées mesurée par RT-qPCR.

I.2. Effets du peptide amyloïde sur l'activité des PDE3 et PDE4

Si la production d'AMPc est dépendante de l'activité des adenylyl cyclases, la concentration en AMPc dans la cellule va aussi dépendre de l'activité des PDEs. Dans la *figure R2.1*, nous observons une diminution du niveau d'AMPc intracellulaire en réponse à la forskoline dans les CMLV traitées au peptide Aβ$_{1-40}$, sans pour autant observer une diminution de l'activité cyclase. Cette diminution de production d'AMPc dans les CMLV amyloïdes pourrait donc être la conséquence d'une augmentation de l'expression ou de l'activité de PDE, et plus particulièrement des PDE3 et PDE4 qui sont les principales PDE exprimées dans les CMLV.

Nous avons donc évalué l'implication de la PDE3 et PDE4 dans la diminution d'AMPc observée dans les CMLV traitées au peptide Aβ$_{1-40}$ en réponse à la forskoline, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de la PDE3 (Cilostamide) ou de la PDE4 (Roflumilast). Nos résultats mettent en évidence que l'inhibition de la PDE3 permet de rétablir un niveau d'AMPc statistiquement non différent entre les cellules traitées et les cellules contrôles (CMLV Ctrl : 0,8515 ± 0,0495 vs CMLV Aβ$_{1-40}$: 0,6878 ± 0,084), même si une réponse plus faible des CMLV traitées au peptide Aβ$_{1-40}$ reste observable (*Figure R2.4A et 3B)*. En revanche l'inhibition de la PDE4 *(Figure R2.4C et D*), ne suffit pas à rétablir un niveau d'AMPc similaire aux contrôles dans les cellules traitées. En effet, on observe toujours une différence significative du niveau d'AMPc (CMLV Ctrl : 0,7996 ± 0,031 vs CMLV Aβ$_{1-40}$: 0,4494 ± 0,048). Les résultats de RT-qPCR ne montrent aucune différence significative

dans l'expression des transcrits des isoformes de PDE3 et PDE4 dans les cellules traitées ou non au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ (*Figure R2.4E*). Ces résultats suggèrent qu'une partie de la diminution de la production d'AMPc observée dans les CMLV amyloïdes pourrait être due à une activité plus importante de la PDE3, mais ce résultat ne suffit pas à expliquer l'effet du peptide $A\beta$ sur la diminution de la dynamique d'AMPc observée.

Dans cette première partie, les résultats démontrent que la production d'AMPc en réponse à un agoniste β-adrénergique ou à la forskoline, est réduite par le traitement au peptide $A\beta$ et que cette diminution impliquerait la PDE3. Ce résultat suggère que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ en altérant la production d'AMPc en réponse à des agents vasodilatateurs altérerait la capacité des CMLV à se dilater, ce qui pourrait être à l'origine des hypoperfusions observées dans la MA/AAC.

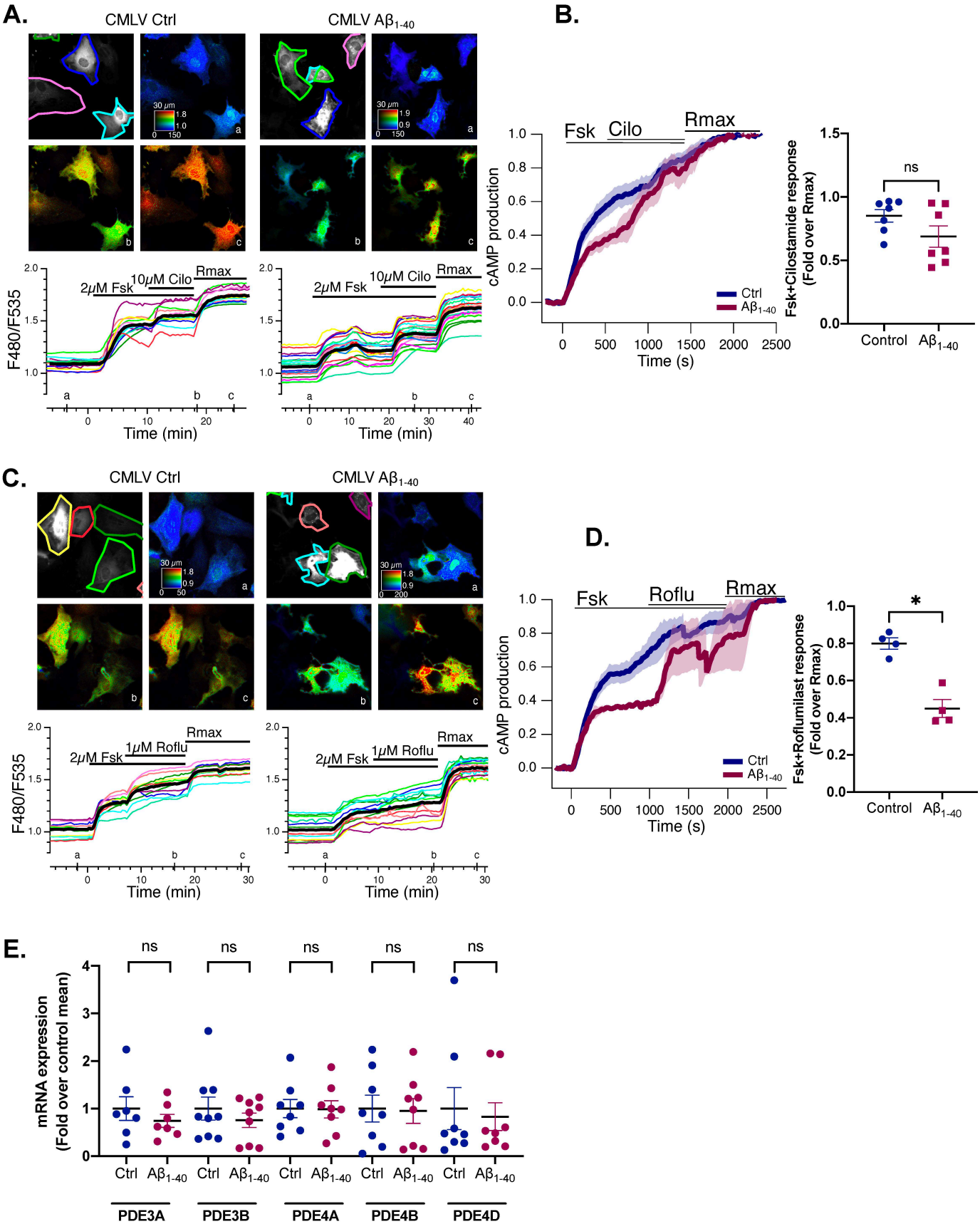

A.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
30 µm
1.8
1.0
0 150
1.9
0.9
a
b
c
F480/F535
2µM Fsk
10µM Cilo
Rmax
Time (min)
B.
Fsk
Cilo
Rmax
cAMP production
Ctrl
Aβ1-40
Time (s)
Fsk+Cilostamide response
(Fold over Rmax)
ns
Control
C.
1µM Roflu
0 50
0 200
D.
Roflu
Fsk+Roflumilast response
*
E.
mRNA expression
(Fold over control mean)
PDE3A
PDE3B
PDE4A
PDE4B
PDE4D

Figure R2. 4. La PDE3 et non pas la PDE4 semble impliquée dans la diminution d'AMPc Aβ-dépendante.

Le niveau d'AMPc a été mesuré sur des cellules contrôles (CMLV Ctrl) ou traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ (CMLV $A\beta_{1-40}$) (48h), après traitement à 2 µM de forskoline ± inhibiteur de la PDE3 (Cilostamide) **(A)** ou inhibiteur de la PDE4 (1 µM de Roflumilast) **(C)**, en utilisant le biosenseur $^{T}EPAC^{VV}$. **A et C, panneaux supérieurs**: l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 535 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F480/F535, indicatif de la concentration intracellulaire [AMPc] (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement et (c), avec 12,5 µM de forskoline et 200 µM d'IBMX (Rmax, correspondant à la saturation du biosenseur). **A et C, panneaux inférieurs** : courbe représentative des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (lignes colorées). La ligne noire représente la moyenne de toutes les cellules. **B et D, panneaux gauche** : les traces moyennes en réponse à 2 µM de forskoline + inhibiteur de la PDE3 ou de la PDE4 sont calculées à partir des traces moyennes de 7 et 4 expériences indépendantes respectivement. L'ombrage indique la SEM. **B et D, panneaux droite** : valeurs moyennes ± SEM (N = 4 à N = 7 expériences indépendantes) de la réponse en AMPc induite par le traitement à la forskoline+Cilostamide **(B)** ou forskoline+Roflumilast **(D)**, exprimée comme une fraction du changement de Rmax. Chaque valeur représente une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour les données non appariées. * : P < 0,05. **(E)** Expression relative des transcrits d'ARN messagers des principales isoformes de PDE3 et PDE4 exprimées mesurée par RT-qPCR.

I.3. Effets du peptide amyloïde sur la libération de calcium

Des variations de concentration de calcium intracellulaire peuvent également être à l'origine d'une altération de tonicité vasculaire à travers une altération de la capacité des CMLV à se contracter. À l'aide de la sonde calcique Fura-2AM, nous avons évalué le niveau de calcium intracellulaire en réponse à divers agents vasoconstricteurs : Phényléphrine, Endothéline I, PGE2, Oxotrémorine et Angiotensine II. Différentes doses de ces agonistes ont été testées sur des CMLV traitées ou non au peptide $A\beta_{1-40}$ pour déterminer les doses auxquelles on observait une production de calcium significative (résultats non présentés). Les résultats obtenus démontrent que seule l'Angiotensine II permet de stimuler la libération de calcium de manière reproductible. En effet :

- L'Endothéline I induit une libération de calcium trop faible pour être étudiée (*Figure S1.A*)
- La Phényléphrine qui était l'agoniste privilégié, n'induit pas de réponse calcique ce qui s'explique par une perte d'expression des récepteurs α-1 adrénergiques dans les cultures primaires de CMLV d'aorte de rat (Fan *et al.* 2009). (*Figure S1.B*)
- L'Oxotrémorine (Résultats non présentés) et la PGE2 (*Figure S1.C*) ne stimulent pas de réponse calcique suggérant que les récepteurs muscariniques M1/M3 et le récepteur aux prostaglandines EP1, tous trois couplés Gαq, ne seraient peu ou pas exprimés dans les CMLV en culture.

En réponse à l'angiotensine II, une réponse calcique transitoire est observée et l'amplitude de cette réponse dans les CMLV traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ (1,311 ±0,070) est réduite d'environ 45% par rapport aux cellules contrôles (2,339 ± 0,084) (*Figure R2.5A, B et C*). Cependant, le niveau basal de calcium intracellulaire est significativement plus élevé dans les CMLV traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ (CMLV Ctrl : 0,7938 ± 0,023 vs CMLV $A\beta_{1-40}$: 0,8782 ± 0,025) (*Figure R2.5D*). L'analyse par RT-qPCR des transcrits des récepteurs à l'angiotensine II montre que le peptide Aβ aurait tendance à diminuer l'expression des AGTR1a et AGTR1b, couplés Gαq et responsables de l'activation de la voie calcique. On observe cependant une tendance à l'augmentation de l'expression du récepteur AGTR2, un récepteur dont le couplage est incertain et qui est normalement peu exprimé dans les CMLV en conditions physiologiques (*Figure R2.5E*). Ces expériences nécessitent d'être reproduites afin de confirmer ou d'infirmer ces tendances, car les niveaux d'expression de ces récepteurs sont très faibles ce qui peut biaiser la quantification relative des ARNm.

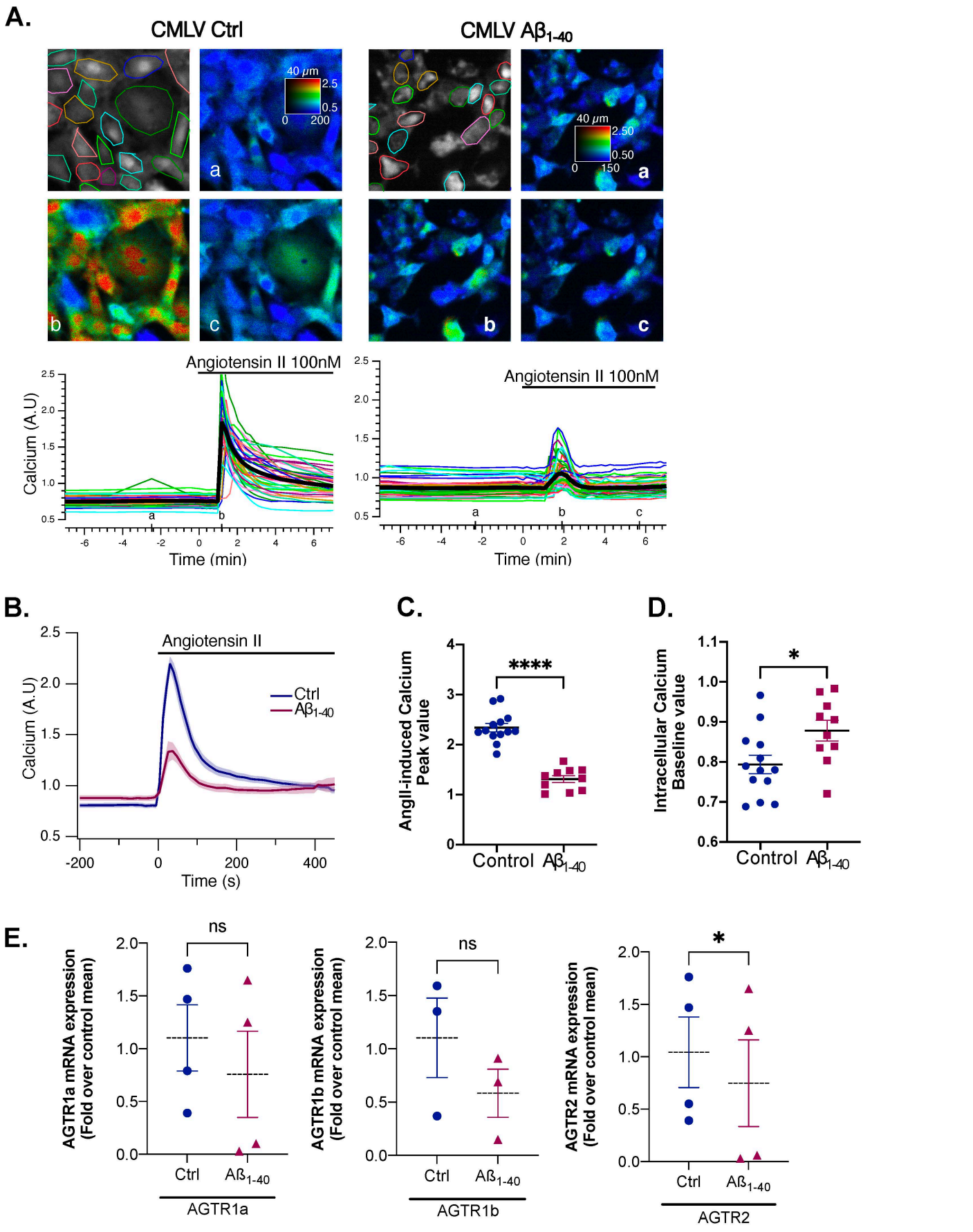

A.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
40 μm
2.5
0.5
0
200
a
b
c
40 μm
2.50
0.50
0
150
Angiotensin II 100nM
Calcium (A.U)
Time (min)
B.
Angiotensin II
Ctrl
Aβ1-40
Calcium (A.U)
Time (s)
C.
AngII-induced Calcium Peak value
****
Control
Aβ1-40
D.
Intracellular Calcium Baseline value
*
Control
Aβ1-40
E.
AGTR1a mRNA expression (Fold over control mean)
ns
Ctrl
Aß1-40
AGTR1a
AGTR1b mRNA expression (Fold over control mean)
ns
Ctrl
Aß1-40
AGTR1b
AGTR2 mRNA expression (Fold over control mean)
*
Ctrl
Aß1-40
AGTR2

Figure R2. 5. Le traitement $A\beta_{1-40}$ réduit la réponse calcique induite par l'angiotensine II dans les CMLV aortiques.

Le niveau $[Ca^{2+}]i$ a été mesuré sur des CMLV (CMLV Ctrl) ou traitées par $A\beta_{1-40}$ ($A\beta_{1-40}$) (48h), en réponse au traitement angiotensine II (100 nM) en utilisant la sonde Fura-2AM. Les CMLV ont été chargées avec la sonde Fura2-AM 60 minutes avant l'acquisition. **A, panneaux supérieurs** : l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 510 nm lorsque la sonde est excitée à 380 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F340/F380, correspondant à l'intensité de fluorescence induite par l'excitation à 340 nm et 380 nm et émise à 510 nm, et indiquant le niveau de Ca^{2+} cytoplasmique (a) avant le traitement, (b) à la réponse maximale, et (c) après 6 minutes de traitement. ***A, panneaux inférieurs*** : tracé des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (lignes colorées). La ligne noire représente la moyenne de toutes les cellules sur une expérience indépendante**. (B).** Les traces moyennes en réponse à 100 mM d'angiotensine II sont calculées à partir des traces moyennes (épaisses) de 10 à 13 expériences indépendantes. L'ombrage indique ± SEM. **C et D**, Valeurs moyennes ± SEM (N = 10 ou 13 expériences indépendantes) de la réponse Ca^{2+} induite par le traitement à 100 nM d'angiotensine II, mesurée au pic de la réponse **(C)** et les valeurs moyennes ± SEM (N = 10 ou 13 expériences indépendantes) du Ca^{2+} intracellulaire basal **(D)**. Chaque point représente la moyenne d'une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour données non appariées. *** : $P < 0,001$ et * : $P < 0,05$. **(E).** Expression relative des transcriptions d'ARN messagers des récepteurs de l'angiotensine (AGTR) mesurée sur des CMLV contrôles ou traitées par $A\beta_{1-40}$ par RT-qPCR. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test t pour données appariées. * : $P < 0,05$.

En conclusion, nous avons démontré que le peptide $A\beta_{1-40}$ réduit également la capacité des CMLV aortiques à répondre à un stimulus vasoconstricteur puisque la réponse calcique à l'angiotensine II des cellules traitées est réduite. Ceci suggère que le peptide $A\beta_{1-40}$ diminuerait la capacité des CMLV aortiques à se contracter. *In fine*, l'ensemble de ces résultats montre que le peptide $A\beta_{1-40}$ diminue la réactivité des CMLV à des stimuli vasoconstricteurs ou vasodilatateurs, et pourrait ainsi avoir un impact sur la régulation de la tonicité des vaisseaux.

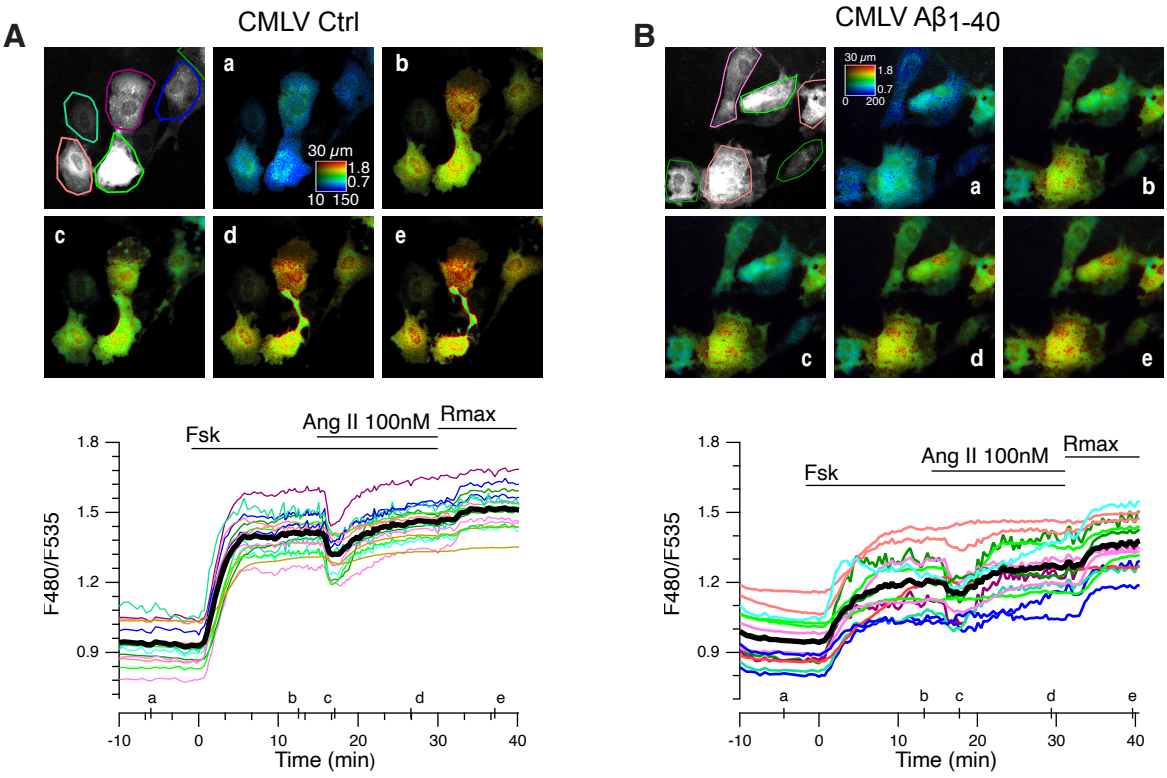
I.4. Un cross talk AMPc – Calcium médié par la PDE1

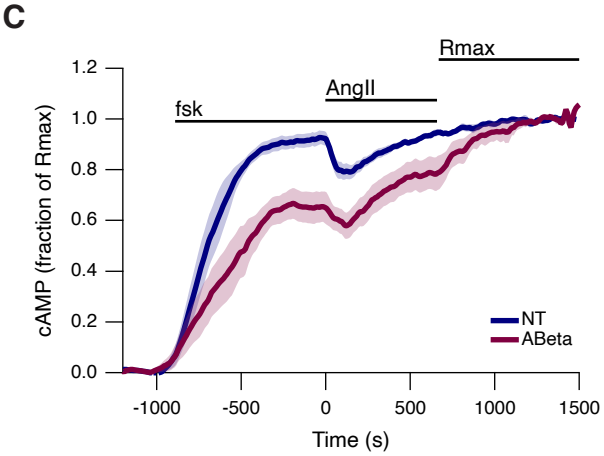
L'ensemble des résultats précédents a montré que le traitement amyloïde altère la capacité de la cellule à se dilater et à se contracter en réduisant à la fois les niveaux d'AMPc et de calcium dans les CMLV aortiques. Nous avons étudié ces deux voies de signalisation séparément mais il existe de nombreux cross-talk de ces deux voies qui se modulent l'une l'autre afin de contrôler l'état de contractilité de la CMLV (*Figure I2.12*). Aussi, nous avons mesuré l'impact de l'activation de la voie calcique par l'angiotensine II sur la production d'AMPc en réponse à la forskoline (*Figure R2.6*), sur les CMLV contrôles et traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$.

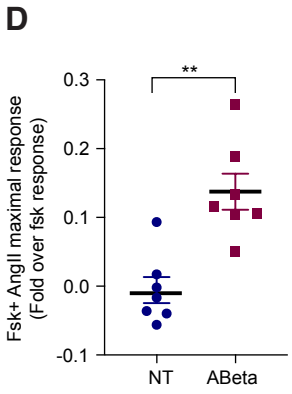
Le traitement à l'angiotensine II entraine une diminution transitoire du niveau d'AMPc induit par la forskoline, aussi bien dans les CMLV Ctrl (*Figure R2.6A*) que dans les CMLV $A\beta_{1\text{-}40}$ (*Figure R2.6B*). L'angiotensine II induisant une augmentation transitoire de calcium (*Figure R2.5*), nous avons pensé que cette diminution d'AMPc induite par l'angiotensine II pourrait être due à l'activation de la PDE1, qui est sensible au Ca^{2+}. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation d'un inhibiteur de la PDE1 (AF64196 ou iPDE1), qui inhibe l'effet de l'angiotensine II sur la dynamique de production d'AMPc en réponse à la forskoline (*Figure R2.6E*). On notera que l'effet de la PDE1 semble moins marqué dans les cellules traitées que dans les cellules contrôles. Cette différence peut s'expliquer par la production de calcium en réponse à l'angiotensine II qui est également plus faible dans les CMLV traitées (*Figure R2.5*), limitant ainsi l'activité de la PDE1. Le traitement par le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ n'a cependant aucun effet sur l'expression des transcrits PDE1, comme en témoignent les expériences de PCR quantitative (*Figure R2.6F*).

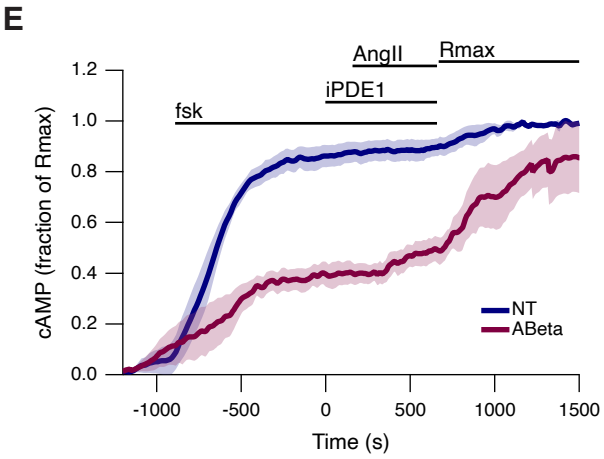
L'augmentation du calcium en réponse à l'angiotensine II étant transitoire, l'effet de la PDE1 l'est également. Si la production d'AMPc induite par la forskoline revient au même niveau après l'effet transitoire de la PDE1 dans les CMLV contrôles (*Figure R2.6C et D*), ce n'est pas le cas dans les cellules traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$. En effet, après la diminution transitoire d'AMPc induite par la PDE1, la production d'AMPc se rétablie à un niveau supérieur à celui observé avant le traitement à l'angiotensine II. Cette augmentation de presque 14% dans les CMLV traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ (0,137 ± 0,026) n'est pas observée dans les CMLV Ctrl (-0,006 ± 0,019). Cette augmentation n'est pas liée à l'activation de la PDE1, puisqu'elle est toujours observable lorsque la PDE1 est inhibée (*Figure R2.6E)*. Ce

résultat suggère que le traitement au peptide $A\beta_{1-40}$ induirait également un mécanisme qui favoriserait la production d'AMPc suite à une élévation du calcium intracellulaire. Un tel mécanisme pourrait impliquer l'activation d'adenylyl cyclases sensibles au calcium (Halls and Cooper 2011) comme l'AC1, l'AC3 ou l'AC8 ; les deux premières étant exprimées dans les CMLV contrôles ou traitées par le peptide $A\beta_{1-40}$ (*Figure R2.1F*).


A
CMLV Ctrl
a
b
c
d
e
30 µm
1.8
0.7
10 150
Fsk
Ang II 100nM
Rmax
F480/F535
Time (min)
B
CMLV Aβ1-40
0 200


C
Rmax
AngII
fsk
NT
ABeta
cAMP (fraction of Rmax)
Time (s)


D
**
Fsk+ AngII maximal response
(Fold over fsk response)
NT
ABeta


E
AngII
Rmax
iPDE1
fsk
NT
ABeta
cAMP (fraction of Rmax)
Time (s)

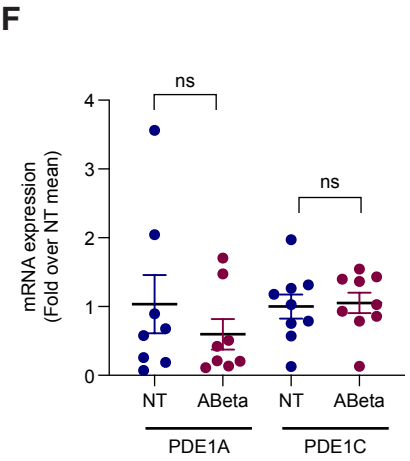

F
ns
ns
mRNA expression
(Fold over NT mean)
NT
ABeta
NT
ABeta
PDE1A
PDE1C

Figure R2. 6. Identification d'un Cross-Talk PDE1 dépendant

Le niveau d'AMPc a été mesuré **(A)** sur des cellules contrôles (CMLV Ctrl) ou **(B)** traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ (CMLV $A\beta_{1-40}$) (48h), après traitement à 5 µM de forskoline (fsk) + 100nM angiotensine II, en utilisant le biosenseur $^{T}EPAC^{VV}$. **A et B, panneaux supérieurs**: l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 535 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F480/F535, indicatif de la concentration intracellulaire [AMPc] (a) avant le traitement, pendant le traitement (b) fsk 5 µM, (c) fsk 5µM +100nM AngII au moment de la diminution d'AMPc, (d) fsk 5µM +100nM AngII au moment du rebond d'AMPc et (e) avec 12,5 µM de forskoline et 200 µM d'IBMX (Rmax, correspondant à la saturation du biosenseur). **A et B, panneaux inférieurs** : courbe représentative des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (lignes colorées). La ligne noire représente la moyenne de toutes les cellules. **(C)** Les traces moyennes en réponse à 5 µM de forskoline ± angiotensine II sont calculées à partir des traces moyennes de 7 expériences indépendantes. L'ombrage indique la SEM. **(D)** Valeurs moyennes ± SEM (N = 7 expériences indépendantes) de la réponse maximale en AMPc induite par le traitement à la forskoline+angiotensine II exprimée comme une fraction du changement la réponse Fsk seule. Chaque valeur représente une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour les données non appariées. * : $P < 0,05$. **(E)** Les traces moyennes en réponse à 5µM forskoline +/- angiotensine II et +/- iPDE1 sont calculées à partir des traces moyennes (épaisses) de 7 expériences indépendantes. L'ombrage indique ± SEM.**(F)** Expression relative des transcrits d'ARN messagers des principales isoformes de PDE1 exprimées mesurée par RT-qPCR.

Des expériences « miroir » ont été réalisées afin d'étudier l'influence de la production d'AMPc sur la réponse calcique. Ces expériences ont démontré qu'une activation préalable de la production d'AMPc (avec de la forskoline) entraine une réduction de la réponse calcique induite par l'angiotensine II, d'environ 30% (*résultats non présentés*). Cette diminution pourrait s'expliquer par l'action de la PKA sur divers acteurs de la voie calcique. La PKA pourrait i) inhiber l'influx de calcium extracellulaire via la phosphorylation de canaux voltage dépendants de type L ou T, ii) activer les pompes SERCA et favoriser la recapture du calcium vers les stocks ou iii) activer la pompe calcique transmembranaire PMCA et favoriser l'extrusion du calcium.

II. Effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la vasoréactivité des artères basilaires de rats

Les expériences menées *in vitro* ont démontré que le traitement au peptide $A\beta_{1-40}$ altérait la réceptivité des CMLV aortiques en réduisant leur capacité à répondre à des stimuli vasodilatateurs et vasoconstricteurs, suggérant que le peptide altérerait leurs capacités dilatatoires et/ou contractiles. Afin d'étudier *ex vivo* les effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la tonicité vasculaire, nous avons collaboré avec le Dr Boris Manoury (UMR-S1180, Université Paris Saclay) pour mettre en place et réaliser une série d'expériences visant à mesurer la réactivité vasculaire d'artères basilaires de rat par wire-myographie, que j'ai réalisée de février à avril 2023, et dont les résultats sont présentés ci-dessous.

II.1. Évaluation de la capacité contractile des artères basilaires de rats exposées au peptide $A\beta_{1-40}$

Les artères peuvent se contracter en réponse à un stimulus vasoconstricteur activant les RCPG couplé $G\alpha q$ ou en réponse à une dépolarisation de la membrane plasmique via l'activation des canaux calciques voltage dépendants de type L. Pour mesurer l'impact du traitement amyloïde sur la capacité contractile des artères basilaires, nous avons montées les artères sur un wire-myographe et nous les avons, après une étape de normalisation, exposées à différents agents vasomodulateurs. Les mesures de tension effectuées, reflètent la capacité contractile ou relaxante des artères en réponse aux agents vasomodulateurs ajoutés dans le bain (voir partie IV du matériel et méthodes).

La capacité contractile absolue (en mN/mm) de l'artère est mesurée en réponse à une solution dépolarisante composée de 100mM de potassium (K^+) que l'on nomme K100 ($[K^+]$=100mM). Cette mesure permet dans un premier temps de comparer le maximum de la capacité contractile entre les artères témoins et les artères traitées, et servira par la suite de référentiel aux différentes mesures effectuées. En effet, le diamètre « théorique » des segments de 2mm utilisés pour les expériences peut varier le long de l'artère basilaire. C'est pourquoi la tension mesurée a été normalisée à la valeur du K100 pour chaque artère et que les courbes doses réponses sont présentées en pourcentage du K100 (% of K100).

Comme démontré sur la *figure R2.7A*, le K100 mesuré ne diffère pas entre les artères basilaires contrôles et traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$. Aussi, si la capacité contractile maximale n'est pas modifiée par le traitement au peptide amyloïde, la stratégie d'étude de mesure de la contractilité en réponse à l'activation ciblée de certains récepteurs est ainsi pertinente. L'amplitude de la réponse au K100 est donc utilisée comme un indicateur direct de la capacité contractile de la couche contenant les CMLV dans le segment d'artère basilaire étudié. Nous avons dans un premier temps mesuré la relaxation en réponse à l'acétylcholine, suite à une pré-contraction au K100 qui reflète la capacité de relaxation induite par l'endothélium. Les réponses à l'acétylcholine mesurées étant très faibles ou absentes (résultats non présentés), indiquent que l'endothélium a été altéré soit au moment du montage soit lors de la culture. En conséquence, les mesures de contractilité réalisées reflètent uniquement la réponse des CMLV. Des expériences sur des vaisseaux « frais », c'est-à-dire non mis en culture et non traités montrent également peu ou pas de réponse à l'acétylcholine (résultats non présentés et discutés utlerieurement).

Nous avons réalisé une dose réponse au K^+ afin d'évaluer la sensibilité des artères basilaires contrôles et traitées à la dépolarisation induite par le K^+, comme présenté sur la *figure R2.7B, C et D*. L'allure de la courbe dose-réponse au K^+ ne présente pas de décalage significatif entre les artères contrôles et traitées $A\beta_{1\text{-}40}$ (p=0,9), indiquant que la sensibilité à un stimulus dépolarisant est la même et confirme le maintien de l'intégrité de l'artère (*Figure R2.7B*). L'absence de modification des valeurs de $logEC_{50}$ (concentration d'agoniste à laquelle on atteint 50% de l'effet maximum) et d'Emax (effet maximum de l'agoniste) calculées à partir de la courbe dose réponse appuient ce résultat (*Figure R2.7C et D*).

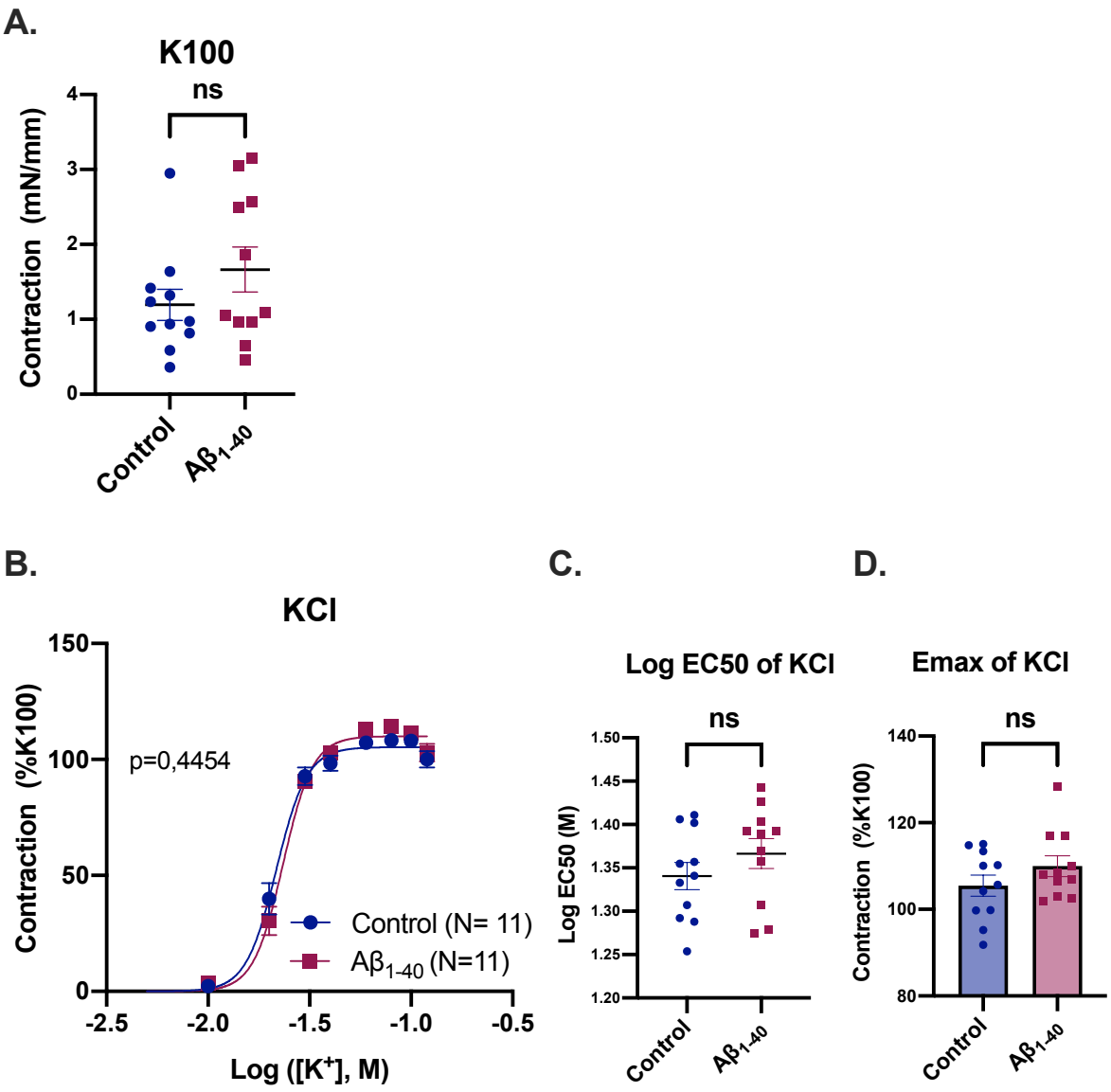


Figure R2. 7. La capacité contractile absolue n'est pas altérée par le traitement au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$

Mesure de réactivité vasculaire avec un wire-myographe dans des artères basilaires de rats traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ ($A\beta_{1\text{-}40}$) ou non (Control). **(A)** La réponse contractile au K100 (KCl 100mM, solution dépolarisante) en mN/mm. **(B)** Contraction en réponse à des doses cumulatives de KCl (de 5 à 120mM) exprimées en %K100. **(C)** Concentration efficace (Log EC50) et **(D)** Effet maximal (Emax) du KCl sur la contraction. Les valeurs sont exprimées en valeurs moyennes ± SEM. N = 11 vaisseaux par condition. Statistiques : 2-way ANOVA à mesures répétées pour les courbes doses réponses et Student t-test pour les comparaisons de 2 groupes. ns, non significatif p > 0,005

Afin de tester la capacité contractile des artères basilaires, nous les avons exposées à des concentrations croissantes d'agonistes vasoconstricteurs : l'angiotensine II (10^{-7} à 3.10^{-3} M) et le U46619 (10^{-9} à 3.10^{-6} M), et mesuré la tension en mN/mm que nous avons normalisée par rapport au K100 (exprimée en % du K100). La réponse contractile à l'angiotensine II n'est pas interprétable (*Figure R2.8A*). Comme on peut le voir sur la *figure R2.8A* les mesures effectuées sur les vaisseaux traitées ou non au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, rendent compte non pas de la contraction dose-dépendante mais plutôt de variations aléatoires du tonus vasculaire basal signifiant que l'artère basilaire dans ces conditions expérimentales n'est pas sensible à l'angiotensine II. Contrairement à l'angiotensine II, l'U46619 un agoniste mimétique du Thromboxane A2, qui est également un agent vasoconstricteur, induit une contraction des vaisseaux contrôles et traités $A\beta_{1\text{-}40}$ et peut donc être utilisé pour étudier la capacité contractile de l'artère (*Figure R2.8B*). On observe que le traitement amyloïde a pour effet de décaler significativement la courbe dose-réponse vers la gauche traduisant une sensibilisation du vaisseau à la contractilité, ce qui est confirmé par une diminution significative du $logEC_{50}$ (Control : -6,569 ± 0,049 vs $A\beta_{1\text{-}40}$: -6,714 ± 0,071) (*Figure R2.8C*). L'effet maximal du U46619 sur la contraction reste puissant dans les deux conditions de traitement, puisqu'il atteint plus de 100% de la réponse contractile au K100 (*Figure R2.8D*).

L'augmentation de la capacité contractile des artères basilaires traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, en réponse à l'U46619, s'oppose au résultat obtenu *in vitro* sur les CMLV aortiques. En effet, nous avions observé que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ entrainait une diminution de la capacité des CMLV à répondre à stimulus vasoconstricteur (diminution de la réponse calcique à l'angiotensine II).

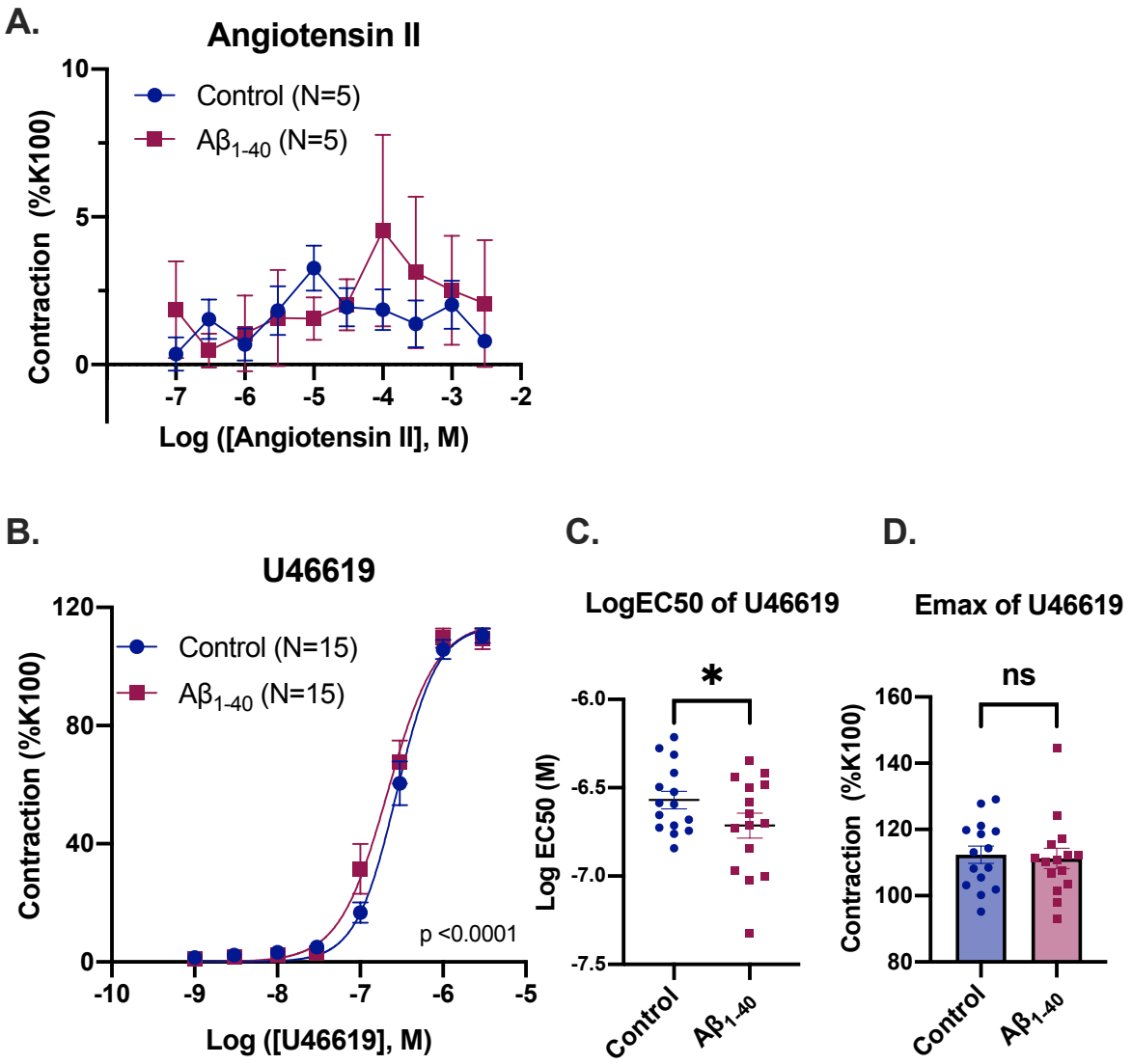


Figure R2. 8 Le peptide $A\beta_{1-40}$ augmente la contraction à l'U46619 de l'artère basilaire

Mesure de réactivité vasculaire avec un wire-myographe dans des artères basilaires de rats traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ ($A\beta_{1-40}$) ou non (Control). Contraction en réponse à des doses cumulatives de **(A)** Angiotensine II (agoniste des récepteurs AGTR) ou **(B)** U46619 (mimétique du thromboxane A2) exprimées en %K100. **(C)** Concentration efficace (Log EC50) et **(D)** Effet maximal (Emax) du U46619 sur la contraction. Les valeurs sont exprimées en valeurs moyennes ± SEM. N = nombre de vaisseaux par condition. Statistiques : 2-way ANOVA à mesures répétées pour les courbes doses réponses et Student t-test pour les comparaisons de 2 groupes. ns, non significatif. *p < 0,05.

II.2. Effet du peptide amyloïde sur la relaxation

Nous avons évalué la capacité de relaxation des artères, suite à l'activation de la voie AMPc, sur des artères basilaires pré-contractées avec 1µM d'U46619. En réponse à la forskoline, la relaxation dose dépendante mesurée est forte et similaire entre les artères traitées et contrôles (*Figure R2.9A*), comme en témoignent les valeurs similaires de logEC50 et d'effet maximal de l'U46619 (*Figure R2.9B et C*). La réponse relaxante à l'isoprotérénol (agoniste β-adrénergique) est significativement moins efficace dans les vaisseaux traités au peptide $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,0001$) puisque nous observons un décalage vers la droite de la courbe dose-réponse (*Figure R2.9D*), se traduisant par une diminution significative du logEC50 (Control : -8,494 ± 0,173 vs $A\beta_{1-40}$: -8,106 ± 0,156) (*Figure R2.9E*). L'effet maximal de l'isoprotérénol sur la relaxation n'est significativement pas différent ($p = 0,07$) entre les vaisseaux contrôles et $A\beta_{1-40}$ même si on observe une tendance vers une diminution de cet effet dans les vaisseaux $A\beta_{1-40}$ (Control : 21,36% vs $A\beta_{1-40}$: 31,93%) (*Figure R2.9F*). Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de confirmer cette tendance.

L'ensemble des résultats de l'étude de réactivité vasculaire, démontre que le peptide amyloïde altère la vasoréactivité. En effet, la réponse contractile à l'U46619 est augmentée dans les artères basilaires de rats traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ alors que la réponse relaxante à l'isoprotérénol, médiée par les récepteurs β-adrénergiques, est diminuée. Cela suggère que le peptide $A\beta_{1-40}$ pourrait augmenter la résistance artérielle, réduisant ainsi le débit sanguin cérébral et participer à l'hypoperfusion cérébrale caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

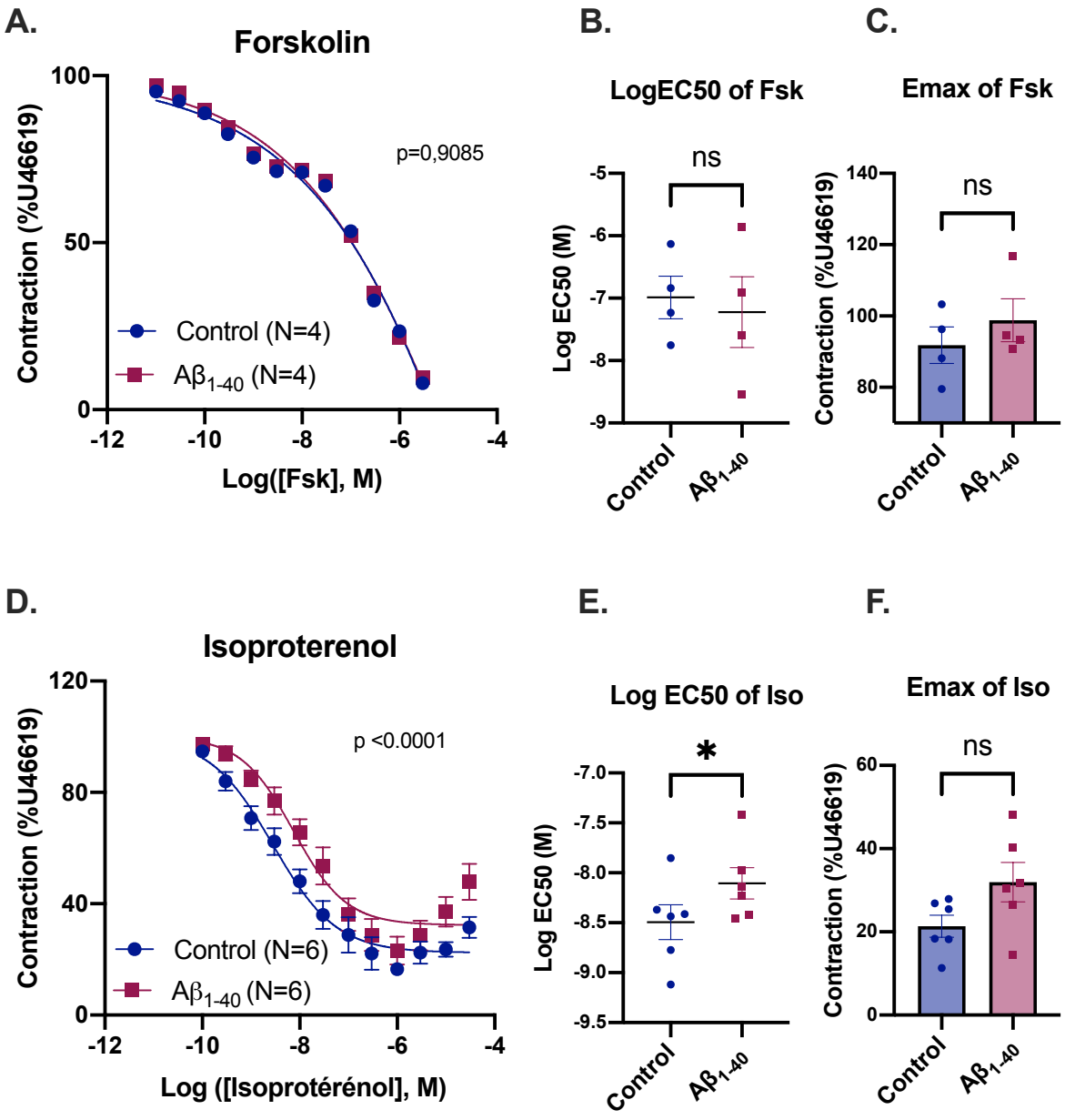


Figure R2. 9. Le peptide $A\beta_{1-40}$ diminue la relaxation à l'isoprotérénol de l'artère basilaire

Mesure de réactivité vasculaire avec un wire-myographe dans des artères basilaires de rats traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ ($A\beta_{1-40}$) ou non (Control). Contraction en réponse à des doses cumulatives de **(A)** Forskoline (activateur direct des AC) ou **(B)** Isoprotérénol (agoniste β-adrénergique) exprimées en %K100. **(C)** Concentration efficace (Log EC50) et **(D)** Effet maximal (Emax) de la forskoline sur la contraction. **(E)** Concentration efficace (Log EC50 en M) et **(F)** Effet maximal (Emax en % de contraction restant) de l'isoprotérénol sur la contraction. Les valeurs sont exprimées en valeurs moyennes ± SEM. N = 6 vaisseaux par condition. Statistiques : 2-way ANOVA à mesures répétées pour les courbes doses réponses et Student t-test pour les comparaisons de 2 groupes. ns, non significatif. *p < 0,05.

III. Effets du peptide amyloïde dans les CMLV Cérébrales

Nous avons montré dans l'étude *in vitro* réalisées sur CMLV aortiques, que le traitement au peptide amyloïde induit une diminution de la réponse calcique et de la production d'AMPc en réponse à des agents vasomodulateurs. Ces résultats suggèrent que la capacité dilatatoire des CMLV et *a fortiori* celle des vaisseaux est diminuée par ce traitement, résultat que nous avons confirmé *ex vivo* sur l'artère basilaire de rat. Cependant les résultats obtenus sur la capacité contractile sont contradictoires entre le modèle de CMLV aortiques et d'artères basilaires. En effet, on observe que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ diminue le niveau de calcium en réponse à des stimulations vasoconstrictrices alors qu'il augmente la contractilité des artères basilaires en réponse à ces mêmes stimulations. L'Angiopathie Amyloïde Cérébrale étant une pathologie affectant les vaisseaux cérébraux, nous avons développé un modèle de culture primaire de CMLV issues de vaisseaux cérébraux de rats (rB-CMLV), afin de reproduire les expériences réalisées sur le modèle de CMLV aortiques dans un modèle plus proche de la physiologie et pouvoir expliquer les différences de résultats entre les expériences menées *in vitro* et *ex-vivo*. La mise au point de ce modèle est développée dans la partie matériels et méthodes de ce manuscrit. Seules les expériences les plus pertinentes menées sur les CMLV aortiques ont été reproduites sur les CMLV cérébrales.

III.1. Effets du peptide amyloïde sur la production d'AMPc

Afin de caractériser l'effet du peptide amyloïde sur l'intégration des signaux vasodilatateurs, nous avons de la même façon que pour les CMLV aortiques suivi la dynamique de production d'AMPc à l'aide du biosenseur $^{T}Epac^{VV}$ dans des cultures primaires de CMLV de vaisseaux cérébraux de rats (rB-VSMC) traitées avec 50µM de peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ ou non traitées pendant 48h.

Comme présenté sur la *Figure R2.10A et B*, le traitement amyloïde induit une diminution significative de la production d'AMPc dans les rB-CMLV $A\beta_{1\text{-}40}$ (0,5330 ± 0,072) en réponse à 5µM forskoline en comparaison avec les rB-CMLV contrôles (0,6255 ± 0,08), comme cela a été observé dans les CMLV aortiques. Une expérience préliminaire de mesure de pente, qui reflète l'activité cyclase, a été effectuée et aucune différence significative entre les moyennes des pentes mesurées n'a été mise en évidence entre les deux conditions

contrôles et traitées au peptide $A\beta_{1-40}$. Ce résultat suggère que l'activité cyclase n'est également pas modifiée par le traitement $A\beta_{1-40}$ dans les rB-CMLV (*Figure R2.10C-E*). Nous nous sommes également assurés que le traitement au peptide $A\beta_{1-40}$ n'altérait pas les niveaux basal (Rbasal) et maximal (Rmax) d'AMPc, qui ont été mesurés sur N= 13 expériences et aucune différence significative n'a été observée entre les CMLV Ctrl et $A\beta_{1-40}$ (*Figure S3*).

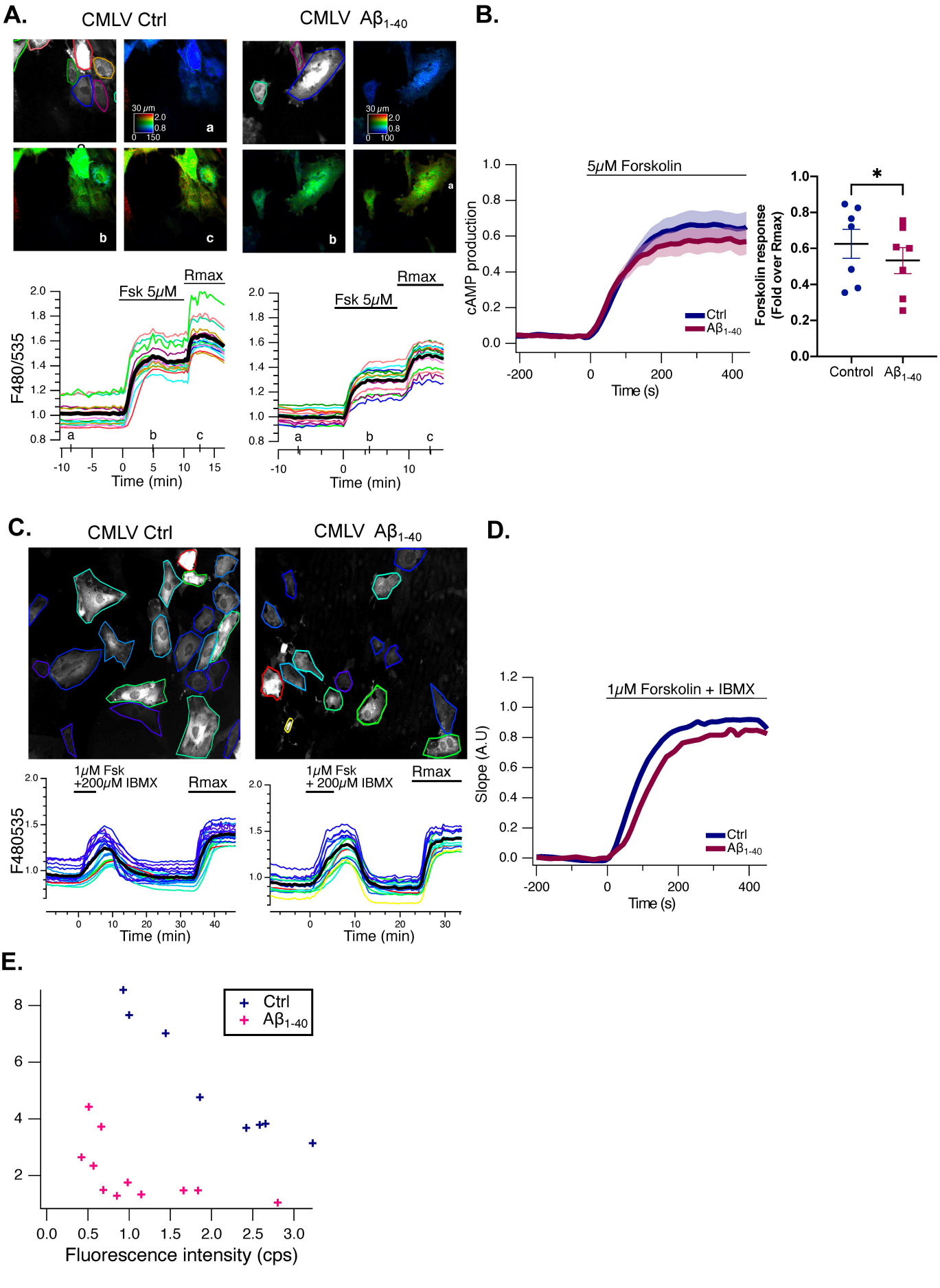

A.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
30 μm
2.0
0.8
0 150
0 100
a
b
c
Rmax
Fsk 5μM
F480/535
Time (min)
B.
5μM Forskolin
cAMP production
Time (s)
Ctrl
Aβ1-40
Forskolin response
(Fold over Rmax)
Control
*
C.
CMLV Ctrl
CMLV Aβ1-40
1μM Fsk
+200μM IBMX
Rmax
F480535
Time (min)
D.
1μM Forskolin + IBMX
Slope (A.U)
Time (s)
E.
Ctrl
Aβ1-40
Fluorescence intensity (cps)

Figure R2. 10. Le traitement Aβ_{1-40} diminue la production d'AMPc en réponse à la forskoline dans les CMLV cérébrales

Le niveau d'AMPc a été mesuré sur des rB-CMLV contrôles (Ctrl) ou traitées au peptide Aβ_{1-40} (48h), après traitement à 5 µM de forskoline **(A)** ou 1 µM de forskoline + 200 µM d'IBMX **(C)**, en utilisant le biosenseur ^{T}EPAC^{VV}. **A et C, panneaux supérieurs** : l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 535 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F480/F535, indicatif de la concentration intracellulaire de [AMPc] (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement et (c), avec 12,5 µM de forskoline et 200 µM d'IBMX (Rmax, correspondant à la saturation du biosenseur). **A et C, panneaux inférieurs** : courbe des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (traces colorées). La trace noire représente la moyenne de toutes les cellules. **B et D, figure de gauche** : les traces moyennes en réponse à 2 µM de forskoline **(B)** ou 1 µM de forskoline + 200 µM d'IBMX **(D)** sont calculées à partir des traces moyennes de 8 et 4 expériences indépendantes respectivement. L'ombrage indique la SEM à 95 %. **B et D, figure de droite** : valeurs moyennes ± SEM (N = 7 et N = 1 expériences indépendantes respectivement) de la réponse en AMPc induite par le traitement à la forskoline **(B)** ou à la forskoline+IBMX **(D)**, exprimées comme une fraction du changement de Rmax. Chaque valeur représente une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour données non appariées. * : P < 0,05. **(E)** Graphique représentant la mesure de la pente en fonction de l'intensité de fluorescence du biosenseur pour chaque cellule sur N = 1 expérience.

En réponse à 100nM d'Isoprotérénol, on observe dans les rB-CMLV traitées au peptide Aβ_{1-40} une tendance à la diminution de la production d'AMPc par rapport aux rB-CMLV contrôles (*Figure R2.11*), qui devra être confirmée en reproduisant ces expériences. Ces cellules cérébrales semblent par ailleurs plus sensibles aux agonistes β-adrénergiques, en effet à cette dose d'isoprotérénol, nous saturons presque le biosenseur alors qu'avec les CMLV aortiques cette dose ne stimulait la production d'AMPc qu'à hauteur de 50% du Rmax (*Figure R2.2*). Il faudrait diminuer la dose pour éviter d'avoir une réponse saturante et être capable de mieux discriminer l'effet du traitement amyloïde sur la réponse AMP cyclique.

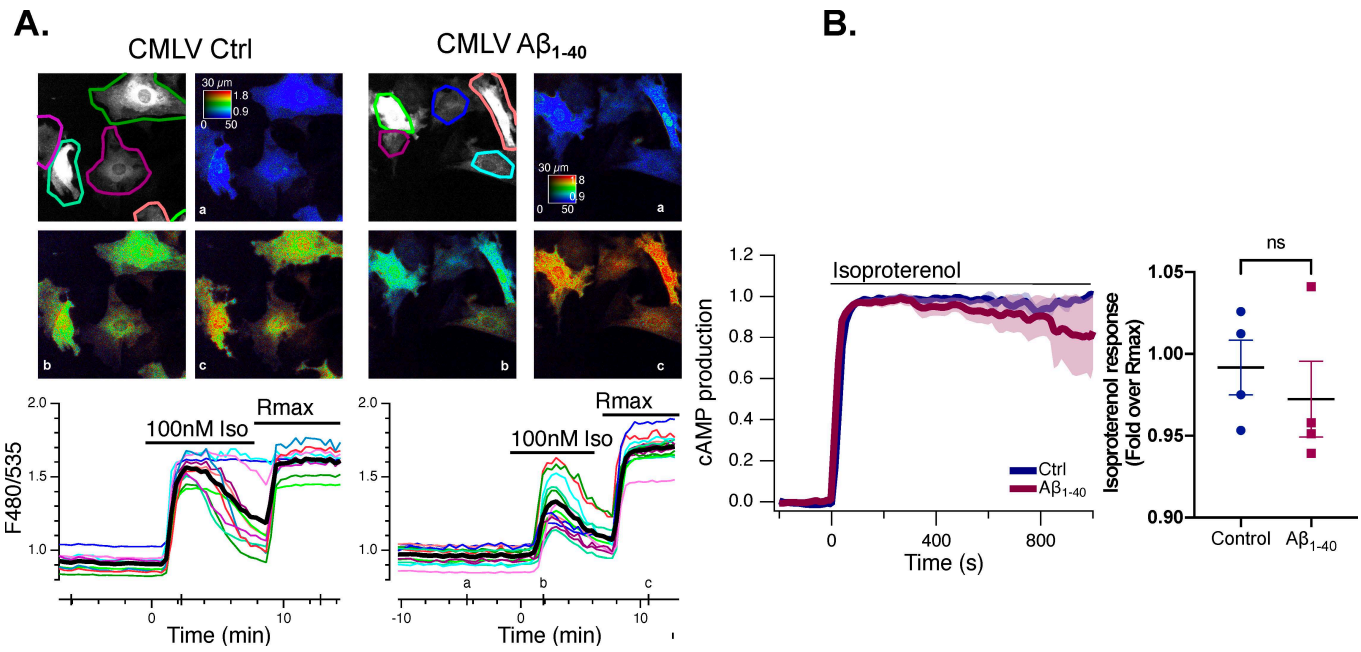


Figure R2. 11.La production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol a tendance à diminuer dans les CMLV cérébrales traitées au peptide Aβ$_{1-40}$

Le niveau d'AMPc a été mesuré sur des CMLV cérébrales contrôles (Ctrl) ou traitées au peptide Aβ$_{1-40}$ (48h), après traitement à 100nM Isoprotérénol en utilisant le biosenseur ^{T}EPAC^{VV} **(A)**. **A, panneaux supérieurs** : l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 535 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F480/F535, indicatif de la concentration intracellulaire de [AMPc] (a) avant le traitement, (b) pendant le traitement et (c), avec 12,5 µM de forskoline et 200 µM d'IBMX (Rmax, correspondant à la saturation du biosenseur). **A, panneaux inférieurs** : Tracés représentants les mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (traces colorées). La trace noire représente la moyenne de toutes les cellules. **B, figure de gauche** : les traces moyennes en réponse à 100nM Isoprotérénol sont calculées à partir des traces moyennes de 4 expériences indépendantes comme présentée en **A**. L'ombrage indique la SEM à 95 %. **B, figure de droite** : valeurs moyennes ± SEM (N =4 expériences indépendantes) de la réponse AMPc induite par le traitement à l'Isoprotérénol, exprimée comme une fraction du changement de Rmax. Chaque valeur représente une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour données non appariées. ns : P > 0,05.

Ces premiers résultats mettent en évidence que le peptide Aβ$_{1-40}$ induit une diminution de la production d'AMPc en réponse à la forskoline et à l'isoprotérénol. Cette diminution n'est pas la conséquence d'une réduction de l'activité des adenylyl cyclases. Des expériences complémentaires doivent encore être réalisées afin d'étudier l'effet du traitement sur l'expression des AC et/ou l'activité et l'expression des PDE comme nous l'avons fait sur les CMLV aortiques pour comprendre l'origine de cette diminution. Malgré la nature préliminaire de ces résultats sur les rB-CMLV, ils concordent avec les résultats obtenus sur les CMLV aortiques et avec la diminution de la capacité relaxante des artères basilaires traitées au peptide Aβ$_{1-40}$.

III.2. Effet du peptide amyloïde sur la réponse calcique dans les rB-CMLV

Une altération de la tonicité vasculaire peut également être induite par une altération de la capacité des CMLV cérébrales à se contracter. Afin de déterminer si le peptide modifie la capacité des rB-CMLV à répondre à des stimulus vasoconstricteurs et à produire une réponse calcique comme nous l'avons démontré dans les CMLV aortiques, nous avons à l'aide de la sonde calcique Fura-2AM, évalué la capacité d'un agent vasoconstricteur, l'U46619 (analogue du Thromboxane A2) à stimuler une réponse calcique dans les CMLV cérébrales. Nous utilisons le U46619, car nous avons observé qu'*ex vivo* sur les artères basilaires de rat, qu'il permettait d'induire une contraction stable alors que ces artères semblaient être insensibles à l'angiotensine II.

Ces premiers résultats qui devront être confirmés indique que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ à tendance à augmenter l'amplitude de la réponse calcique à l'U46619 dans les cellules traitées (0,9692 ± 0,996) en comparaison aux cellules contrôles (0,8115 ± 0,016) (*Figure R2.12*). L'angiotensine II a tout de même été testée afin de vérifier l'absence de réponse observée *ex vivo* et nous avons observé qu'elle n'entraine pas ou peu de réponse calcique dans les CMLV cérébrales également (résultats non présentés). Quant au niveau basal de calcium intracellulaire, on observe une augmentation significative lorsque les cellules sont exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ (CMLV $A\beta_{1\text{-}40}$: 0,766 ± 0,007 vs CMLV Ctrl : 0,6675 ± 0,017).

Au travers de ces expériences, nous démontrons que i) les CMLV cérébrales traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ produisent une réponse calcique à l'U46619 plus importante que les CMLV contrôles, ce qui concorde avec l'augmentation de la contractilité des artères basilaires observée *ex-vivo* et ii) les CMLV cérébrales comme les artères basilaires traitées ou non au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ ne sont pas ou peu sensibles à l'angiotensine II.

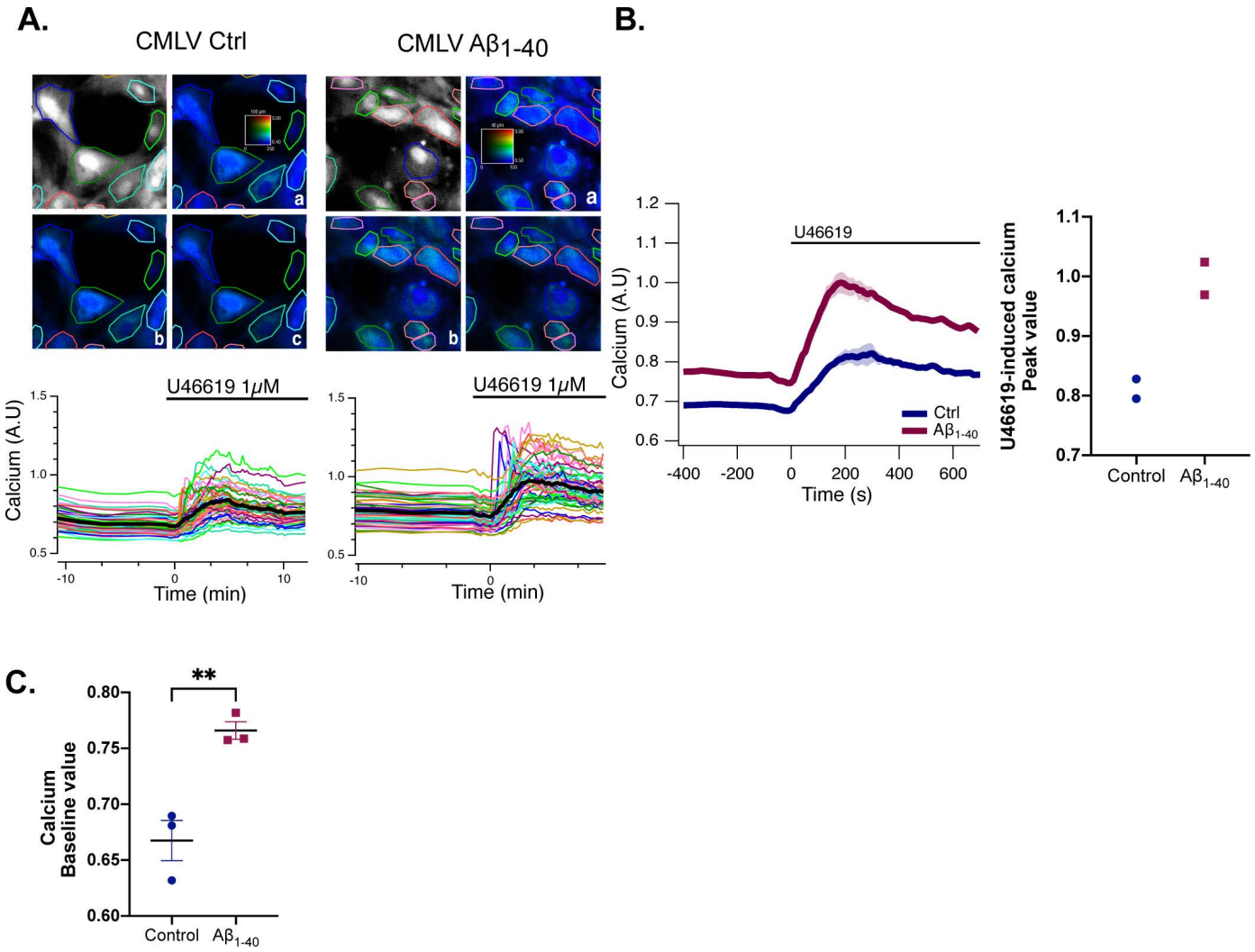


Figure R2. 12. Le traitement au peptide $A\beta_{1-40}$ augmente le $[Ca2+]_i$ en réponse à l'U46619 dans les CMLV cérébrales

A. Le niveau $[Ca^{2+}]$i a été mesuré sur des rB-CMLV (CMLV Ctrl) ou traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ (CMLV $A\beta_{1-40}$) (48h), en réponse à l'U46619 (1µM) en utilisant la sonde Fura-2. Les CMLV ont été chargées avec la sonde Fura-2 60 minutes avant l'acquisition. **A, panneaux supérieurs** : l'image en gris représente l'émission brute de fluorescence à 510 nm lorsque la sonde est excitée à 380 nm. Les images en fausses couleurs représentent le rapport F340/F380, correspondant à l'intensité de fluorescence induite par l'excitation à 340 nm et 380 nm et émise à 510 nm, et indiquant le niveau de Ca2+ cytoplasmique (a) avant le traitement, (b) à la réponse maximale, et (c) après 6 minutes de traitement. **A, panneaux inférieurs** : tracé des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (lignes colorées). La ligne noire représente la moyenne de toutes les cellules sur une expérience indépendante**. B, Figure de gauche.** Les traces moyennes de la réponse calcique en réponse à 1µM d'U46619 sont calculées à partir des traces moyennes de 2 expériences indépendantes. L'ombrage indique ± SEM. **B, Figure de droite**. Valeurs moyennes ± SEM (N=2 expériences indépendantes) de la réponse Ca^{2+} induite par le traitement à 1µM U46619, mesurée au pic de la réponse. **C.** Valeurs moyennes ± SEM (N =3) du Ca^{2+} intracellulaire basal. Chaque point représente la moyenne d'une expérience indépendante avec 20 à 30 cellules individuelles. Des comparaisons side by side ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney pour données non appariées. ns : P > 0,05.

III.3. Cross Talk AMPc/Calcium dans les CMLV cérébrales

Comme pour les CMLV aortiques, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les deux seconds messagers contrôlant la contractilité des CMLV cérébrales.

Les CMLV cérébrales ne répondant pas ou peu à l'angiotensine II, nous avons utilisé le U46619 afin d'induire une réponse calcique. Après avoir activé la production d'AMPc avec 5µM de forskoline, les cellules sont traitées avec 1µM de U46619 afin d'augmenter le calcium intracellulaire. Que les rB-CMLV aient été traitées ou non au peptide, on observe une augmentation du niveau d'AMPc suite à l'ajout de U46619. Cette augmentation semble cependant plus importante dans les cellules traitées (*Figure R2.13*). Contrairement aux CMLV aortiques, l'élévation de calcium ne semble pas activer la PDE1, puisque le niveau d'AMPc ne diminue pas. Ces résultats restent cependant préliminaires et nécessiteront d'être confirmés.

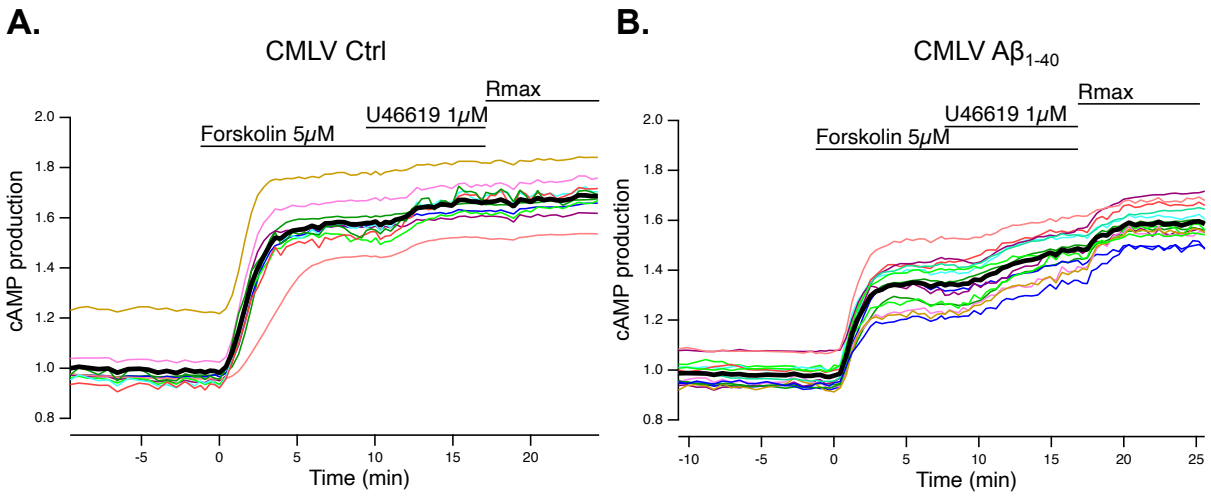


Figure R2. 13. Cross Talk des voies AMPc et Calcium dans les CMLV cérébrales

Le niveau d'AMPc a été mesuré (A) sur des rB-CMLV contrôles (CMLV Ctrl) ou (B) traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ (CMLV $A\beta_{1-40}$) (48h), après traitement à 5 µM de forskoline +/- 1µM U46619, en utilisant le biosenseur $^{T}EPAC^{VV.}$ A et B, courbe représentative des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (lignes colorées). La ligne noire représente la moyenne de toutes les cellules pour une expérience indépendante. N =1

III.4. Comparaison des effets du peptide $A\beta_{1-40}$: CMLV aortiques vs CMLV cérébrales vs Artères basilaires

	Agoniste	CMLV aortiques exposées au peptide $A\beta_{1-40}$	CMLV cérébrales exposées au peptide $A\beta_{1-40}$	Artères basilaires exposées au peptide $A\beta_{1-40}$
$[Ca^{2+}]i$ ou Vasoconstriction	Angiotensine II	↘	?	?
	U46619	↘	↗	↗
AMPc ou Vasodilatation	Forskoline	↘	↘	↘
	Isoprotérénol	↘	↘	↘

Tableau R2. 1. Comparaison des effets du peptide amyloïde sur l'AMPc et le calcium selon la nature des CMLV ou sur la vasoréactivité des artères basilaires de rat

Le symbole ↘ signifie qu'on observe diminution du niveau intracellulaire des seconds messagers en réponse à un agoniste alors que le symbole ↗ fait référence à une augmentation. Le symbole **?** lui signifie qu'en raison d'une faible réponse ou d'une absence de réponse à agoniste, l'effet n'a pas pu être évalué.

L'ensemble des résultats obtenus sur les deux modèles de CMLV (rAo-CMLV et rB-CMLV) *in vitro* montre une altération des niveaux cytoplasmiques d'AMPc et de calcium lorsque les CMLV sont exposées au peptide $A\beta_{1-40}$. En revanche, ces altérations peuvent différer selon l'origine vasculaire des cellules. En effet, si le niveau d'AMPc (en réponse à l'isoprotérénol ou à la forskoline) est réduit dans les deux modèles de CMLV lorsqu'elles sont exposées au peptide $A\beta_{1-40}$, les effets observés sur la dynamique calcique s'opposent entre les CMLV aortiques et cérébrovasculaires.

Plusieurs différences ont été observées dans les rB-VSMC :

- Les cellules ne répondent pas ou peu à l'angiotensine II.
- Le traitement au peptide amyloïde augmente la réponse calcique à un agent vasoconstricteur (U46619) qui au contraire est diminuée dans les CMLV aortiques.

Cependant, les effets du peptide $A\beta_{1-40}$ sur les CMLV cérébrales s'accordent avec ceux observés *ex vivo* sur les artères basilaires de rat. En effet, la diminution de production d'AMPc et l'augmentation de la réponse calcique dans rB-CMLV traitées sont cohérantes avec la réduction de la relaxation et l'augmentation de la contractilité des artères basilaires.

Concernant l'interaction entre l'AMPc et le calcium, là encore elle diffère selon le modèle de CMLV étudié. Dans les CMLV aortiques (*Figure R2.5*), l'interaction se traduit dans

un premier temps par une diminution du niveau d'AMPc dépendante de la PDE1 puis on observe dans un second temps un retour à un niveau d'AMPc, soit au même niveau que celui produit en réponse à la forskoline seule dans les CMLV Ctrl soit au-dessus de ce niveau pour les CMLV $A\beta_{1\text{-}40}$. En revanche, dans les CMLV cérébrovasculaires (*Figure R2.13*), on n'observe pas de diminution de la production d'AMPc lorsque l'on active la libération de calcium, ce qui suggèrerait que la PDE1 est soit inactive, soit non exprimée, soit non compartimentalisée avec le récepteur au TX2 contrairement au récepteur à l'angiotensine II. Cependant, l'activation de la signalisation calcique avec le U46619 augmente la production d'AMPc induite par la forskoline, que ce soit dans les rB-CMLV contrôles ou traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$. Si l'augmentation de la production d'AMPc en réponse à l'U46619 semble être plus importante dans les rB-CMLV traitées que dans les rB-CMLV contrôles, cette observation devra être confirmée avec des doses inferieures de forskoline. En effet, la réponse des rB-CMLV contrôles à cette dose de forskoline est élevée et sature rapidement avec l'ajout de U46619, ne permettant pas d'évaluer l'amplitude réelle de la réponse au U46619.

DISCUSSION

Le tonus vasculaire régule le débit sanguin cérébral, qui est réduit dans les AAC et la MA. Ce tonus vasculaire est régulé par la contractilité des cellules musculaires lisses vasculaires, contrôlée par de multiples acteurs. Aussi, la compréhension des effets du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la contractilité nécessite d'étudier ses effets sur les mécanismes moléculaires qui en sont à l'origine. Les CMLV étant le centre intégrateur de nombreux signaux physiologiques, nous nous sommes focalisés sur l'intégration des signaux vasomodulateurs impliquant les voies AMPc et calcique ainsi qu'à leur interaction, lorsque les CMLV sont exposées au peptide $A\beta_{1-40}$. A l'aide de l'imagerie dynamique nous avons pu suivre les dynamiques de ces deux seconds messagers en réponse à différents agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Nous avons mis en évidence dans deux modèles de CMLV issues de territoires vasculaires différents, que le peptide $A\beta_{1-40}$ induit une diminution de la production d'AMPc en réponse à un stimulus vasodilatateur de type β-adrénergique (isoprotérénol), ou en réponse à une activation directe des adenylyl cyclases, mais pas en réponse à la prostaglandine E_2 (*Figure R2.3*). Nos résultats démontrent que cette diminution d'AMPc ne s'explique pas par une perte d'activité ou une diminution d'expression des adenylyls cyclases, mais suggèrent au contraire une implication de la PDE3 dans la dégradation de l'AMPc (*Figure R2.4*). La PDE3 pourrait alors représenter une cible intéressante pour restaurer la production d'AMPc et en conséquence, de la capacité dilatatoire des CMLV. Nous avons ensuite étudié l'effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la voie calcique, démontrant une altération de la réponse calcique à l'angiotensine II ou à un analogue du thromboxane A2 (U46619), différente selon le modèle de CMLV étudié (*Figure R2.5 et R2.12*). Dans les CMLV aortiques, l'amplitude de la réponse calcique est diminuée par le peptide $A\beta_{1-40}$, tandis que dans les CMLV cérébrales elle est augmentée. De plus, le peptide $A\beta_{1-40}$ semble modifier profondément la signalisation calcique puisqu'il élève le niveau de calcium intracellulaire basal (*Figure R2.5 et R2.12*). L'interaction entre la voie AMPc et calcique a également été étudiée et nous avons pu observer, dans les CMLV aortiques contrôles et traitées, au peptide $A\beta_{1-40}$ que l'activation de la voie calcique entrainait une diminution transitoire du niveau d'AMPc par un mécanisme PDE1 dépendant. Cependant le peptide $A\beta_{1-40}$ exerce un effet différent sur la production

d'AMPc, induite par la forskoline et consécutive à une augmentation du calcium intracellulaire. En effet dans les CMLV traitées, le niveau d'AMPc produit en réponse à la forskoline est plus élevé après l'augmentation du calcium intracellulaire et suggère que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ activerait une AC dépendante du calcium (AC1, AC3 ou AC8) (Halls and Cooper 2011). L'ensemble des résultats *in vitro* suggère que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ modifierait les propriétés de relaxation et de contractilité des CMLV en agissant sur la capacité de ces cellules à moduler leur taux d'AMPc et de calcium intracellulaire. D'autre part, ils témoignent de l'importance de l'origine territoriale des CMLV sur la réceptivité et l'amplitude des réponses générées, mettant ainsi en lumière l'importance du choix du modèle d'étude. L'étude *ex vivo* réalisée sur les artères basilaires de rat, supporte un effet du peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ en faveur d'une augmentation de la vasocontractilité en réponse à un analogue du thromboxane A2, et confirmant ainsi les résultats obtenus *in vitro* sur le modèle de CMLV cérébrales, démontrant à nouveau l'importance de la territorialité vasculaire. De plus, les mesures de réactivité vasculaire démontrent que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ diminue la relaxation des artères basilaires et augmente leur contraction. Ainsi, l'ensemble de notre étude démontre *in vitro* et *ex vivo* que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ altère la réactivité vasculaire à travers la modification des voies de signalisations impliquées dans la contractilité des CMLV. Ces résultats mettent en évidence un des mécanismes moléculaires par lesquels le débit sanguin cérébral pourrait être altéré dans les AAC et la MA.

I. Altération de la contractilité des CMLV par le peptide Aβ$_{1-40}$

A l'aide de l'imagerie dynamique, nous avons pu suivre la dynamique d'AMPc et de calcium ainsi que celle des acteurs impliqués dans la régulation de ces deux voies à l'aide d'agonistes et d'inhibiteurs spécifiques des RCPG ainsi que d'inhibiteurs spécifiques des PDE. Cette étude a été réalisée sur deux modèles de CMLV issues de territoires vasculaires différents : les CMLV aortiques et les CMLV cérébrales.

I.1. Altération de la dynamique d'AMPc

Nous avons mis en évidence par imagerie de biosenseurs que le traitement au peptide Aβ$_{1-40}$ en réponse à la forskoline ou à un agoniste β-adrénergique (isoprotérénol) entraine une diminution du niveau d'AMPc dans les CMLV issues d'aorte de rat ainsi que dans les CMLV issues d'artères cérébrales de rat. Ce premier résultat général suggère que le peptide Aβ$_{1-40}$ en diminuant l'activation de la voie AMPc, causerait une diminution de l'activité PKA qui ne serait alors plus en mesure d'activer la MLCP. Dans cette situation la MLC$_{20}$ resterait alors dans un état phosphorylé et la cellule serait incapable de se relaxer, même en présence d'un stimulus vasodilatateur, le tout contribuant à maintenir la cellule dans un état contractile. Ce type d'altération affectant l'activation de la MLCP ou de sa sous unité régulatrice MYPT1 est régulièrement impliqué dans le développement d'hypertension artérielle chez l'Homme et la souris (Takeya *et al.* 2014; Khromov *et al.* 2009), ce qui pourrait dans le cas des AAC en augmentant la résistance des artères, diminuer le flux (selon la loi de Poiseuille et la loi d'Ohms : ($Débit = \frac{\Delta P}{R}$, où la résistance R va dépendre du rayon à la puissance 4), contribuant ainsi au développement d'ischémies cérébrales. Cette altération est d'autant plus importante, qu'elle impacte la réceptivité β-adrénergique, qui est un des principaux médiateurs des signaux vasodilatateurs dans la CMLV. De plus, la PKA peut agir indirectement en limitant l'activation de la MLCK par le calcium. En effet, la PKA peut faire diminuer la concentration intracellulaire en calcium en activant la pompe SERCA, permettant alors la recapture du Ca^{2+} vers le RE (Morgado *et al.* 2012b). Ainsi, si l'AMPc diminue, alors l'axe PKA/SERCA/Ca^{2+} est altéré et contribue d'autant plus à maintenir la cellule dans un état contractile. Afin de confirmer cette hypothèse, des mesures de l'activité PKA avec l'utilisation d'un biosenseur spécifique (Zhang *et al.* 2022), ainsi que des vérifications de

l'état de phosphorylation de la MLC_{20} sur des extraits protéiques de CMLV traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ ou à l'aide d'un biosenseur rendant compte de l'état de phosphorylation de la MLC_{20} (Yamada *et al.* 2005), devront être réalisées.

Si le peptide $A\beta_{1-40}$ impacte négativement la réceptivité β-adrénergique, nous n'observons aucun effet sur la réponse à la PGE2 (*Figure R2.3*). La production d'AMPc est similaire entre les CMLV traitées et non traitées et est principalement médiée par le récepteur EP4 même si une implication du récepteur EP2 est probable et devra être vérifiée avec l'utilisation d'un agoniste spécifique le butaprost. Il a été montré que le peptide $A\beta_{1-42}$ pouvait se lier à de nombreux récepteurs dont les récepteurs β2-adrénergiques dans les neurones (Wang *et al.* 2010; Mroczko *et al.* 2018). Wang et ses collaborateurs ont d'ailleurs montré que la liaison du peptide $A\beta_{1-42}$ au domaine N-terminal du récepteur β2-adrénergique entraine sa désensibilisation par l'arrestine3 et son internalisation via une phosphorylation par la GRK, contribuant à réduire la production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol (Wang *et al.* 2011). Un mécanisme similaire pourrait également exister avec le peptide $A\beta_{1-40}$ et pourrait être démontré par des expériences de liaison à l'équilibre (binding), sur des extraits membranaires de CMLV traitées ou non au peptide $A\beta_{1-40}$. Nous pouvons donc supposer que la diminution de production d'AMPc pourrait être, en plus de l'effet sur la PDE3 qui sera discuté plus loin, associée à un mécanisme de désensibilisation induit par la liaison du peptide $A\beta_{1-40}$ au récepteur β2-adrénergique. L'absence d'effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la réponse induite à la PGE_2 pourrait alors s'expliquer par l'absence d'interaction entre les récepteurs EP et le peptide $A\beta_{1-40}$, qui n'a encore jamais été reportée dans la littérature.

Nous avons ensuite étudié les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans cette diminution du niveau d'AMPc et démontré que cette diminution du niveau d'AMPc n'était pas due à un défaut d'adénylyl cyclases puisque ni l'expression, ni l'activité des principales AC exprimées dans les CMLV n'étaient modifiées par le peptide $A\beta_{1-40}$ (*Figure R2.1*). Nos résultats suggèrent que le peptide $A\beta_{1-40}$ induirait une augmentation de l'activité PDE3, donc de l'hydrolyse de l'AMPc en AMP (*Figure R2.4*). Si l'activité PDE3 est majoritaire *in vivo*, elle est diminuée au profit de l'activité PDE4 dans les CMLV en culture (Zhai *et al.* 2012b), ce qui rend ce résultat assez inattendu. L'expression des transcrits de PDE3 n'est pas augmentée dans les CMLV traitées au peptide $A\beta_{1-40}$ qui pourrait justifier son rôle dans la

diminution de l'AMPc, cependant les résultats de qPCR sont à interpréter avec prudence compte tenu de la faible corrélation existante entre l'expression d'ARNm et l'expression protéique (Maier *et al.* 2009; Ostlund and Sonnhammer 2012). Cependant, un effet du peptide sur l'expression protéique ou des modifications post-traductionnelles de la PDE3 ne peuvent être exclues et devront être vérifiées par western-blot ou directement par la mesure de l'activité PDE avec du [^{3}H]-cAMP sur des extraits cellulaires et l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs (Zhai *et al.* 2012b). Nos résultats suggèrent un rôle de la PDE3 dans les effets médiés par le peptide A$\beta_{1\text{-}40}$. Un effet de la PDE3 a par ailleurs déjà été suggéré dans la MA puisque des études ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la PDE3A (cilostazol) réduit les dépôts de peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ et améliore le déclin cognitif chez la souris Tg-SwDi (modèle murin de la MA présentant la mutation Swedish) en favorisant le drainage périvasculaire du peptide Aβ soluble (Maki *et al.* 2014) et en améliorant la fonction lymphatique (Kimura *et al.* 2014). De plus, l'inhibition de la PD3A favorise le maintien de l'intégrité de la paroi des vaisseaux cérébraux et des mécanismes anti-thrombotiques (Gatti *et al.* 2020), ce qui pourrait donner à la PDE3 un statut de cible thérapeutique potentielle pour limiter les altérations vasculaires dans la MA et les AAC. Avec l'essor de la reconnaissance d'une composante vasculaire dans la MA, l'étude des PDE dans le système cérébrovasculaire est particulièrement pertinent. En effet, la PDE4 qui ne semble pas impliquée dans notre étude, a également été étudiée en tant que cible thérapeutique associée au déclin cognitif, mais les effets secondaires des inhibiteurs de PDE4 testés sont trop importants. Récemment, l'implication d'isoformes particulières de la PDE4D a été mis en évidence dans la formation de plaques séniles et du déclin cognitif, ce qui permettrait l'utilisation d'inhibiteurs plus spécifiques et limiterait les effets secondaires (Paes *et al.* 2021). L'étude de la PDE3 et PDE4 dans les altérations neurovasculaires paraît pertinente puisque ces phosphodiestérases ont souvent été reliées aux pathologies cardiovasculaires (Bobin *et al.* 2016; Hubert *et al.* 2014b; Wang *et al.* 2023).

Pour résumer, la première partie de cette étude nous donne des pistes sur les mécanismes moléculaires par lesquels le peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ pourrait conduire à une altération de la vasodilatation, retrouvée dans la MA et les AAC. Cette accumulation de peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ réduirait la production d'AMPc en réponse à des agents vasodilatateurs, et pourrait impliquer en partie la PDE3. L'implication de la PDE3 reste cependant à confirmer avec des

expériences de mesure d'activité avec de l'AMPc radio-marqué comme évoqué plus haut par exemple. L'importance de la PDE3 sur les altérations de vasoréactivité pourrait également être étudiée *ex vivo*, en utilisant un modèle de souris KO PDE3 x souris APP23, sur lequel nous effectuerions des expériences de wire-myographie ou alors en revisitant nos expériences sur les artères basilaires de rat en présence de cilostamide. Par ailleurs, si la PDE3 est impliquée dans la diminution du niveau d'AMPc induit par le traitement $A\beta_{1\text{-}40,}$ cela pourrait expliquer la différence d'effet du peptide sur la production d'AMPc entre la stimulation à l'isoprotérénol ou à la PGE2. En effet, des études s'intéressant à la compartimentalisation des signaux AMPc ou GMPc par les PDE dans les CMLV ou les cardiomyocytes, démontrent que les PDE recrutées ne sont pas les mêmes selon la nature du stimulus et le type de RCPG activé (Richter *et al.* 2008; Rochais *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2019; Lorigo *et al.* 2021). Enfin, la nature du stimulus vasodilatateur peut également avoir son importance, car le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ étant capable de se lier aux récepteurs β-adrénergiques, il pourrait impacter cette voie préférentiellement.

I.2. Altération de la dynamique calcique

La signalisation calcique est tout aussi importante que le signalisation AMP cyclique quand on évoque la modulation de la contractilité de la CMLV, puisque le Ca^{2+} est l'élément central de la contractilité. Dans le contexte des AAC, il est démontré que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ soluble favorise une vasoconstriction des artères cérébrales, mais le mécanisme étudié implique souvent une altération des cellules endothéliales par la production de ROS (*reactive oxygen species*) (Thomas *et al.* 1997; Niwa *et al.* 2000; Gentile *et al.* 2004) alors que les mécanismes impliquant la contractilité des CMLV sont peu étudiés. Nous avons mis en évidence que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ altère la réponse calcique à différents agents vasoconstricteurs dans nos deux modèles de CMLV. La réponse calcique à des agents vasoconstricteurs est réduite dans les CMLV aortiques exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ en comparaison aux cellules non traitées, alors qu'elle est augmentée dans les CMLV cérébrales. Cette différence d'effet sur les deux modèles d'origine vasculaire différente et leur pertinence dans un contexte physiopathologique seront développées dans la *partie III* de la discussion. Cependant, l'étude réalisée sur les CMLV cérébrales qui par manque de temps n'a pu être autant approfondie que celle sur les CMLV aortiques, fournie des résultats

qui sont en accord ceux obtenus au cours de l'étude *ex vivo* menée sur l'artère basilaire de rat. Dans un objectif de clarté nous discuterons de ces résultats séparément.

I.2.1. *La capacité contractile des CMLV aortiques est réduite par le peptide Aβ_{1-40}*

Le peptide Aβ_{1-40} modifie la dynamique de production de calcium dans les CMLV aortiques à deux niveaux, il réduit l'amplitude de la réponse calcique à l'angiotensine II et augmente le niveau intracellulaire basal de calcium $[Ca^{2+}]_i$. Ces modifications contribuent à réduire la capacité contractile de la cellule.

L'angiotensine II stimule une réponse calcique transitoire mais forte dans les CMLV, à travers sa liaison au récepteur AT1R couplé Gαq qui active la voie de la PLCβ/IP3 permettant la libération de calcium depuis le réticulum endoplasmique. L'angiotensine II peut aussi se lier à un autre récepteur l'AT2R, dont le couplage reste incertain et très controversé, mais dont l'activation antagoniserait les effets de l'ATR1 (Porrello *et al.* 2009; Forrester *et al.* 2018). Le récepteur AT2R est moins étudié en raison de sa faible abondance et son expression diminue après la naissance mais peut de nouveau augmenter lors d'une lésion ou en contexte inflammatoire, ce qui suggère que ce récepteur joue un rôle dans la réparation tissulaire. Cependant, certaines études lui confèrent également une action vasorelaxante via le GMPc et le NO (Wynne *et al.* 2009). On peut alors suggérer que le peptide Aβ_{1-40} en altérant le structure de la CMLV (Davis *et al.* 1999), pousserait la cellule à exprimer le récepteur AT2R afin d'initier des voies de réparation et réduirait alors l'effet de l'angiotensine II médié par l'AT1R, ce qui expliquerait la diminution de la réponse calcique (*Figure R2.5*). Pour le confirmer nous avons mesuré l'expression des transcrits de ces récepteurs dans les CMLV traitées et non traitées. Ces expériences ont démontré que l'expression de l'AT1R n'est pas modifiée mais que celle de l'AT2R semble réduite par le peptide, ce qui n'est pas cohérent avec l'hypothèse proposée mais aussi au regard de nos résultats (*Figure R2.5*). Ce résultat de PCR quantitative doit être pris avec précautions. En effet, nos résultats sont normalisés par rapport à la moyenne des contrôles et par rapport à un gène de référence fortement exprimé dans les cellules, de ce fait si la cible étudiée est très faiblement exprimée, comme dans le cas des AT2R, on obtient des valeurs proches de zéro et la moindre variation va augmenter de façon importante le « fold induction ». Ainsi pour confirmer cette hypothèse, il faudrait évaluer l'expression protéique de ces récepteurs.

Au regard de la faible expression des AT2R et de l'indisponibilité d'anticorps spécifiques, le western blot n'est pas une méthode envisageable. L'autre possibilité pour mesurer l'expression de ces récepteurs serait donc de réaliser des expériences de liaison à l'équilibre avec des radio-ligands (binding), avec de l'angiotensine II marquée en présence d'antagonistes sélectifs, comme le losartan (ATR1) ou l'olodanrigan (ATR2), mais la pharmacologie pour l'ATR2 est limitée et peu sélective. Concernant les autres agonistes testés, le signal obtenu était faible ou inexistant. La mise en culture des CMLV est une cause probable de cette absence de réponse. Pour exemple, il a été montré que les récepteurs α1-adrénergiques ne sont plus exprimés par les CMLV en culture rendant la stimulation à la phénylephrine inefficace (Fan *et al.* 2009). Pour autant, cela est moins clair pour l'expression des récepteurs à l'endothéline I (ET_A *et* ET_B). Ces deux récepteurs favorisent un effet vasoconstricteur de l'endothéline I même s'il a été montré que l'ET_B peut également indirectement favoriser la vasorelaxation des CMLV en activant la production de NO par les cellules endothéliales (Wynne *et al.* 2009; Miller *et al.* 2017). Si une étude démontre que des cultures primaires de CMLV d'artères humaines expriment préférentiellement ET_A et n'expriment presque plus l'ET_B (Conant *et al.* 2002), une autre étude montre que l'expression de l'ET_B est augmentée dans les CMLV en culture, ce qui pourrait expliquer l'absence de signal calcique fort sans pour autant constituer une preuve irréfutable (Eguchi *et al.* 1994).

Indépendamment de l'effet du peptide Aβ, nous avons également voulu étudier l'origine du signal calcique en exposant les cellules à un milieu extracellulaire dépourvu de calcium (BBS sans calcium) avant de stimuler la réponse calcique avec de l'angiotensine II, afin de mettre en évidence une libération de calcium depuis les stocks. En l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, on observe une réduction importante de l'amplitude de la réponse calcique (résultats non présentés), ce qui suggère qu'une partie du calcium cytosolique mesuré proviendrait d'un influx extracellulaire mais également que l'autre partie est issue d'une libération depuis les stocks intracellulaires. Compte tenu du caractère transitoire et rapide de la réponse calcique à l'angiotensine II, on peut supposer que cet influx extracellulaire serait effectué par les ROC (*Receptor Operated Channel*) plutôt que les SOC même si une déplétion des stocks intracellulaires (RE) pourrait les activer à plus long terme. En effet, plusieurs membres des TRPC (*Transient receptor potential channel*) exprimés dans les CMLV

sont identifiés comme des ROC (Wynne *et al.* 2009), et une étude a démontré que l'angiotensine II pouvait activer directement les TRPC6 (Saleh *et al.* 2006), provoquant ainsi un influx extracellulaire de calcium en plus de sa libération depuis le RE.

Nous avons également remarqué que le peptide $A\beta_{1-40}$ augmente le niveau intracellulaire basal de calcium (*Figure R2.5*). Cette augmentation pourrait provenir d'un influx de calcium extracellulaire puisque de nombreuses études ont montré que les oligomères de peptide Aβ, mais pas les monomères ou les fibrilles pouvait se lier directement aux membranes cellulaires et former des pores dans les membranes à bicouche lipidique et dans la membrane mitochondriale (Kagan 2012; Mrdenovic *et al.* 2022). Une étude pionnière menée par Arispe et ses collaborateurs en 1993, a mis en évidence la formation de pores membranaire par le peptide $A\beta_{1-40}$, agissant comme des canaux cationiques voltage indépendants non sélectifs (Ca^{2+}, K^+, Na^+). Ces auteurs ont proposé que ces pores en augmentant la perméabilité de la membrane, étaient à l'origine d'une rupture de l'homéostasie calcique et d'une élévation du $[Ca^{2+}]_i$ potentiellement toxique pour la cellule (Arispe *et al.* 1993). D'autres études ont ensuite confirmé *in vitro* et *in vivo* l'existence de ces pores ailleurs, dans les neurones, les fibroblastes ou les liposomes (Fraser *et al.* 1997; Lin *et al.* 1999), et ont aussi démontré que le peptide $A\beta_{1-42}$ formait également des pores dont les propriétés structurelles sont similaires à ceux formés par le $A\beta_{1-40}$ mais dont la nature des courants ioniques varie (Hirakura *et al.* 1999; Serra-Batiste *et al.* 2016). Ils ont également décrit quatre phénotypes différents de ces pores selon l'état d'agrégation du peptide $A\beta_{1-40}$ (Kourie *et al.* 2001). Depuis, des études ont été menées pour comprendre l'implication pathologique de ces pores grâce à des modèles de membranes *in silico* (Quist *et al.* 2005; Jang *et al.* 2008). Une autre explication possible de cette élévation du niveau de $[Ca^{2+}]_i$ au repos serait l'existence d'un défaut de recapture du calcium vers les stocks intracellulaires impliquant les pompes SERCA (Hasenfuss *et al.* 1994). En effet, une activité défectueuse de la pompe SERCA est souvent associée à une dérégulation de l'homéostasie calcique dans la MA et constitue même une cible thérapeutique (Krajnak and Dahl 2018). Par ailleurs, ce type d'altération est souvent associée à un retard dans la relaxation des cellules contractiles ce qui est en accord avec nos résultats (Gwathmey *et al.* 1987). De plus, l'élévation du niveau de $[Ca^{2+}]_i$ basal est un mécanisme impliqué dans de nombreuses

pathologies cardiovasculaires (Lou *et al.* 2012), dont l'insuffisance cardiaque à travers une altération de la fonction diastolique (Gwathmey *et al.* 1991; Beuckelmann *et al.* 1992).

I.2.2. *La capacité contractile des CMLV cérébrales est augmentée par le peptide A$\beta_{1\text{-}40}$*

Les premières expériences réalisées dans le modèle de cultures primaires de CMLV cérébrales, montrent que l'exposition au peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ a tendance à augmenter l'amplitude de la réponse calcique. Ce résultat est certes en opposition avec l'effet du peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ dans les CMLV aortiques mais est en accord avec l'augmentation de la vasoconstriction mesurée *ex vivo* dans l'artère basilaire de rat. Les données obtenues sur la signalisation calcique dans ce modèle cellulaire plus proche de la physiologie cérébrale, nous semblent donc plus pertinentes à utiliser lors de l'intégration de notre étude dans un contexte pathologique.

Les CMLV cérébrales ne répondant pas à l'angiotensine II, nous avons utilisé un autre agoniste vasoconstricteur (U46619) dont la réceptivité et la capacité à induire une réponse calcique ont été vérifiées lors des expériences menées *ex vivo* sur des artères cérébrales. L'U46619, analogue du thromboxane A2 en se liant à son récepteur (TP) couplé Gαq active la voie de la PLCβ qui permet la libération de calcium depuis le RE et l'augmentation de calcium intracellulaire initiant la contraction de la CMLV. Dans nos expériences, nous avons observé que le signal calcique produit en réponse à l'U46619 diffère de celui de l'angiotensine II, en effet on voit apparaitre un plateau calcique et non pas un transitoire calcique suggérant un mécanisme de mobilisation du calcium différent.

Nos premiers résultats démontrent une tendance du peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ à amplifier la réponse calcique à l'U46619 et *in fine* à augmenter la capacité contractile des CMLV (*Figure R2.12*). Ce résultat appuie les données de précédentes études qui démontrent que dans les AAC et dans la MA, les CMLV adoptent un phénotype hypercontractile (Chow *et al.* 2007; Bell *et al.* 2009). En effet, ces études ont rapporté que chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et dans plusieurs modèles murins, la surexpression de facteurs de transcription régulant l'expression des protéines contractiles dans les CMLV génère un phénotype hypercontractile qui de plus, présente une réduction des récepteurs impliqués dans la clairance des peptides Aβ. L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de l'augmentation de la capacité contractile des CMLV dans la pathogénèse puisque l'on

retrouve à la fois des altérations fonctionnelles (contraction dépendante du calcium) et génétiques (modification de l'expression de protéines contractiles). Similairement aux CMLV aortiques le niveau de calcium intracellulaire basal présente une tendance à l'augmentation dans les CMLV exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, ce qui contribue d'autant plus à maintenir les cellules dans un état hypercontractile.

In fine, nous avons mis en évidence que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ amplifie la réponse calcique des CMLV à un stimulus vasoconstricteur et élève le niveau de calcium intracellulaire basal au repos, résultant en une hypercontractilité de la CMLV. Cette hypercontractilité est également soutenue par la diminution du niveau d'AMPc en réponse à un agoniste vasodilatateur conduisant à la réduction de la capacité dilatatoire de la cellule comme discuté dans la partie précédente. Même si nos résultats apportent un premier niveau de compréhension des voies de signalisations impliquées dans l'apparition d'un phénotype hypercontractile des CMLV, des expériences complémentaires restent nécessaires afin d'identifier avec plus de précision les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation de la réponse calcique.

I.3. Altérations des CMLV dans les maladies neurodégénératives et cérébrovasculaires

Plusieurs études suggèrent qu'un dysfonctionnement des CMLV pourrait, au-delà de la maladie d'Alzheimer, être impliqué dans le développement d'autres pathologies neurodégénératives ou cérébrovasculaires (Hayes *et al.* 2022). Parmi ces pathologies, on retrouve la maladie de Charcot (*ALS-Amyotrophic Lateral Sclerosis*) et les Small Vessels Disease (*CADASIL*) dans lesquelles il est suggéré qu'une augmentation de la concentration de l'angiotensine II entrainerait une élévation des ROS et modifierait le phénotype des CMLV conduisant à un remodelage vasculaire (Sorrentino *et al.* 2022; Virdis *et al.* 2004). Une implication des CMLV est également suggérée dans la maladie d'Huntington où il a été montré dans un modèle murin que la contractilité était réduite suite à des fluctuations du niveau de calcium (Rahman *et al.* 2013) et à une augmentation de l'expression de la MYPT1 (sous unité régulatrice de la MLCP essentielle pour la relaxation) et de ROCK (Rho kinase contribuant à la sensibilisation au calcium lors de la contraction)(Narayanan *et al.* 2016). Dans la démence à corps de Lewy et dans la maladie de Parkinson, le rôle des CMLV est moins évident puisque les études mettent en avant la réduction du débit sanguin cérébral

sans étudier les CMLV précisément (Miners *et al.* 2014). *In fine*, ces études présentent surtout des corrélations entre le dysfonctionnement des CMLV et les pathologies évoquées ci-dessus, et parmi elles certaines ont été plus largement étudiées que d'autres, sans oublier que les méthodologies varient considérablement entre les études. Cependant, les arguments avancés mettent en évidence le rôle critique du dysfonctionnement des CMLV dans le développement et la progression de neurodégénérescences, ainsi que la nécessité d'une investigation plus approfondie sur les CMLV et la dynamique cérébrovasculaire dans les maladies neurodégénératives.

II. Altération de la réactivité vasculaire par le peptide Aβ dans le modèle d'artère basilaire de rat

Les CMLV constituent les premiers régulateurs de la dynamique cérébrovasculaire et de la variation du débit sanguin cérébral pour assurer les besoins en oxygène et en nutriments du cerveau. Ainsi un dysfonctionnement de la contractilité des CMLV en réponse à des signaux vasomodulateurs comme nous l'avons montré dans cette étude, impacterait forcément la réactivité vasculaire.

A la fin des années 1990, plusieurs études menées *in vitro et ex-vivo* sur des artères cérébrales (MCA, PCA, BA) de différentes espèces (rat, souris, bœuf, Homme), soutenaient déjà l'hypothèse que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ soluble entrainait la constriction du vaisseau en réponse à des vasoconstricteurs tels que l'endothéline I ou la sérotonine, et réduisait la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine ou la bradykinine (Paris *et al.* 2003; Thomas *et al.* 1996; Thomas *et al.* 1997; Price *et al.* 1997; Niwa *et al.* 2000). De plus, la vasoconstriction observée sur les artères cérébrales exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ a rapidement été reliée *in vivo* à une réduction du débit sanguin cérébral et à une augmentation de la résistance vasculaire par Suo et ses collaborateurs (Suo *et al.* 1998). Dans notre étude *ex vivo*, nous n'avons pas pu mettre en évidence de relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine. L'acétylcholine se lie aux récepteurs muscariniques, permettant l'activation de la eNOS (*endothelial NO-synthase*) et la sécrétion de NO par les cellules endothéliales, qui va activer dans les CMLV la GCs (*guanylyl cyclase soluble*) et la production de GMPc, stimulant *in fine* la relaxation de la cellule. Deux

hypothèses peuvent expliquer cette absence de réponse à l'acétylcholine : i) une altération mécanique de l'endothélium et ii) une altération structurelle due à un traitement prolongé de l'artère en présence du peptide $A\beta_{1-40}$. En effet, lors du montage, étape critique de l'expérience, le frottement du fil (de 25µm d'épaisseur) lors de son passage dans la lumière de l'artère peut endommager l'endothélium, au regard du petit diamètre des artères basilaires de rat (environ 200µm). Cette hypothèse est appuyée par l'apparition d'une réponse relaxante à l'acétylcholine dans les artères contrôles après plusieurs semaines d'expérimentation, corrélée avec une meilleure maitrise de la technique de ma part. Cependant, malgré des mouvements plus fins et précis, aucune réponse à l'acétylcholine n'a pu être obtenue avec les artères traitées au peptide $A\beta_{1-40}$. Cette absence de réponse serait liée à notre protocole qui nécessite un temps d'incubation long (48h) en présence du peptide $A\beta_{1-40}$. En effet, une étude a montré qu'après seulement 24h de culture en présence de 25µM de peptide $A\beta_{1-40}$ la vasodilatation induite en réponse à l'acétylcholine par l'endothélium des artères basilaires de rats est altérée (Chisari *et al.* 2010). De plus, les études de la fin des années 1990 citées précédemment, démontrant que le peptide $A\beta_{1-40}$ réduit la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine ou la bradykinine, ont été réalisées avec du peptide Aβ injecté (ou infusé) au moment de l'expérience et non pas mis en culture avec les vaisseaux comme dans le protocole que nous avons mis en place. Toutes ces raisons expliquent l'absence de réponse relaxante à l'acétylcholine dans nos expériences. *In fine*, contrairement aux précédentes études, les mesures de réactivité vasculaire que nous avons réalisées ne reflèteraient donc que la capacité des CMLV à se contracter ou à se dilater en réponse aux stimulus vasomodulateurs ce qui nous permet d'étudier spécifiquement le rôle de ces CMLV et de l'intégration des signaux vasomodulateurs dans les altérations de tonus vasculaire médiées par le peptide $A\beta_{1-40}$.

L'étude de réactivité vasculaire a démontré qu'en réponse à un agent vasoconstricteur (U46619) la contraction des artères basilaires (BA) exposées au peptide $A\beta_{1-40}$ est plus importante que celle des artères contrôles, ce qui à la fois confirme l'effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la capacité contractile des artères cérébrales avancée par les études précédemment citées et confirme *ex vivo* l'hypercontractilité observée dans le modèle de CMLV cérébrales en réponse au même agent vasoconstricteur (*Figure R2.8B*). Le peptide

$A\beta_{1\text{-}40}$ induit également une diminution de la vasorelaxation des artères basilaires en réponse à un agent vasodilatateur, l'isoprotérénol, contribuant d'autant plus à l'augmentation de la vasoconstriction et de la résistance vasculaire (*Figure R2.9B*) et altérant ainsi les propriétés vasomodulatrices des artères cérébrales. Nos résultats démontrent que l'altération de la vasoréactivité est comme nous l'indiquent les valeurs d'EC50, liée à une modification de la sensibilité de la réceptivité des CMLV aux agents vasomodulateurs. En effet, les artères exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ sont plus sensibles à l'U46619 (EC50 diminué) et moins sensibles à l'Isoprotérénol (EC50 augmenté), ce qui reflète respectivement *ex-vivo*, l'augmentation de la réponse calcique via les récepteurs au thromboxane A2 et la diminution de la réponse AMPc via les récepteurs β-adrénergiques. Notre étude suggère l'existence d'un mécanisme moléculaire par lequel le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ altèrerait la vasoréactivité en modifiant la réceptivité des CMLV (récepteurs au thromboxane A2 et β-adrénergiques). La modification de la sensibilité des RCPG ou d'autres types de récepteurs à un stimulus (ligands) est un mécanisme retrouvé dans diverses pathologies : on peut citer le cas de la maladie d'Huntington avec une augmentation de la sensibilité du récepteur NMDA (Zeron *et al.* 2002) ou l'augmentation de la sensibilité des récepteurs α1-adrénergiques dans les troubles de stress post-traumatiques (PTSD) (Hartwig *et al.* 2020) ou encore une diminution de la sensibilité au catécholamines des récepteurs β-adrénergiques dans certaines insuffisances cardiaques (Bristow *et al.* 1982).

Au cours de cette étude nous avons dû par manque de temps prioriser les vasomodulateurs testés sur les CMLV en culture limitant ainsi la diversité de molécules utilisées. Maintenant que nous avons démontré que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ altère la réceptivité des CMLV et de ce fait l'intégration des signaux modulant la contractilité des CMLV, il serait intéressant de tester cet effet avec d'autres vasomodulateurs physiologioques tels que la phényléphrine, l'endothéline I ou encore la sérotonine. Concernant la forskoline, l'absence de différence entre la réponse vasodilatatrice (à la forskoline) des artères contrôles et traitées *ex vivo* peut surprendre puisqu'au niveau cellulaire on observait une diminution de la production de l'AMPc suite au traitement $A\beta_{1\text{-}40}$. En effet, *ex vivo* la relaxation est induite à de faibles concentrations (à partir de 100nM vs *in vitro* 2µM de forskoline) et semble similaire entre les deux conditions (*Figure R2.9A*). Cependant, la relaxation observée ne reflète peut-être pas uniquement l'effet de la forskoline, puisque la forskoline est solubilisée

dans du DMSO (*diméthylsulfoxyde*), et la présence de ce dernier dans le bain (même s'il est dilué) pourrait biaiser l'effet observé. Des études ont par ailleurs démontré que le DMSO pouvait avoir un effet vasodilatateur (Kaneda *et al.* 2016; Smith *et al.* 2017). Aussi, il faudrait réaliser un contrôle de cette expérience en présence de DMSO seul ou bien reproduire l'expérience avec un analogue hydrophile de la forskoline (L858051) ne nécessitant pas d'être solubilisé dans du DMSO.

L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse selon laquelle le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ jouerait un rôle dans les altérations vasculaires liées aux AAC et à la MA, et donne des pistes pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués. La capacité réduite des artères à répondre à un stimulus vasoconstricteur ou vasodilatateur, est le signe que l'autorégulation du CBF est altérée (*Figure I2.11*). Ainsi, la vasoconstriction amplifiée et la vasodilatation réduite illustrent de quelle manière les dépôts de peptides Aβ pourraient conduire à la réduction du CBF et aux hypoperfusions retrouvées dans la MA et dans les AAC (Johnson *et al.* 2005; Chung *et al.* 2009).

Dans notre étude, le protocole de traitement utilisé, qu'il soit *ex vivo* ou *in vitro*, est limité à 48h et avec une dose relativement importante de peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, et ne reflète pas les effets à long terme d'une accumulation de dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux. En effet dans les AAC sévères, les artères sont rigidifiées par la perte totale des CMLV et deviennent tributaire des contraintes mécaniques exercées par le flux sanguin. Les artères ne disposant plus de CMLV capables de se contracter pour exercer une résistance vasculaire lors d'une élévation de la pression artérielle et ainsi réduire le CBF, cela conduit à une dilatation mécanique passive et aux microhémorragies retrouvées dans les stades sévères de la pathologie. Ces microhémorragies peuvent aussi faire suite à la rupture de la paroi artérielle en conséquence de la dégénérescence des CMLV (Kawai *et al.* 1993). Aussi une cinétique plus progressive de l'apparition des dépôts amyloïdes permettrait d'étudier la nature des différents types d'altérations vasculaires (à l'échelle moléculaire, cellulaire ou fonctionnel), tout au long du développement de la pathologie. Il existe divers modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer, et plus particulièrement deux qui développent à la fois des dépôts parenchymateux et vasculaires, tout au long de la vie de l'animal, associés à des altérations diverses (cognitives, microhémorragies, etc.). Les modèles de souris transgéniques Tg2576 (Hsiao *et al.* 1996), déjà utilisés au laboratoire pour mener une étude

sur l'inflammation cérébrovasculaire (Hur *et al.* 2018) ou le modèle APP23 (Sturchler-Pierrat *et al.* 1997) pourraient être utilisés pour étudier à la fois *in vivo*, les altérations des voies de signalisation par imagerie bi-photonique ou sur tranches de cerveau (Polito *et al.* 2014), en croisant ces souris avec des souris transgéniques exprimant des biosenseurs AMPc ou calcique dans les CMLV (Kasatkina and Verkhusha 2022), mais également en étudiant sur ces mêmes souris, la réactivité vasculaire grâce à des expériences de wire-myographie après avoir prélevé les artères cérébrales. Des modèles de souris transgéniques exprimant un biosenseur AMPc capable de rendre compte de l'intégration des signaux par les RCPG dans les neurones ont déjà été testés (Muntean *et al.* 2018) tout comme des modèles murins exprimant des biosenseurs calciques dérivés de GCaMP6 (T*hy1-GCaMP6s and Thy1-GCaMP6f*) (Chen *et al.* 2013). Très récemment, des équipes américaines ont mis au point un système extrêmement complexe de mesure par fibre optique de paramètres de réactivité cérébrovasculaire sur des souris modèles AD vigiles (Gareau *et al.* 2023), qui permettrait de s'affranchir des effets de l'anesthésie pouvant affecter la réactivité vasculaire.

III. Origine vasculaire et choix du modèle d'étude

Les CMLV des artères cérébrales ont les mêmes fonctions que les CMLV des artères aortiques ou issues d'autres territoires vasculaires : i) synthétiser et assurer le renouvellement des composants de la MEC et ii) moduler le tonus vasculaire en se contractant ou en se dilatant afin maintenir un débit sanguin constant. Même si les artères cérébrales régulent le débit sanguin cérébral, leur résistance est différente de celle de l'aorte qui doit assurer un flux constant et assez puissant pour distribuer le sang à tous les organes. Pendant longtemps le phénotype des CMLV a été considéré comme universel tout le long de l'arbre vasculaire et cela malgré des origines embryonnaires diverses, contribuant ainsi à l'utilisation dans les études scientifiques de modèles de CMLV dont l'origine vasculaire diffère de celle de la pathologie étudiée (Majesky 2007b). Notre étude des altérations neurovasculaires retrouvées dans les AAC réalisée au départ sur des CMLV aortiques puis sur des CMLV cérébrales ; ainsi que les différences de réceptivité et de réponse myogénique observées entre celles-ci témoignent au contraire de l'importance de la notion de territorialité vasculaire. Si la signalisation AMPc semble être très conservée

entre nos deux modèles nous permettant d'interpréter les résultats obtenus avec confiance, la signalisation calcique présente une certaine variabilité et nous poussent à interpréter les résultats obtenus dans les CMLV aortiques avec plus de prudence.

En effet, si les résultats sur le calcium sont similaires entre les artères cérébrales et les artères basilaires, ils sont très différents sur les CMLV aortiques. Cependant, l'intégrité des CMLV cérébrales peut aussi être remise en question, notamment en raison de l'absence de réponse à l'angiotensine II. En effet, le cerveau possède un système rénine-angiotensine similaire à celui de la circulation systémique (Ahmed *et al.* 2018; Jackson *et al.* 2018), et que l'hyperactivation du récepteur AT1R augmente le risque d'accident vasculaire cérébral et contribue à l'apparition d'un déficit cognitif modéré (MCI) (Chrysant 2007). Cependant, une étude en 2017, a montré que l'AT2R dont l'expression est importante dans le tissu cérébral exerce un effet antihypertenseur (de Kloet *et al.* 2017) ; ainsi on pourrait supposer que dans les CMLV cérébrales uniquement, un mécanisme similaire serait mis en place, résultant en un signal calcique de faible amplitude suite à l'activation des récepteurs AT1R et AT2R.

Les différences de résultats obtenus dans notre étude soulignent l'importance de l'origine vasculaire des CMLV et de leur implication dans le développement de pathologies vasculaires (Madden *et al.* 1992b; Archer 1996; Majesky 2007b; Rensen *et al.* 2007; Pfaltzgraff and Bader 2015). L'hétérogénéité des CMLV concernant leur morphologie, leur croissance et l'expression de gènes spécifiques a par ailleurs été identifiée entre différentes régions vasculaires et parfois même au sein de la même région (Shanahan and Weissberg 1998). Ce dernier point est d'autant plus pertinent qu'au-delà de la différence inter territoriale, nous observons dans notre étude une différence intra territoriale dans les réponses cellulaires. Au sein d'une même expérience de biosenseur, on observe des variations dans les amplitudes de réponses calcique ou AMPc entre cellules individuelles, comme le démontrent les allures des traces colorés fines sur les expériences individuelles (*Figure R2.3 ou R2.5*). Le fait que lors de la préparation des cultures primaires de CMLV aortiques, nous utilisions l'aorte sur toute sa longueur, pourrait expliquer ces différences. En effet, les différents segments de l'aorte (abdominale ou dorsale) n'ont pas la même origine embryonnaire ce qui contribue à la diversité phénotypique et fonctionnelle des CMLV (Majesky 2007b), et jouerait un rôle important dans le développement de pathologies telles que l'athérosclérose. Plus précisément certaines études, ont démontré que les segments

thoraciques de l'aorte sont plus résistants à l'athérosclérose que les segments abdominaux d'origine mésodermique (Haimovici 1991; WOYDA *et al.* 1960). De plus, les réponses variables observées d'une cellule à l'autre pourraient résulter des fonctions différentes que doit assurer chaque territoire vasculaire au regard du flux sanguin (Qiu *et al.* 2014; Pfaltzgraff and Bader 2015). Il n'est pas aberrant de supposer que la régulation du débit sanguin cérébral ainsi que les ajustements en réponse à des variations de pression artérielle se doivent d'être plus fins au niveau des artères cérébrales afin d'éviter que l'approvisionnement en nutriments et en oxygène du cerveau ne soit tributaire de chaque variation minime de la pression artérielle systémique. Ainsi, les CMLV présentes dans la paroi des artères cérébrales pourrait présenter une sensibilité réduite à certains stimuli physiques ou biochimiques environnementaux pour ne réagir qu'en cas de variations importantes. Ceci pourrait signifier que les concentrations d'agonistes que nous avons utilisées dans les études sur le modèle aortique seraient trop faibles pour stimuler les mêmes récepteurs au niveau des artères cérébrales et constituerait une autre explication probable de la réponse calcique réduite à l'angiotensine II.

In fine, le développement du modèle de CMLV cérébrales nous a permis d'adopter un regard plus critique vis-à-vis du choix des modèles et de la pertinence de ce modèle dans des études visant à étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans une pathologie.

IV. Angiopathie Amyloïde Cérébrale et Maladie d'Alzheimer : un rôle prépondérant de l'atteinte vasculaire ?

Aujourd'hui encore, personne ne peut affirmer avec certitude qu'une atteinte neurovasculaire est l'élément déclencheur de la Maladie d'Alzheimer, ou que ces atteintes ne soient que la conséquence de cette dernière. Cependant, les études comparatives à ce sujet sont de plus nombreuses et viennent nourrir un débat très ancien. En effet, plus de 25 ans en arrière il a été suggéré que les altérations vasculaires menant à la rupture de la BHE au niveau des capillaires (AAC type I) pouvaient être importantes dans le développement de la MA (Scheibel *et al.* 1989). Ce débat prend encore plus de sens quand on observe la superposition des deux pathologies chez les patients (80% des patients Alzheimer présentent une AAC) ou plus simplement quand on sait que l'AAC comme la MA sont

causées par un dépôt de peptides Aβ et que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ majoritaire dans les AAC représente 90% de la production totale de peptides Aβ (Thinakaran and Koo 2008). De nombreuses études d'imagerie cérébrale réalisées *in vivo* chez l'Homme et dans des modèles animaux de la MA ont même démontré que le peptide Aβ sous formes monomériques et oligomériques solubles, induit des altérations vasculaires avant même l'apparition de plaques amyloïdes ou de troubles cognitifs (*voir partie IV.2 de l'introduction*). De plus, il apparait que les dépôts amyloïdes vasculaires seraient des prédicteurs plus sensibles de démence sénile que les dépôts parenchymateux (Esiri *et al.* 2001). Ainsi, si l'on souhaite soutenir l'hypothèse que l'AAC précèderait ou même initierait la MA, il faut à mon sens, souligner le fait que les altérations vasculaires induisent la neurodégénérescence de deux manières différentes : par une rupture de l'intégrité vasculaire induisant une neurotoxicité et par une altération du tonus vasculaire réduisant le débit sanguin cérébral. Ces altérations participeraient donc ainsi à la dégénérescence neuronale et à la neuro-inflammation, auxquels s'ajouteraient les filaments appariés en hélices associés aux tauopathies.

L'intégrité de la paroi vasculaire est altérée par les dépôts de peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ qui entrainent la mort par apoptose des cellules endothéliales ainsi que des CMLV (Fossati *et al.* 2012) mais également la dégradation par les MMP de la lame basale et des protéines d'adhésion cellulaire (Lee *et al.* 2005), le tout conduisant à une perméabilisation de la BHE. La BHE n'exerçant plus son rôle de barrière, elle permet l'entrée de protéines plasmatiques toxiques dans le SNC (thrombin, fibrinogen, CRP, etc.) (Deane *et al.* 2003), la libération de médiateurs inflammatoires, d'espèces réactives de l'oxygène ou encore de métalloprotéinases matricielles, le tout résultant en une toxicité neuronale et *in fine* à la neurodégénérescence (Jeon *et al.* 2021). Une autre conséquence de l'altération de la paroi vasculaire par le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ démontrant l'implication de l'AAC dans le développement de la MA, est la diminution de la clairance du peptide Aβ par les voies de drainage périvasculaire qui contribue alors à l'accumulation de peptides Aβ dans le parenchyme cérébral et au développement de plaques séniles (Weller *et al.* 2009).

Le signe clinique le plus marquant d'une atteinte vasculaire précédent le développement de la MA est la réduction du débit sanguin cérébral. Cette diminution du CBF a été observée *in vivo* chez des patients atteints d'AAC et/ou de la MA par des

techniques d'imagerie (IRM, IRMf, Doppler, SPECT) (*voir partie IV.2 de l'introduction*). Et nous avons au cours de notre étude étayé la compréhension des altérations des mécanismes moléculaires induites par le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ et qui seraient à l'origine de la réduction du CBF. En effet, d'une part nous avons confirmé que le peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ est à l'origine du phénotype hypercontractile des CMLV observé dans les AAC et la MA (Chow *et al.* 2007; Bell *et al.* 2009) et nous avons montré que cela était dû à une augmentation de la réponse calcique et une diminution des niveaux d'AMPc qui résultent en une vasoconstriction des artères cérébrales menant à de potentielles hypoperfusions. D'autre part nous avons montré que la réceptivité des CMLV étaient profondément altérée puisque la capacité des cellules à répondre aux stimulus vasomodulateurs permettant une adaptation aux variations de PA afin d'adapter le CBF est modifiée. Tout ceci, appuie l'utilisation d'une approche thérapeutique ciblant les acteurs impliqués dans la régulation du tonus vasculaire afin de limiter la réduction du CBF et ainsi assurer l'approvisionnement en nutriments et en oxygène des neurones afin d'éviter la neurodégénérescence (Yasar *et al.* 2013; Affleck *et al.* 2020; Marcolini *et al.* 2022).

L'existence d'un nombre de revues conséquents traitant du lien entre l'AAC et la MA témoignent de l'importance de cette question biologique (Greenberg *et al.* 2020; Strickland 2018; Ghiso *et al.* 2010; de la Torre 2004; Bell and Zlokovic 2009). Par ailleurs, les arguments avancés par ces articles sont très différents, ce qui n'est pas surprenant puisque que les mécanismes pathologiques reliant ces deux pathologies le sont également. En effet, la maladie d'Alzheimer devrait être considérée comme un syndrome multifactoriel avec divers mécanismes pathologiques contributifs. Par conséquent, comme c'est actuellement le cas avec le cancer, il parait crucial de classer les patients en fonction de leur signature pathologique spécifique, afin que chaque pathologie sous-jacente, telle qu'une altération des voies vasculaires, puissent être prise en compte dans l'approche thérapeutique mise en place.

V. CONCLUSION

A l'issue des deux années passées sur ce projet, l'ensemble des résultats obtenus confirment que les dépôts de peptide $A\beta_{1-40}$ altèrent la réactivité vasculaire cérébrale et démontrent qu'une altération de l'intégration des signaux vasomodulateurs par les CMLV en est à l'origine. Le peptide réduit la capacité dilatatoire des CMLV en diminuant le niveau d'AMPc produit en réponse à un agoniste β-adrénergique ou à la forskoline. Nos résultats suggèrent que cette diminution pourrait être en partie due à une augmentation de l'activité PDE3. Cependant, ces expériences doivent être reproduites sur le modèle de CMLV cérébrales pour être certain que ce mécanisme n'est pas spécifique aux CMLV aortiques. Des expériences complémentaires vérifiant qu'il n'y a pas de modification du niveau d'expression protéique de la PDE3 sont également nécessaires pour confirmer ce résultat mais tout indique que la PDE3 serait une cible thérapeutique intéressante à envisager dans le contexte de l'AAC. Les mesures de contractilité *ex vivo* suggèrent en plus que la sensibilité aux ligands des récepteurs β-adrénergiques serait réduite par le traitement Aβ alors que celle des récepteurs aux Thromboxane A2 serait augmentée, ce qui respectivement conduit à une diminution de la vasodilatation et une augmentation de la vasoconstriction des artères basilaires. Par ailleurs, la vasoconstriction est amplifiée par une augmentation de la réponse calcique à l'U46619 et du niveau intracellulaire basal de calcium dans les CMLV cérébrales traitées au peptide $A\beta_{1-40}$. L'ensemble de ces résultats confirment à la fois le phénotype hypercontractile des CMLV et la vasoconstriction des artères cérébrales précédemment décrits par la littérature et associés à la MA.

Ce projet a également mis en évidence la limite de nos modèles de culture primaires cellulaires, dont la réceptivité et la sensibilité peuvent différer selon l'origine vasculaire ou suite à la mise en culture. Mais ces modèles cellulaires représentent également une difficulté par leur vitesse de croissance différentes, nous amenant régulièrement à adapter le niveau d'ensemencement. Or il a été montré que la confluence des CMLV en culture avait une influence sur la signalisation AMPc (Belacel-Ouari *et al.* 2017). A long terme il serait plus intéressant et pertinent de travailler sur un modèle animal de la pathologie. Nous pourrions également profiter de l'existence de modèles transgéniques exprimant des biosenseurs afin d'étudier *ex-vivo* ou *in vitro* les signalisations AMPc et Calcium, comme expliqué dans la discussion. L'utilisation du modèle animal éliminerait également les difficultés liées à la

préparation du peptide $A\beta_{1-40}$ (état d'oligomérisation) et à sa toxicité ou son efficacité qui sont variables selon le lot de peptide utilisé.

Les résultats de cette étude bien qu'ils soient encore préliminaires ont permis une avancée dans notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de la réactivité vasculaire induite par le peptide $A\beta_{1-40}$. Mais ils ont surtout démontré que les CMLV pouvaient être étudiées afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques visant à réduire les altérations du débit sanguin cérébral dans le contexte des AAC et de la MA, mais également à limiter l'apparition d'hypoperfusions et/ou de microhémorragies chez les patients.

CONCLUSION GENERALE

De nos jours, l'implication des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) dans un grand nombre de pathologies n'est plus ignorée, mais reste sous-estimée. Si le rôle central que jouent les altérations des CMLV dans le développement de la plaque d'athérosclérose et la resténose post angioplastie n'est plus débattu (Basatemur *et al.* 2019; Smith *et al.* 2019; Cao *et al.* 2022), l'étude de leur rôle dans d'autres pathologies et d'autant plus dans des pathologies qui ne sont pas d'origine vasculaire reste mineure. En effet, malgré les preuves émergentes suggérant des contributions vasculaires à un stade précoce de maladies neurodégénératives. Si le rôle des CMLV dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer n'est toujours pas bien compris (Nelson *et al.* 2016; Sweeney *et al.* 2018; Hayes *et al.* 2022), ces données émergentes sont en accord avec d'autres qui suggèrent que la maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle, multi-organes avec des facteurs déclencheurs situés au-delà du système nerveux central, comprenant une dysfonction vasculaire et une inflammation, qui peuvent précéder les changements neuropathologiques (de la Torre 2018). Dans ce contexte, les CMLV pourraient jouer un rôle fondamental dans la régulation des processus pathologiques sous-jacents aux maladies cardiovasculaires et à la maladie d'Alzheimer (Frismantiene *et al.* 2018; Mok *et al.* 2006). Ainsi, une amélioration de notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les altérations des CMLV, nous permettrait de voir ces pathologies sous un autre aspect. De plus, cela contribuerait à élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de les prévenir ou de les traiter.

ANNEXES

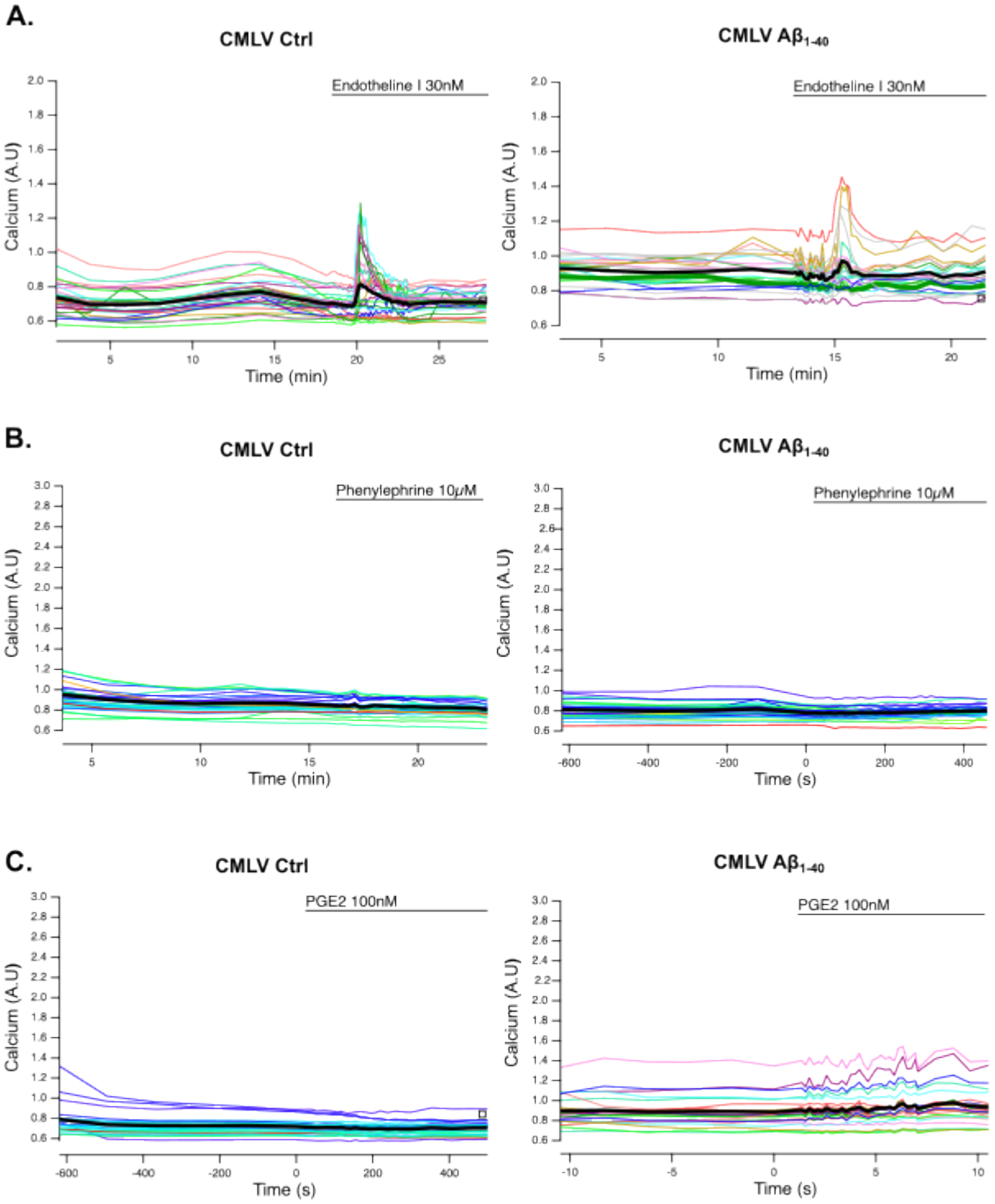


Figure S 1. Réponse calcique des CMLV aortiques à différents agonistes vasoconstricteurs

Le niveau de calcium intracellulaire a été mesuré **(A, B, et C : figure de gauche)** sur des rAo-CMLV contrôles (CMLV Ctrl) ou **(A, B, et C : figure de droite)** traitées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ (CMLV $A\beta_{1\text{-}40}$) (48h), après traitement à l'Endothéline I **(A)**, la Phényléphrine **(B)** ou la PGE2 **(C).** Dans toutes les figures, les traces sont représentatives des mesures de ratio au cours du temps pour chaque cellule individuelle (lignes colorées). La ligne noire représente la moyenne de toutes les cellules pour une expérience indépendante. N =1. Pour chaque agoniste seules les doses efficaces sont présentées pour une expérience indépendante. Chacune de ces expériences a été reproduite 3 fois (résultats non présentés).

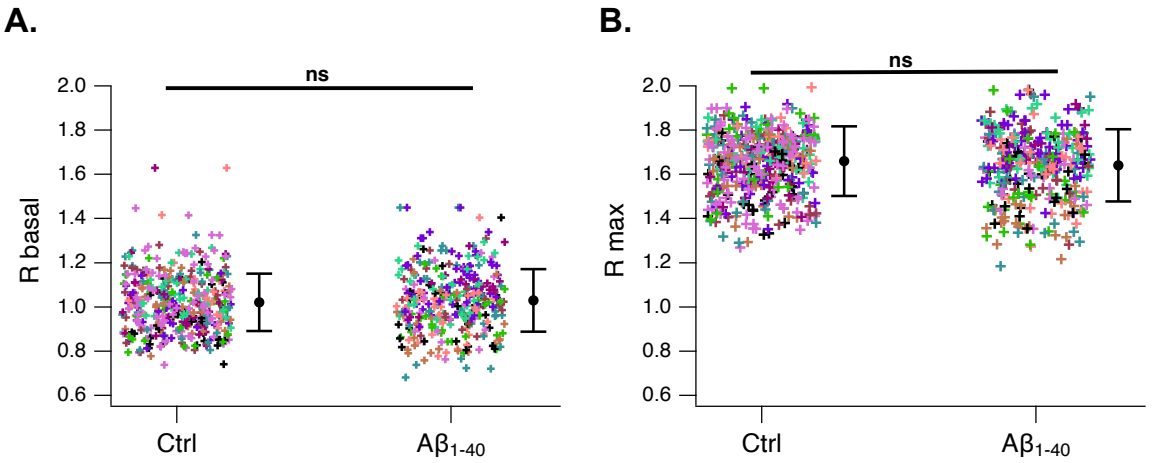


Figure S 2. Comparaison des niveaux d'AMPc à l'état basal et après stimulation maximale dans les CMLV aortiques

Les niveaux d'AMPc à l'état basal (Rbasal) **(A)** et maximal (Rmax obtenu après stimulation avec 12,5µM fsk + 200µM IBMX) **(B)** ont été mesuré à l'aide du biosenseur ^{T}EPAC^{VV} dans des rAo-VSMC contrôles (Ctrl) ou traitées au peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ (48h). Chaque point correspond à une cellule indépendante, issues de N=32 (Ctrl) ou 28 (A$\beta_{1\text{-}40}$) expériences indépendantes.

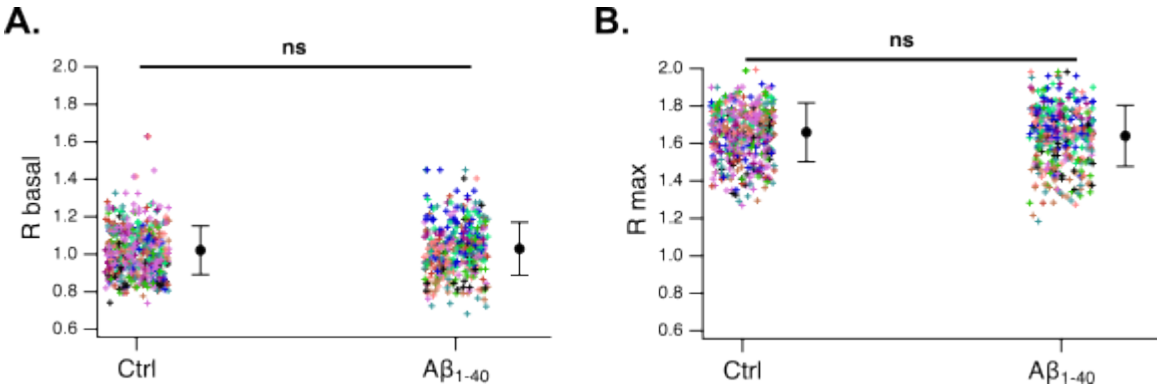


Figure S 3. Comparaison des niveaux d'AMPc à l'état basal et après stimulation maximale dans les CMLV cérébrales

Les niveaux d'AMPc à l'état basal (Rbasal) **(A)** et maximal (Rmax obtenu après stimulation avec 12,5µM fsk + 200µM IBMX) **(B)** ont été mesuré à l'aide du biosenseur ^{T}EPAC^{VV} dans des rB-VSMC contrôles (Ctrl) ou traitées au peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ (48h). Chaque point correspond à une cellule indépendante, issues de N= 13 expériences indépendantes.

Gene Family	Target genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Access Number
Adenylyl cyclases	AC2	TTGAAATCATCAGGCATCATCG	GACGATTGTGAGGGAGATCCG	NM_031007.1
	AC3	TGATCCTGACCATCTGTTCG	GCCACGAGCTTCTTAGGAAAT	NM_130779.2
	AC5	GTCCTTGGCCTCAGAAAGTG	TCCCCGTTCAGGTAGTTGAG	NM_022600.1
	AC6	GCCACCTACGACAGCTCAAT	CACACTCCCGACAAAGTACTCA	NM_001270785.1
	AC8	ATTGCCTCAGTGGTGACTA	CAAACTCTCCTCGGGCT	NM_017142.1
Phosphodiesterases	PDE1A	GAAGTTTCGCAGCATTGTCC	GCAGGATATGTCAAACCAACC	NM_030871
	PDE1C	TGCAGTCCACAACTGTCTCA	GCAGTGCAAGCTGGGATATT	NM_031078.2
	PDE3A	ACCTCCCTGCCCTGCATAC	CCTCTCTTGTGGTCCCATTC	NM_017337
	PDE3B	GTGGCTACAAATGCACCTCA	CTGGGCGAGAAAGATACAGA	NM_017229.2
	PDE4A	CGTCAGTGCTGCGACAGTC	CCAGCGTACTCCGACACACA	NM_013101.4
	PDE4B	GATGAGCAGATCAGGGAACC	GATGGGATTCCACATCGTT	NM_ 017703.3
	PDE4D	GCCAGCCTTCGAACTGTAAG	ATGGATGGTTGGTTGCACAT	NM_001113328.2
Angiotensin II Receptors	AGTR1a	AATGGCTGGCATTTTGTCTGG	CGAAATCCACTTGACCTGGTG	NM_030985.4
	AGTR1b	TGGAGTGAGAGGGTTCAAAGC	AGTGAGTGAGCTGCTTAGCC	NM_031009.2
	AGTR2	TGACTGGCTCTTTGGACCTG	TGCTTGCAAACATGTTCAGGG	NM_012494.3
Prostaglandin E2 Receptors	EP1	CTTCAGCCACTTGTGAATGTGC	TGTATCTGTGCCATCTCGTGAC	NM_001278475.1
	EP3	GATCATGTGTGTACTGTCCGTC	TGCGTCTTGCATTGCTCTACTG	NM_012704.1
	EP4	TGCAGAGATCCAGATGGTCA	TTGATGAACACTCGCACCA	NM_032076
Housekeeping gene	HPRT	GACCGGTTCTGTCATGTCG	ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC	NM_012583.2

Tableau S 1. Liste des primers utilisés pour les expériences de RT-qPCR

Antibody	Species	Targets	Name	Supplier	Dilution	
					WB	IF
Primary	Rabbit	SM22	Ab14106	abcam	-	1/500
	Goat	SM-MHC	Sc-79079	Santa-cruz	-	1/1000
	Mouse	HA-tag [HA.C5]	Ab18181	abcam	1/1000	-
	Goat	AC8-R20			1/1000	-
	Rabbit	Vsv -tag	Ab183497	abcam	1/5000	-
	Mouse	β-actin (clone AC15)	A1978	Sigma	1/4000	-
Secondary	Donkey	Rabbit	A21206 – alexa fluor 488	ThermoFisher	-	1/1000
	Donkey	Goat	A11055 - alexa fluor 488	ThermoFisher	-	1/1000
	Goat	Rabbit	31460	Invitrogen	1/10000	-
	Goat	Mouse	1706516	Biorad	1/2000	-
	Donkey	Goat	PA1-28664	ThermoFisher	1/1000	-

Tableau S 2. Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot et d'immunofluorescence

Function	Target	Name	Supplier	Ref	Affinity/Efficiency	
PDE inhibitors	PDE3	Cilostamide	Tocris	0915	IC_{50}	PDE3A : 27 nM PDE3B : 50 µM
	PDE4	Roflumilast	Tocris	6641	IC_{50}	0,2 – 4,3 nM
	PDE1	AF64196	Lundbeck	-	Ki	PDE1A : 58 nM PDE1B : 14 nM PDE1C : 47 nM
	All PDEs	3-isobutyl-1-méthylxanthine IBMX	Tocris	2845	IC_{50}	PDE4 : 13 µM PDE3 : 18 µM PDE1 : 19 µM PDE5 : 32 µM PDE2 : 50 µM
EP antagonists	EP1	SC 51322	Tocris	2791	Ki	13,8 nM
	EP3	L-798,106	Tocris	3342		0,3 nM
	EP4	ONO-AE3-208	Tocris	3565		1,3 nM
cAMP agonists	AC	Forskoline	Tocris	1099	EC_{50}	0,5µM
	β-adrenergic receptors	Isoproterenol	Tocris	1747	pKi	6-7
	EP receptors	Prostaglandin E2	Tocris	2296	Kd	1-10 nM
	AGTR receptors	Angiotensin II	Tocris	1158	pIC_{50}	9
Calcium agonists	ET receptors	Endothelin I	Tocris	1160	pIC_{50}	7,8 – 8,5
	Muscarinic receptors	Oxotremorine	Tocris	1067	pKi	5
	α1-adrenergic receptors	Phenylephrine	Tocris	2838	pKi	α1d : 5,86 α1b : 4,87 α1A : 4,70
	EP receptors	PGE2	Tocris	2296	Kd	1-10 nM
	TX receptors	U46619	Cayman Chemical	16450	EC_{50}	6 nM

Tableau S 3. Liste des agents pharmacologiques utilisés pour les expériences d'imagerie dynamique

REFERENCES

Adams B. M., Oster M. E., Hebert D. N. (2019) Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum. *Protein J* **38**, 317–329.

Affleck A. J., Sachdev P. S., Stevens J., Halliday G. M. (2020) Antihypertensive medications ameliorate Alzheimer's disease pathology by slowing its propagation. *Alzheimers Dement (N Y)* **6**, e12060.

Ahmadi F., Oveisi Z., Samani S. M., Amoozgar Z. (2015) Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci* **10**, 1–16.

Ahmadi R., Bruijn J. D. de (2008) Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *J Biomed Mater Res A* **86**, 824–32.

Ahmed H. A., Ishrat T., Pillai B., Bunting K. M., Patel A., Vazdarjanova A., Waller J. L., Arbab A. S., Ergul A., Fagan S. C. (2018) Role of angiotensin system modulation on progression of cognitive impairment and brain MRI changes in aged hypertensive animals - A randomized double- blind pre-clinical study. *Behav Brain Res* **346**, 29–40.

Albrecht, A A.-C., D B., S B., B R.-C., Rg E., H S., L D., P M., A B. (2020) Transmembrane Peptides as Inhibitors of Protein-Protein Interactions: An Efficient Strategy to Target Cancer Cells? *Frontiers in oncology*.

Alexander M. R., Murgai M., Moehle C. W., Owens G. K. (2012) Interleukin-1β modulates smooth muscle cell phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF-κB-dependent mechanisms. *Physiol Genomics* **44**, 417–29.

Alexander M. R., Owens G. K. (2012) Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* **74**, 13–40.

Alzheimer A., Stelzmann R. A., Schnitzlein H. N., Murtagh F. R. (1995) *An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde".*

Araki K., Nagata K. (2011) Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a007526.

Archer S. L. (1996) Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. *J Lab Clin Med* **127**, 524–9.

Arispe N., Rojas E., Pollard H. B. (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 567–71.

Arkin M. R., Wells J. A. (2004) Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 301–17.

Attwell D., Mishra A., Hall C. N., O'Farrell F. M., Dalkara T. (2016) What is a pericyte. *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 451–5.

Bachmeier C., Paris D., Beaulieu-Abdelahad D., Mouzon B., Mullan M., Crawford F. (2013) A multifaceted role for apoE in the clearance of beta-amyloid across the blood-brain barrier. *Neurodegener Dis* **11**, 13–21.

Bae I. H., Jeong M. H., Park D. S., Lim K. S., Shim J. W., Kim M. K., Park J. K. (2020) Mechanical and physio-biological properties of peptide-coated stent for re-endothelialization. *Biomater Res* **24**, 4.

Baillie G. S., MacKenzie S. J., McPhee I., Houslay M. D. (2000) Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol* **131**, 811–9.

Balbach J. J., Petkova A. T., Oyler N. A., Antzutkin O. N., Gordon D. J., Meredith S. C., Tycko R. (2002) Supramolecular structure in full-length Alzheimer's beta-amyloid fibrils: evidence for a parallel beta-sheet organization from solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J* **83**, 1205–16.

Barage S. H., Sonawane K. D. (2015) Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **52**, 1–18.

Baragli A., Grieco M. L., Trieu P., Villeneuve L. R., Hébert T. E. (2008) Heterodimers of adenylyl cyclases 2 and 5 show enhanced functional responses in the presence of Galpha s. *Cell Signal* **20**, 480–92.

Basatemur G. L., Jørgensen H. F., Clarke M. C. H., Bennett M. R., Mallat Z. (2019) Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* **16**, 727–744.

Bateman R. J., Munsell L. Y., Morris J. C., Swarm R., Yarasheski K. E., Holtzman D. M. (2006) Human amyloid-β synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nature medicine* **12**, 856–861.

Bayliss W. M. (1902) On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* **28**, 220–31.

Bayliss W. M., Hill L., Gulland G. L. (1895) On Intra-Cranial Pressure and the Cerebral Circulation: Part I. Physiological; Part II. Histological. *J Physiol* **18**, 334–62.

Beavo J. A. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**, 725–48.

Beazely M. A., Watts V. J. (2006) Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report. *Eur J Pharmacol* **535**, 1–12.

Belacel-Ouari M., Zhang L., Hubert F., Assaly R., Gerbier R., Jockers R., Dauphin F., et al. (2017) Influence of cell confluence on the cAMP signalling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* **35**, 118–128.

Bell R. D., Deane R., Chow N., Long X., Sagare A., Singh I., Streb J. W., et al. (2009) SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol* **11**, 143–53.

Bell R. D., Zlokovic B. V. (2009) Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**, 103–13.

Benkirane M., Jin D. Y., Chun R. F., Koup R. A., Jeang K. T. (1997) Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* **272**, 30603–6.

Bennett M. R., Sinha S., Owens G. K. (2016) Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research* **118**, 692–702.

Bentzon J. F., Otsuka F., Virmani R., Falk E. (2014) Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* **114**, 1852–66.

Beuckelmann D. J., Näbauer M., Erdmann E. (1992) Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* **85**, 1046–55.

Biel M., Michalakis S. (2009) Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol* 191, 111–36.

Biffi A. (2022) Main features of hereditary cerebral amyloid angiopathies: A systematic review. *Cereb Circ Cogn Behav* **3**, 100124.

Blaise R., Mateo V., Rouxel C., Zaccarini F., Glorian M., Béréziat G., Golubkov V. S., Limon I. (2012) Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity. *Aging Cell* **11**, 384–393.

Blazer L. L., Neubig R. R. (2009) Small molecule protein-protein interaction inhibitors as CNS therapeutic agents: current progress and future hurdles. *Neuropsychopharmacology* **34**, 126–41.

Blirando K., Blaise R., Gorodnaya N., Rouxel C., Meilhac O., Vincent P., Limon I. (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. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 3235–47.

Bobin P., Belacel-Ouari M., Bedioune I., Zhang L., Leroy J., Leblais V., Fischmeister R., Vandecasteele G. (2016) Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Arch Cardiovasc Dis* **109**, 431–43.

Bockaert J., Pin J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**, 1723–9.

Borén J., Williams K. J. (2016) The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol* **27**, 473–83.

Borroto-Escuela D. O., Flajolet M., Agnati L. F., Greengard P., Fuxe K. (2013) Bioluminescence resonance energy transfer methods to study G protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes. *Methods Cell Biol* **117**, 141–64.

Borst P., Wolf C. de, Wetering K. van de (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch* **453**, 661–73.

Bos J. L. (2006) Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* **31**, 680–6.

Bowman S. L., Shiwarski D. J., Puthenveedu M. A. (2016) Distinct G protein-coupled receptor recycling pathways allow spatial control of downstream G protein signaling. *J Cell Biol* **214**, 797–806.

Boyajian C. L., Garritsen A., Cooper D. M. (1991) Bradykinin stimulates Ca2+ mobilization in NCB-20 cells leading to direct inhibition of adenylylcyclase. A novel mechanism for inhibition of cAMP production. *J Biol Chem* **266**, 4995–5003.

Boyle P. A., Yu L., Wilson R. S., Leurgans S. E., Schneider J. A., Bennett D. A. (2018) Person-specific contribution of neuropathologies to cognitive loss in old age. *Ann Neurol* **83**, 74–83.

Bracko O., Njiru B. N., Swallow M., Ali M., Haft-Javaherian M., Schaffer C. B. (2020) Increasing cerebral blood flow improves cognition into late stages in Alzheimer's disease mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **40**, 1441–1452.

Breckler M., Berthouze M., Laurent A. C., Crozatier B., Morel E., Lezoualc'h F. (2011) Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal* **23**, 1257–66.

Brion J. P., Flament-Durand J., Dustin P. (1986) *Alzheimer's disease and tau proteins.*

Bristow M. R., Ginsburg R., Minobe W., Cubicciotti R. S., Sageman W. S., Lurie K., Billingham M. E., Harrison D. C., Stinson E. B. (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* **307**, 205–11.

Brozovich F. V., Nicholson C. J., Degen C. V., Gao Y. Z., Aggarwal M., Morgan K. G. (2016) Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev* **68**, 476–532.

Bruzzoni-Giovanelli H., Alezra V., Wolff N., Dong C. Z., Tuffery P., Rebollo A. (2018) Interfering peptides targeting protein-protein interactions: the next generation of drugs. *Drug Discov Today* **23**, 272–285.

Buchwald P. (2010) Small-molecule protein-protein interaction inhibitors: therapeutic potential in light of molecular size, chemical space, and ligand binding efficiency considerations. *IUBMB Life* **62**, 724–31.

Burdick D., Soreghan B., Kwon M., Kosmoski J., Knauer M., Henschen A., Yates J., Cotman C., Glabe C. (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* **267**, 546–54.

Cai Y., Nagel D. J., Zhou Q., Li F., Pi X., Knight P., Yan C. (2015) Role of cAMP-Phosphodiesterase 1C Signaling in Regulating Growth Factor Receptor Stability, Vascular Smooth Muscle Cell Growth, Migration, and Neointimal Hyperplasia. *Circ Res* **116**, 1120–32.

Calebiro D., Nikolaev V. O., Gagliani M. C., Filippis T. de, Dees C., Tacchetti C., Persani L., Lohse M. J. (2009) Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* **7**, e1000172.

Calhoun M. E., Burgermeister P., Phinney A. L., Stalder M., Tolnay M., Wiederhold K. H., Abramowski D., et al. (1999) Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14088–93.

Cali J. J., Parekh R. S., Krupinski J. (1996) Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca2+/calmodulin. *J Biol Chem* **271**, 1089–95.

Cali J. J., Zwaagstra J. C., Mons N., Cooper D. M., Krupinski J. (1994) Type VIII adenylyl cyclase. A Ca2+/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J Biol Chem* **269**, 12190–5.

Camenzind E. (2006) Treatment of in-stent restenosis--back to the future. *N Engl J Med* **355**, 2149–51.

Campion D., Flaman J. M., Brice A., Hannequin D., Dubois B., Martin C., Moreau V., Charbonnier F., Didierjean O., Tardieu S. (1995) Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **4**, 2373–7.

Cao G., Xuan X., Hu J., Zhang R., Jin H., Dong H. (2022) How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. *Cell Commun Signal* **20**, 180.

Chatterjee A., Sharma A., Chen M., Toy R., Mottola G., Conte M. S. (2014) The pro-resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways in vascular smooth muscle and endothelial cells. *PLoS One* **9**, e113480.

Chen G. F., Xu T. H., Yan Y., Zhou Y. R., Jiang Y., Melcher K., Xu H. E. (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* **38**, 1205–1235.

Chen T. W., Wardill T. J., Sun Y., Pulver S. R., Renninger S. L., Baohan A., Schreiter E. R., et al. (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295–300.

Chen Z. S., Lee K., 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. *J Biol Chem* **276**, 33747–54.

Cheng A. C., Coleman R. G., Smyth K. T., Cao Q., Soulard P., Caffrey D. R., Salzberg A. C., Huang E. S. (2007) Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nat Biotechnol* **25**, 71–5.

Chi H., Messas E., Levine R. A., Graves D. T., Amar S. (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**, 1678–1685.

Chisari M., Merlo S., Sortino M. A., Salomone S. (2010) Long-term incubation with beta-amyloid peptides impairs endothelium-dependent vasodilatation in isolated rat basilar artery. *Pharmacol Res* **61**, 157–61.

Cho A., Reidy M. A. (2002) Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res* **91**, 845–51.

Choi E. J., Xia Z., Storm D. R. (1992) Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry* **31**, 6492–8.

Choi Y. H., Ekholm D., Krall J., Ahmad F., Degerman E., Manganiello V. C., Movsesian M. A. (2001) Identification of a novel isoform of the cyclic-nucleotide phosphodiesterase PDE3A expressed in vascular smooth-muscle myocytes. *Biochem J* **353**, 41–50.

Chow N., Bell R. D., Deane R., Streb J. W., Chen J., Brooks A., Van Nostrand W., Miano J. M., Zlokovic B. V. (2007) Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 823–8.

Christie R., Yamada M., Moskowitz M., Hyman B. (2001) Structural and functional disruption of vascular smooth muscle cells in a transgenic mouse model of amyloid angiopathy. *Am J Pathol* **158**, 1065–71.

Chrysant S. G. (2007) The pathophysiologic role of the brain renin-angiotensin system in stroke protection: clinical implications. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **9**, 454–9.

Chung Y. A., O J., Kim J. Y., Kim K. J., Ahn K. J. (2009) Hypoperfusion and ischemia in cerebral amyloid angiopathy documented by 99mTc-ECD brain perfusion SPECT. *J Nucl Med* **50**, 1969–74.

Cipolla M. J. (2009) The Cerebral Circulation.

Cirillo P., Golino P., Ragni M., Battaglia C., Pacifico F., Formisano S., Buono C., Condorelli M., Chiariello M. (1999) Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res* **43**, 210–8.

Clapham D. E. (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047–58.

Clément N., Glorian M., Raymondjean M., Andréani M., Limon I. (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**, 495–505.

Cohen J. C., Boerwinkle E., Mosley T. H., Hobbs H. H. (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* **354**, 1264–72.

Collins R. G., Velji R., Guevara N. V., Hicks M. J., Chan L., Beaudet A. L. (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 189–94.

Conant A. R., Oo A. Y., Dashwood M. R., Collard K., Chester M. R., Dihmis W. C., Simpson A. W. (2002) Endothelin receptors in cultured and native human radial artery smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* **39**, 130–41.

Conti M., Beavo J. (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* **76**, 481–511.

Cooper D. M., Crossthwaite A. J. (2006) Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 426–31.

Cooper D. M. F. (2003) Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochemical Journal* **375**, 517–529.

Cooper D. M., Yoshimura M., Zhang Y., Chiono M., Mahey R. (1994) Capacitative Ca2+ entry regulates Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases. *Biochem J* **297**, 437–40.

Cornwell T. L., Pryzwansky K. B., Wyatt T. A., Lincoln T. M. (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **40**, 923–31.

Corrigan F., Vink R., Blumbergs P. C., Masters C. L., Cappai R., Heuvel C. van den (2012) sAPPα rescues deficits in amyloid precursor protein knockout mice following focal traumatic brain injury. *J Neurochem* **122**, 208–20.

Corriveau R. A., Bosetti F., Emr M., Gladman J. T., Koenig J. I., Moy C. S., Pahigiannis K., Waddy S. P., Koroshetz W. (2016) The Science of Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia (VCID): A Framework for Advancing Research Priorities in the Cerebrovascular Biology of Cognitive Decline. *Cell Mol Neurobiol* **36**, 281–8.

Crilly S. E., Puthenveedu M. A. (2021) Compartmentalized GPCR Signaling from Intracellular Membranes. *J Membr Biol* **254**, 259–271.

Crossthwaite A. J., Seebacher T., Masada N., Ciruela A., Dufraux K., Schultz J. E., Cooper D. M. (2005) The cytosolic domains of Ca2+-sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts. *J Biol Chem* **280**, 6380–91.

Cushing S. D., Berliner J. A., Valente A. J., Territo M. C., Navab M., Parhami F., Gerrity R., Schwartz C. J., Fogelman A. M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5134–8.

Custodia A., Aramburu-Núñez M., Rodríguez-Arrizabalaga M., Pías-Peleteiro J. M., Vázquez-Vázquez L., Camino-Castiñeiras J., Aldrey J. M., et al. (2023) Biomarkers Assessing Endothelial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cells* **12**.

Daneman R., Prat A. (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020412.

Daniel Palmer, Keith Tsoi, Donald H. Maurice (1998) Synergistic Inhibition of Vascular Smooth Muscle CellMigration by Phosphodiesterase 3 andPhosphodiesterase 4 Inhibitors. *Circ Res* **82**, 852–861.

Davies J. D., Carpenter K. L., Challis I. R., Figg N. L., McNair R., Proudfoot D., Weissberg P. L., Shanahan C. M. (2005) Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **280**, 3911–9.

Davis J., Cribbs D. H., Cotman C. W., Van Nostrand W. E. (1999) Pathogenic amyloid beta-protein induces apoptosis in cultured human cerebrovascular smooth muscle cells. *Amyloid* **6**, 157–64.

Davis-Salinas J., Saporito-Irwin S. M., Cotman C. W., Van Nostrand W. E. (1995) Amyloid beta-protein induces its own production in cultured degenerating cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neurochem* **65**, 931–4.

Dawkins E., Small D. H. (2014) Insights into the physiological function of the β-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem* **129**, 756–69.

De Bellis M., Pisani F., Mola M. G., Basco D., Catalano F., Nicchia G. P., Svelto M., Frigeri A. (2014) A novel human aquaporin-4 splice variant exhibits a dominant-negative activity: a new mechanism to regulate water permeability. *Mol Biol Cell* **25**, 470–80.

Deane R., Du Yan S., Submamaryan R. K., LaRue B., Jovanovic S., Hogg E., Welch D., et al. (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* **9**, 907–13.

Defer N., Marinx O., Stengel D., Danisova A., Iourgenko V., Matsuoka I., Caput D., Hanoune J. (1994) Molecular cloning of the human type VIII adenylyl cyclase. *FEBS Lett* **351**, 109–13.

Degerman E., Belfrage P., Manganiello V. C. (1997) Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* **272**, 6823–6.

Delmeire D., Flamez D., Hinke S. A., Cali J. J., Pipeleers D., Schuit F. (2003) Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia* **46**, 1383–93.

Dessauer C. W., Watts V. J., Ostrom R. S., Conti M., Dove S., Seifert R. (2017) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CI. Structures and Small Molecule Modulators of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Pharmacol Rev* **69**, 93–139.

Dietrich H. H., Xiang C., Han B. H., Zipfel G. J., Holtzman D. M. (2010) Soluble amyloid-beta, effect on cerebral arteriolar regulation and vascular cells. *Mol Neurodegener* **5**, 15.

Diglio C. A., Grammas P., Giacomelli F., Wiener J. (1986) Rat cerebral microvascular smooth muscle cells in culture. *J Cell Physiol* **129**, 131–41.

Dong Z. M., Chapman S. M., Brown A. A., Frenette P. S., Hynes R. O., Wagner D. D. (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* **102**, 145–52.

Du H., Li P., Wang J., Qing X., Li W. (2012) The interaction of amyloid β and the receptor for advanced glycation endproducts induces matrix metalloproteinase-2 expression in brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* **32**, 141–7.

Duc N. M., Kim H. R., Chung K. Y. (2015) Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol* **763**, 214–22.

Dupuis J., Langenberg C., Prokopenko I., Saxena R., Soranzo N., Jackson A. U., Wheeler E., et al. (2010) New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet* **42**, 105–16.

Durham A. L., Speer M. Y., Scatena M., Giachelli C. M., Shanahan C. M. (2018) Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* **114**, 590–600.

Earley S., Brayden J. E. (2015) Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev* **95**, 645–90.

Eckman E. A., Reed D. K., Eckman C. B. (2001) Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* **276**, 24540–8.

Eguchi S., Hirata Y., Imai T., Kanno K., Marumo F. (1994) Phenotypic change of endothelin receptor subtype in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **134**, 222–8.

Esiri M. M., Matthews F., Brayne C., Ince P. G., Matthews F. E., Xuereb J. H., Broome J. C., McKenzie J., Rossi M., McKeith I. G. (2001) Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet*.

Espinosa-Tanguma R., O'Neil C., Chrones T., Pickering J. G., Sims S. M. (2011) Essential role for calcium waves in migration of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H315-23.

Eun S. Y., Ko Y. S., Park S. W., Chang K. C., Kim H. J. (2015) IL-1β enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration via P2Y2 receptor-mediated RAGE expression and HMGB1 release. *Vascul Pharmacol* **72**, 108–17.

Fan L., Ren S., Zhou H., Wang Y., Xu P., He J., Luo D. (2009) α1D-Adrenergic receptor insensitivity is associated with alterations in its expression and distribution in cultured vascular myocytes. *Acta Pharmacologica Sinica* **30**, 1585–1593.

Fan T., Hou Y., Ge W., Fan T., Feng X., Guo W., Song X., Gao R., Wang J. (2022) Phosphodiesterase 4D promotes angiotensin II-induced hypertension in mice via smooth muscle cell contraction. *Commun Biol* **5**, 81.

Farzan M., Schnitzler C. E., Vasilieva N., Leung D., Choe H. (2000) BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9712–7.

Fasciani I., Carli M., Petragnano F., Colaianni F., Aloisi G., Maggio R., Scarselli M., Rossi M. (2022) GPCRs in Intracellular Compartments: New Targets for Drug Discovery. *Biomolecules* **12**.

Feil S., Fehrenbacher B., Lukowski R., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Schaller M., Feil R. (2014) Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res* **115**, 662–7.

Ference B. A., Ginsberg H. N., Graham I., Ray K. K., Packard C. J., Bruckert E., Hegele R. A., Krauss R. M., Raal F. J., Schunkert H. (2017) Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European heart journal* **38**, 2459–2472.

Fernández-Friera L., Peñalvo J. L., Fernández-Ortiz A., Ibañez B., López-Melgar B., Laclaustra M., Oliva B., Mocoroa A., Mendiguren J., Martínez de Vega V. (2015) Prevalence, vascular distribution, and multiterritorial extent of subclinical atherosclerosis in a middle-aged cohort: the PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) study. *Circulation* **131**, 2104–2113.

Fertig B. A., Baillie G. S. (2018) PDE4-Mediated cAMP Signalling. *J Cardiovasc Dev Dis* **5**.

Fetalvero K. M., Shyu M., Nomikos A. P., Chiu Y.-F., Wagner R. J., Powell R. J., Hwa J., Martin K. A. (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**, H1337–H1346.

Fitzgerald O. (2000) IL-1ra deficiency and atherosclerosis. *Arthritis Research & Therapy*.

Fominaya J., Bravo J., Decaudin D., Brossa J. Y., Nemati F., Rebollo A. (2015a) Enhanced serum proteolysis resistance of cell-penetrating peptides. *Ther Deliv* **6**, 139–47.

Fominaya J., Bravo J., Decaudin D., Brossa J. Y., Nemati F., Rebollo A. (2015b) Enhanced serum proteolysis resistance of cell-penetrating peptides. *Ther Deliv* **6**, 139–47.

Fominaya J., Bravo J., Rebollo A. (2015c) Strategies to stabilize cell penetrating peptides for in vivo applications. *Ther Deliv* **6**, 1171–94.

Forrester S. J., Booz G. W., Sigmund C. D., Coffman T. M., Kawai T., Rizzo V., Scalia R., Eguchi S. (2018) Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* **98**, 1627–1738.

Forsyth E. A., Aly H. M., Neville R. F., Sidawy A. N. (1997) Proliferation and extracellular matrix production by human infragenicular smooth muscle cells in response to interleukin-1 beta. *J Vasc Surg* **26**, 1002–7; discussion 1007-8.

Fossati S., Cam J., Meyerson J., Mezhericher E., Romero I. A., Couraud P. O., Weksler B. B., Ghiso J., Rostagno A. (2010) Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid-beta variants in cells composing the cerebral vessel walls. *Faseb J* **24**, 229–41.

Fossati S., Ghiso J., Rostagno A. (2012) Insights into caspase-mediated apoptotic pathways induced by amyloid-β in cerebral microvascular endothelial cells. *Neurodegener Dis* **10**, 324–8.

Fouillade C., Monet-Leprêtre M., Baron-Menguy C., Joutel A. (2012) Notch signalling in smooth muscle cells during development and disease. *Cardiovascular research* **95**, 138–146.

Frackowiak J., Zoltowska A., Wisniewski H. M. (1994) Non-fibrillar beta-amyloid protein is associated with smooth muscle cells of vessel walls in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**, 637–45.

Frangione B., Revesz T., Vidal R., Holton J., Lashley T., Houlden H., Wood N., Rostagno A., Plant G., Ghiso J. (2001) Familial cerebral amyloid angiopathy related to stroke and dementia. *Amyloid* **8 Suppl 1**, 36–42.

Fraser S. P., Suh Y. H., Djamgoz M. B. (1997) Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends Neurosci* **20**, 67–72.

Frismantiene A., Philippova M., Erne P., Resink T. J. (2018) Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cell Signal* **52**, 48–64.

Frösen J., Joutel A. (2018) Smooth muscle cells of intracranial vessels: from development to disease. *Cardiovasc Res* **114**, 501–512.

Furchgott R. F., Zawadzki J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–6.

Galés C., Rebois R. V., Hogue M., Trieu P., Breit A., Hébert T. E., Bouvier M. (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**, 177–84.

Galis Z. S., Muszynski M., Sukhova G. K., Simon-Morrissey E., Unemori E. N., Lark M. W., Amento E., Libby P. (1994) Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* **75**, 181–9.

Gareau D. S., RochaKim N., Choudhury A., Bamkole M., Snuderl M., Zou J., Yaroslavsky A., et al. (2023) Fiberoptic hemodynamic spectroscopy reveals abnormal cerebrovascular reactivity in a freely moving mouse model of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* **16**, 1163447.

Garland C. J., Dora K. A. (2017) EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf)* **219**, 152–161.

Garritsen A., Zhang Y., Firestone J. A., Browning M. D., Cooper D. M. (1992) Inhibition of cyclic AMP accumulation in intact NCB-20 cells as a direct result of elevation of cytosolic Ca2+. *J Neurochem* **59**, 1630–9.

Gatti L., Tinelli F., Scelzo E., Arioli F., Di Fede G., Obici L., Pantoni L., et al. (2020) Understanding the Pathophysiology of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Int J Mol Sci* **21**.

Gautier E. L., Huby T., Witztum J. L., Ouzilleau B., Miller E. R., Saint-Charles F., Aucouturier P., Chapman M. J., Lesnik P. (2009) Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* **119**, 1795–804.

Gentile M. T., Vecchione C., Maffei A., Aretini A., Marino G., Poulet R., Capobianco L., Selvetella G., Lembo G. (2004) Mechanisms of soluble beta-amyloid impairment of endothelial function. *J Biol Chem* **279**, 48135–42.

Ghiso J., Tomidokoro Y., Revesz T., Frangione B., Rostagno A. (2010) Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's disease. *Hirosaki Igaku* **61**, S111–S124.

Gilbert S. M., Gidley Baird A., Glazer S., Barden J. A., Glazer A., Teh L. C., King J. (2017) A phase I clinical trial demonstrates that nfP2X$_7$ -targeted antibodies provide a novel, safe and tolerable topical therapy for basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* **177**, 117–124.

Glenner G. G., Wong C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885–90.

Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704–6.

Gonzalez-Velasquez F. J., Kotarek J. A., Moss M. A. (2008) Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers. *J Neurochem* **107**, 466–77.

Gough P. J., Gomez I. G., Wille P. T., Raines E. W. (2006) Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* **116**, 59–69.

Gralle M., Oliveira C. L., Guerreiro L. H., McKinstry W. J., Galatis D., Masters C. L., Cappai R., et al. (2006) Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *J Mol Biol* **357**, 493–508.

Greenberg S. M., Bacskai B. J., Hernandez-Guillamon M., Pruzin J., Sperling R., Veluw S. J. van (2020) Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* **16**, 30–42.

Grootaert M. O. J., Bennett M. R. (2021) Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovasc Res* **117**, 2326–2339.

Gros R., Ding Q., Cao H., Main T., Hegele R. A., Feldman R. D. (2005) Identification of a dysfunctional missense single nucleotide variant of human adenylyl cyclase VI. *Clin Pharmacol Ther* **77**, 271–8.

Grosse R., Schöneberg T., Schultz G., Gudermann T. (1997) Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor. *Mol Endocrinol* **11**, 1305–18.

Gu C., Cali J. J., Cooper D. M. F. (2002) Dimerization of mammalian adenylate cyclases: Functional, biochemical and fluorescence resonance energy transfer (FRET) studies. *European Journal of Biochemistry* **269**, 413–421.

Gu C., Cooper D. M. (1999) Calmodulin-binding sites on adenylyl cyclase type VIII. *J Biol Chem* **274**, 8012–21.

Gu C., Sorkin A., Cooper D. M. (2001a) Persistent interactions between the two transmembrane clusters dictate the targeting and functional assembly of adenylyl cyclase. *Curr Biol* **11**, 185–90.

Gu C., Sorkin A., Cooper D. M. F. (2001b) Persistent interactions between the two transmembrane clusters dictate the targeting and functional assembly of adenylyl cyclase. *Current Biology* **11**, 185–190.

Gu L., Okada Y., Clinton S. K., Gerard C., Sukhova G. K., Libby P., Rollins B. J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* **2**, 275–81.

Gueguen M., Keuylian Z., Mateo V., Mougenot N., Lompre A. M., Michel J. B., Meilhac O., Lipskaia L., Limon I. (2010a) Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling. *J Pathol* **221**, 331–42.

Gueguen M., Keuylian Z., Mateo V., Mougenot N., Lompré A.-M., Michel J.-B., Meilhac O., Lipskaia L., Limon I. (2010b) Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling. *The Journal of Pathology* **221**, 331–342.

Gueguen M., Vallin B., Glorian M., Blaise R., Limon I. (2016a) Adénylyl cyclases et transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires : rôle dans le remodelage vasculaire pathologique. *Biologie Aujourd'hui* **210**, 153–166.

Gueguen M., Vallin B., Glorian M., Blaise R., Limon I. (2016b) Adénylyl cyclases et transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires : rôle dans le remodelage vasculaire pathologique. *Biol Aujourdhui* **210**, 153–166.

Guillou J. L., Nakata H., Cooper D. M. (1999) Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **274**, 35539–45.

Guo Y., Kotova E., Chen Z. S., Lee K., Hopper-Borge E., Belinsky M. G., Kruh G. D. (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. *J Biol Chem* **278**, 29509–14.

Gusach A., García-Nafría J., Tate C. G. (2023) New insights into GPCR coupling and dimerisation from cryo-EM structures. *Curr Opin Struct Biol* **80**, 102574.

Gwathmey J. K., Copelas L., MacKinnon R., Schoen F. J., Feldman M. D., Grossman W., Morgan J. P. (1987) Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* **61**, 70–6.

Gwathmey J. K., Warren S. E., Briggs G. M., Copelas L., Feldman M. D., Phillips P. J., Callahan M., Schoen F. J., Grossman W., Morgan J. P. (1991) Diastolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Effect on active force generation during systole. *J Clin Invest* **87**, 1023–31.

Haass C., Lemere C. A., Capell A., Citron M., Seubert P., Schenk D., Lannfelt L., Selkoe D. J. (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* **1**, 1291–6.

Haimovici H. (1991) *The role of arterial tissue susceptibility in atherogenesis.*

Haller S., Vernooij M. W., Kuijer J. P. A., Larsson E. M., Jäger H. R., Barkhof F. (2018) Cerebral Microbleeds: Imaging and Clinical Significance. *Radiology* **287**, 11–28.

Halls M. L., Cooper D. M. (2011) Regulation by Ca2+-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004143.

Hammersley D., Signy M. (2017) Ezetimibe: an update on its clinical usefulness in specific patient groups. *Therapeutic advances in chronic …*.

Hansson G. K., Jonasson L. (2009) The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1714–7.

Hanyu M., Kume N., Ikeda T., Minami M., Kita T., Komeda M. (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**, 313–9.

Harraz O. F., Jensen L. J. (2021) Vascular calcium signalling and ageing. *J Physiol* **599**, 5361–5377.

Hartwig C. L., Sprick J. D., Jeong J., Hu Y., Morison D. G., Stein C. M., Paranjape S., Park J. (2020) Increased vascular α1-adrenergic receptor sensitivity in older adults with posttraumatic stress disorder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **319**, R611–R616.

Hasenfuss G., Reinecke H., Studer R., Meyer M., Pieske B., Holtz J., Holubarsch C., Posival H., Just H., Drexler H. (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* **75**, 434–42.

Hayes G., Pinto J., Sparks S. N., Wang C., Suri S., Bulte D. P. (2022) Vascular smooth muscle cell dysfunction in neurodegeneration. *Front Neurosci* **16**, 1010164.

Hebert T. E., Moffett S., Morello J. P., Loisel T. P., Bichet D. G., Barret C., Bouvier M. (1996) A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**, 16384–92.

Hedegaard S. F., Derbas M. S., Lind T. K., Kasimova M. R., Christensen M. V., Michaelsen M. H., Campbell R. A., et al. (2018a) Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide significantly alters the mode and degree of biomembrane interaction. *Scientific Reports* **8**, 6327.

Hedegaard S. F., Derbas M. S., Lind T. K., Kasimova M. R., Christensen M. V., Michaelsen M. H., Campbell R. A., et al. (2018b) Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide significantly alters the mode and degree of biomembrane interaction. *Scientific Reports* **8**, 6327.

Herzig M. C., Winkler D. T., Burgermeister P., Pfeifer M., Kohler E., Schmidt S. D., Danner S., et al. (2004) Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci* **7**, 954–60.

Hewer R. C., Sala-Newby G. B., Wu Y.-J., Newby A. C., Bond M. (2011) PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **50**, 87–98.

Hilger D., Masureel M., Kobilka B. K. (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 4–12.

Hirakura Y., Lin M. C., Kagan B. L. (1999) Alzheimer amyloid abeta1-42 channels: effects of solvent, pH, and Congo Red. *J Neurosci Res* **57**, 458–66.

Hirao K., Ohnishi T., Hirata Y., Yamashita F., Mori T., Moriguchi Y., Matsuda H., et al. (2005) The prediction of rapid conversion to Alzheimer's disease in mild cognitive impairment using regional cerebral blood flow SPECT. *Neuroimage* **28**, 1014–21.

Hishikawa K., Nakaki T., Marumo T., Hayashi M., Suzuki H., Kato R., Saruta T. (1994) Pressure promotes DNA synthesis in rat cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **93**, 1975–80.

Hong M. K., Mintz G. S., Lee C. W., Song J. M., Han K. H., Kang D. H., Song J. 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**, 517–20.

Houslay M. D., Baillie G. S., Maurice D. H. (2007) cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* **100**, 950–66.

Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., Yang F., Cole G. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99–102.

Hu B., Nakata H., Gu C., De Beer T., Cooper D. M. (2002) A critical interplay between Ca2+ inhibition and activation by Mg2+ of AC5 revealed by mutants and chimeric constructs. *J Biol Chem* **277**, 33139–47.

Hubert F., Belacel-Ouari M., Manoury B., Zhai K., Domergue-Dupont V., Mateo P., Joubert F., Fischmeister R., Leblais V. (2014a) Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol* **171**, 5361–75.

Hubert F., Belacel-Ouari M., Manoury B., Zhai K., Domergue-Dupont V., Mateo P., Joubert F., Fischmeister R., Leblais V. (2014b) Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol* **171**, 5361–75.

Hur J., Mateo V., Amalric N., Babiak M., Béréziat G., Kanony-Truc C., Clerc T., Blaise R., Limon I. (2018) Cerebrovascular β-amyloid deposition and associated microhemorrhages in a Tg2576 Alzheimer mouse model are reduced with a DHA-enriched diet. *FASEB J* **32**, 4972–4983.

Iadecola C., Gottesman R. F. (2018) Cerebrovascular Alterations in Alzheimer Disease. *Circ Res* **123**, 406–408.

Indolfi C. (2000) 8-Chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. **36**, 6.

Inoue T., Croce K., Morooka T., Sakuma M., Node K., Simon D. I. (2011) Vascular Inflammation and Repair. *JACC: Cardiovascular Interventions* **4**, 1057–1066.

Iqbal Z., Dhage S., Mohamad J. B., Abdel-Razik A., Donn R., Malik R., Ho J. H., et al. (2019) Efficacy and safety of PCSK9 monoclonal antibodies. *Expert Opin Drug Saf* **18**, 1191–1201.

Irannejad R., Pessino V., Mika D., Huang B., Wedegaertner P. B., Conti M., Zastrow M. von (2017) Functional selectivity of GPCR-directed drug action through location bias. *Nat Chem Biol* **13**, 799–806.

Irannejad R., Tomshine J. C., Tomshine J. R., Chevalier M., Mahoney J. P., Steyaert J., Rasmussen S. G., et al. (2013) Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* **495**, 534–8.

Ishibashi S., Goldstein J. L., Brown M. S., Herz J., Burns D. K. (1994) Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* **93**, 1885–93.

Iwami G., Akanuma M., Kawabe J., Cannon P. J., Homcy C. J., Ishikawa Y. (1995) Multiplicity in type V adenylylcyclase: type V-a and type V-b. *Mol Cell Endocrinol* **110**, 43–7.

Iwatsubo T. (2004) [Pathogenesis of Alzheimer's disease: implications from amyloid research front]. *Rinsho Shinkeigaku* **44**, 768–70.

Jackson L., Eldahshan W., Fagan S. C., Ergul A. (2018) Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *Int J Mol Sci* **19**.

Jäkel L., De Kort A. M., Klijn C. J. M., Schreuder F., Verbeek M. M. (2022) Prevalence of cerebral amyloid angiopathy: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement* **18**, 10–28.

Jang H., Ma B., Lal R., Nussinov R. (2008) Models of toxic beta-sheet channels of protegrin-1 suggest a common subunit organization motif shared with toxic alzheimer beta-amyloid ion channels. *Biophys J* **95**, 4631–42.

Jarrett J. T., Berger E. P., Lansbury P. T. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693–7.

Jellinger K. A. (2002) Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm (Vienna)* **109**, 813–36.

Jeon M. T., Kim K. S., Kim E. S., Lee S., Kim J., Hoe H. S., Kim D. G. (2021) Emerging pathogenic role of peripheral blood factors following BBB disruption in neurodegenerative disease. *Ageing Res Rev* **68**, 101333.

Johnson N. A., Jahng G. H., Weiner M. W., Miller B. L., Chui H. C., Jagust W. J., Gorno-Tempini M. L., Schuff N. (2005) Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology* **234**, 851–9.

Kagan B. L. (2012) Membrane pores in the pathogenesis of neurodegenerative disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* **107**, 295–325.

Kaiser C., Galatius S., Jeger R., Gilgen N., Skov Jensen J., Naber C., Alber H., 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**, 74–81.

Kalra A., Rehman H., Khera S., Thyagarajan B., Bhatt D. L., Kleiman N. S., Yeh R. W. (2017) New-Generation Coronary Stents: Current Data and Future Directions. *Current Atherosclerosis Reports* **19**, 14.

Kaneda T., Sasaki N., Urakawa N., Shimizu K. (2016) Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilator Effects of Dimethyl Sulfoxide in Rat Aorta. *Pharmacology* **97**, 171–6.

Karpa K. D., Lin R., Kabbani N., Levenson R. (2000) The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Mol Pharmacol* **58**, 677–83.

Kasatkina L. A., Verkhusha V. V. (2022) Transgenic mice encoding modern imaging probes: Properties and applications. *Cell Rep* **39**, 110845.

Kato D., Takahashi Y., Iwata H., Hatakawa Y., Lee S. H., Oe T. (2022) Comparative studies for amyloid beta degradation: "Neprilysin vs insulysin", "monomeric vs aggregate", and "whole $A\beta_{40}$ vs its peptide fragments". *Biochem Biophys Rep* **30**, 101268.

Katsushika S., Kawabe J., Homcy C. J., Ishikawa Y. (1993) In vivo generation of an adenylylcyclase isoform with a half-molecule motif. *J Biol Chem* **268**, 2273–6.

Kaupp U. B., Seifert R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* **82**, 769–824.

Kawabe J., Ebina T., Toya Y., Oka N., Schwencke C., Duzic E., Ishikawa Y. (1996) Regulation of type V adenylyl cyclase by PMA-sensitive and -insensitive protein kinase C isoenzymes in intact cells. *FEBS Lett* **384**, 273–6.

Kawai M., Kalaria R. N., Cras P., Siedlak S. L., Velasco M. E., Shelton E. R., Chan H. W., Greenberg B. D., Perry G. (1993) Degeneration of vascular muscle cells in cerebral amyloid angiopathy of Alzheimer disease. *Brain Res* **623**, 142–6.

Kawasaki H., Springett G. M., Mochizuki N., Toki S., Nakaya M., Matsuda M., Housman D. E., Graybiel A. M. (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275–9.

Kayed R., Lasagna-Reeves C. A. (2013) Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis* **33 Suppl 1**, S67-78.

Ketelhuth D. F., Hansson G. K. (2016) Adaptive response of T and B cells in atherosclerosis. *Circulation research* **118**, 668–678.

Keuylian Z., Baaij J. H. F. de, Glorian M., Rouxel C., Merlet E., Lipskaia L., Blaise R., Mateo V., Limon I. (2012) The Notch Pathway Attenuates Interleukin 1β (IL1β)-mediated Induction of Adenylyl Cyclase 8 (AC8) Expression during Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC) Trans-differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 24978–24989.

Khammy M. M., Dalsgaard T., Larsen P. H., Christoffersen C. T., Clausen D., Rasmussen L. K., Folkersen L., et al. (2017) PDE1A inhibition elicits cGMP-dependent relaxation of rat mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology* **174**, 4186–4198.

Khan S. M., Sleno R., Gora S., Zylbergold P., Laverdure J. P., Labbé J. C., Miller G. J., Hébert T. E. (2013) The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev* **65**, 545–77.

Khromov A., Choudhury N., Stevenson A. S., Somlyo A. V., Eto M. (2009) Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca2+ sensitization force of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* **284**, 21569–79.

KIDD M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**, 192–3.

Kimura T., Hamazaki T. S., Sugaya M., Fukuda S., Chan T., Tamura-Nakano M., Sato S., Okochi H. (2014) Cilostazol improves lymphatic function by inducing proliferation and stabilization of lymphatic endothelial cells. *J Dermatol Sci* **74**, 150–8.

Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D. E. (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360–4.

Kirii H., Niwa T., Yamada Y., Wada H., Saito K., Iwakura Y., Asano M., Moriwaki H., Seishima M. (2003) Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 656–60.

Kirkitadze M. D., Bitan G., Teplow D. B. (2002) Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res* **69**, 567–77.

Kiskis J., Fink H., Nyberg L., Thyr J., Li J. Y., Enejder A. (2015) Plaque-associated lipids in Alzheimer's diseased brain tissue visualized by nonlinear microscopy. *Sci Rep* **5**, 13489.

Kitazawa T., Eto M., Woodsome T. P., Khalequzzaman M. (2003) Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca2+ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol* **546**, 879–89.

Klarenbeek J. B., Goedhart J., Hink M. A., Gadella T. W. J., Jalink K. (2011) A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range. *PLoS ONE* **6**, e19170.

Klein S., Reuveni H., Levitzki A. (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3219–23.

Kloet A. D. de, Steckelings U. M., Sumners C. (2017) Protective Angiotensin Type 2 Receptors in the Brain and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* **19**, 46.

Klyucherev T. O., Olszewski P., Shalimova A. A., Chubarev V. N., Tarasov V. V., Attwood M. M., Syvänen S., Schiöth H. B. (2022) Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. *Transl Neurodegener* **11**, 25.

Kniazeff J., Pin J. P. (2012) [G-protein-coupled receptors dimers and oligomers: for which purpose? The GABA(B) receptor under investigation]. *Med Sci (Paris)* **28**, 858–63.

Knot H. J., Nelson M. T. (1998) Regulation of arterial diameter and wall [Ca2+] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol* **508**, 199–209.

Ko E. A., Han J., Jung I. D., Park W. S. (2008) Physiological roles of K+ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* **44**, 65–81.

Koronyo Y., Rentsendorj A., Mirzaei N., Regis G. C., Sheyn J., Shi H., Barron E., et al. (2023) Retinal pathological features and proteome signatures of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **145**, 409–438.

Kourie J. I., Henry C. L., Farrelly P. (2001) Diversity of amyloid beta protein fragment [1-40]-formed channels. *Cell Mol Neurobiol* **21**, 255–84.

Krajnak K., Dahl R. (2018) A new target for Alzheimer's disease: A small molecule SERCA activator is neuroprotective in vitro and improves memory and cognition in APP/PS1 mice. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 1591–1594.

Krüger-Genge A., Blocki A., Franke R. P., Jung F. (2019) Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci* **20**.

Kumar-Singh S., Julliams A., Nuydens R., Ceuterick C., Labeur C., Serneels S., Vennekens K., et al. (2002) In vitro studies of Flemish, Dutch, and wild-type beta-amyloid provide evidence for two-staged neurotoxicity. *Neurobiol Dis* **11**, 330–40.

Kusumoto Y., Lomakin A., Teplow D. B., Benedek G. B. (1998) Temperature dependence of amyloid beta-protein fibrillization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12277–82.

Kwon Y., Kim D. H., Jeong M. G., Hong M. T., Park S., Chang Y., Zhou K., Park S. Y., Zhang J., Ryu S. H. (2022) Dimerization of β_2-adrenergic receptor is responsible for the constitutive activity subjected to inverse agonism. *Cell Chem Biol* **29**, 1532-1540.e5.

Lai A., Sisodia S. S., Trowbridge I. S. (1995) Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **270**, 3565–73.

LASSEN N. (1959) Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev* **39**, 183–238.

Lazarov O., Demars M. P. (2012) All in the Family: How the APPs Regulate Neurogenesis. *Front Neurosci* **6**, 81.

Lee J. C., Kim S. J., Hong S., Kim Y. (2019) Diagnosis of Alzheimer's disease utilizing amyloid and tau as fluid biomarkers. *Exp Mol Med* **51**, 1–10.

Lee J. M., Yin K., Hsin I., Chen S., Fryer J. D., Holtzman D. M., Hsu C. Y., Xu J. (2005) Matrix metalloproteinase-9 in cerebral-amyloid-angiopathy-related hemorrhage. *J Neurol Sci* **229–230**, 249–54.

Lefkowitz R. J., Pitcher J., Krueger K., Daaka Y. (1998) Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* **42**, 416–20.

LeVine H. (2004) Alzheimer's beta-peptide oligomer formation at physiologic concentrations. *Anal Biochem* **335**, 81–90.

Li T., Li X., Feng Y., Dong G., Wang Y., Yang J. (2020) The Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Atherosclerotic Plaque Instability. *Mediators Inflamm* **2020**, 3872367.

Liang F., Jia J., Wang S., Qin W., Liu G. (2013) Decreased plasma levels of soluble low density lipoprotein receptor-related protein-1 (sLRP) and the soluble form of the receptor for

advanced glycation end products (sRAGE) in the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci* **20**, 357–61.
Libby P. (2013) Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med* **368**, 2004–13.
Libby P. (2017) Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol* **70**, 2278–2289.
Libby P. (2021) The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* **592**, 524–533.
Libby P., Buring J. E., Badimon L., Hansson G. K., Deanfield J., Bittencourt M. S., Tokgözoğlu L., Lewis E. F. (2019) Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 56.
Libby P., Hansson G. K. (2019) From Focal Lipid Storage to Systemic Inflammation: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol* **74**, 1594–1607.
Libby P., Ridker P. M., Hansson G. K. (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317–325.
Lim G. B. (2019) IL-1 signalling in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* **16**, 200.
Lin H., Zhu Y. J., Lal R. (1999) Amyloid beta protein (1-40) forms calcium-permeable, Zn2+-sensitive channel in reconstituted lipid vesicles. *Biochemistry* **38**, 11189–96.
Lincoln T. M., Komalavilas P., Cornwell T. L. (1994) Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* **23**, 1141–7.
Liu H., Xiong Z., Sperelakis N. (1997) Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 1411–21.
Liu Z., Khalil R. A. (2018) Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem Pharmacol* **153**, 91–122.
Lorigo M., Oliveira N., Cairrao E. (2021) PDE-Mediated Cyclic Nucleotide Compartmentation in Vascular Smooth Muscle Cells: From Basic to a Clinical Perspective. *J Cardiovasc Dev Dis* **9**.
Lou Q., Janardhan A., Efimov I. R. (2012) Remodeling of calcium handling in human heart failure. *Adv Exp Med Biol* **740**, 1145–74.
Lu H., Zhou Q., He J., Jiang Z., Peng C., Tong R., Shi J. (2020) Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 213.
Lugnier C., Schoeffter P., Le Bec A., Strouthou E., Stoclet J. C. (1986) Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol* **35**, 1743–51.
Macdougall D. A., Wachten S., Ciruela A., Sinz A., Cooper D. M. (2009) Separate elements within a single IQ-like motif in adenylyl cyclase type 8 impart ca2+/calmodulin binding and autoinhibition. *J Biol Chem* **284**, 15573–88.
MacKenzie S. J., Baillie G. S., McPhee I., MacKenzie C., Seamons R., McSorley T., Millen J., Beard M. B., Heeke G. van, Houslay M. D. (2002) Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1). *Br J Pharmacol* **136**, 421–33.
Madden J. A., Vadula M. S., Kurup V. P. (1992a) Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* **263**, L384-93.
Madden J. A., Vadula M. S., Kurup V. P. (1992b) Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* **263**, L384-93.

Madhok D. Y., Vitt J. R., Nguyen A. T. (2018) Overview of Neurovascular Physiology. *Curr Neurol Neurosci Rep* **18**, 99.

Maggio R., Vogel Z., Wess J. (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3103–7.

Maier T., Güell M., Serrano L. (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* **583**, 3966–73.

Majesky M. W. (2007a) Developmental Basis of Vascular Smooth Muscle Diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 1248–1258.

Majesky M. W. (2007b) Developmental Basis of Vascular Smooth Muscle Diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 1248–1258.

Maki T., Okamoto Y., Carare R. O., Hase Y., Hattori Y., Hawkes C. A., Saito S., et al. (2014) Phosphodiesterase III inhibitor promotes drainage of cerebrovascular β-amyloid. *Ann Clin Transl Neurol* **1**, 519–33.

Marcolini S., Frentz I., Sanchez-Catasus C. A., Mondragon J. D., Feltes P. K., Hoorn A. van der, Borra R. J., Ikram M. A., Dierckx R. A., De Deyn P. P. (2022) Effects of interventions on cerebral perfusion in the Alzheimer’s disease spectrum: a systematic review. *Ageing Research Reviews* **79**, 101661.

Marín J., Encabo A., Briones A., García-Cohen E. C., Alonso M. J. (1999) Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* **64**, 279–303.

Marr R. A., Guan H., Rockenstein E., Kindy M., Gage F. H., Verma I., Masliah E., Hersh L. B. (2004) Neprilysin regulates amyloid Beta peptide levels. *J Mol Neurosci* **22**, 5–11.

Marx S. O., Totary-Jain H., Marks A. R. (2011) Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Interv* **4**, 104–11.

McKean J. S., Murray F., Gibson G., Shewan D. A., Tucker S. J., Nixon G. F. (2015) The cAMP-producing agonist beraprost inhibits human vascular smooth muscle cell migration via exchange protein directly activated by cAMP. *Cardiovascular Research* **107**, 546–555.

McNamara C. A., Sarembock I. J., Bachhuber B. G., Stouffer G. A., Ragosta M., Barry W., Gimple L. W., Powers E. R., Owens G. K. (1996) Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin Thromb Hemost* **22**, 139–44.

McQueen A., Warboys C. M. (2023) Mechanosignalling pathways that regulate endothelial barrier function. *Curr Opin Cell Biol* **84**, 102213.

Michaeli D. T., Michaeli J. C., Albers S., Boch T., Michaeli T. (2023) Established and Emerging Lipid-Lowering Drugs for Primary and Secondary Cardiovascular Prevention. *Am J Cardiovasc Drugs*.

Michiels C. (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* **196**, 430–43.

Miller D. L., Papayannopoulos I. A., Styles J., Bobin S. A., Lin Y. Y., Biemann K., Iqbal K. (1993) Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer’s disease. *Arch Biochem Biophys* **301**, 41–52.

Miller E., Czopek A., Duthie K. M., Kirkby N. S., Putte E. E. van de, Christen S., Kimmitt R. A., et al. (2017) Smooth Muscle Endothelin B Receptors Regulate Blood Pressure but Not Vascular Function or Neointimal Remodeling. *Hypertension* **69**, 275–285.

Miller Y. I., Choi S.-H., Wiesner P., Fang L., Harkewicz R., Hartvigsen K., Boullier A., Gonen A., Diehl C. J., Que X. (2011) Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular

patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circulation research* **108**, 235–248.

Miners S., Moulding H., Silva R. de, Love S. (2014) Reduced vascular endothelial growth factor and capillary density in the occipital cortex in dementia with Lewy bodies. *Brain Pathol* **24**, 334–43.

Miravalle L., Tokuda T., Chiarle R., Giaccone G., Bugiani O., Tagliavini F., Frangione B., Ghiso J. (2000) Substitutions at codon 22 of Alzheimer's abeta peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 27110–6.

Mok S. S., Losic D., Barrow C. J., Turner B. J., Masters C. L., Martin L. L., Small D. H. (2006) The beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease decreases adhesion of vascular smooth muscle cells to the basement membrane. *J Neurochem* **96**, 53–64.

Morgado M., Cairrão E., Santos-Silva A. J., Verde I. (2012a) Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* **69**, 247–66.

Morgado M., Cairrão E., Santos-Silva A. J., Verde I. (2012b) Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* **69**, 247–66.

Morgan K. G., Gangopadhyay S. S. (2001) Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J Appl Physiol (1985)* **91**, 953–62.

Morice M. C., Serruys P. W., Sousa J. E., Fajadet J., Ban Hayashi E., Perin M., Colombo A., et al. (2002) A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* **346**, 1773–80.

Mrdenovic D., Pieta I. S., Nowakowski R., Kutner W., Lipkowski J., Pieta P. (2022) Amyloid β interaction with model cell membranes - What are the toxicity-defining properties of amyloid β. *Int J Biol Macromol* **200**, 520–531.

Mroczko B., Groblewska M., Litman-Zawadzka A., Kornhuber J., Lewczuk P. (2018) Cellular receptors of amyloid β oligomers (AβOs) in Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences* **19**, 1884.

Müller U. C., Deller T., Korte M. (2017) Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* **18**, 281–298.

Müller U. C., Zheng H. (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006288.

Muntean B. S., Zucca S., MacMullen C. M., Dao M. T., Johnston C., Iwamoto H., Blakely R. D., Davis R. L., Martemyanov K. A. (2018) Interrogating the Spatiotemporal Landscape of Neuromodulatory GPCR Signaling by Real-Time Imaging of cAMP in Intact Neurons and Circuits. *Cell Rep* **22**, 255–268.

Munter L. M., Voigt P., Harmeier A., Kaden D., Gottschalk K. E., Weise C., Pipkorn R., Schaefer M., Langosch D., Multhaup G. (2007) GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J* **26**, 1702–12.

Mushenkova N. V., Bezsonov E. E., Orekhova V. A., Popkova T. V., Starodubova A. V., Orekhov A. N. (2021) Recognition of Oxidized Lipids by Macrophages and Its Role in Atherosclerosis Development. *Biomedicines* **9**.

Nagai R., Kuro-o M., Babij P., Periasamy M. (1989) Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J Biol Chem* **264**, 9734–7.

Nagel D. J., Aizawa T., Jeon K. I., Liu W., Mohan A., Wei H., Miano J. M., et al. (2006) Role of nuclear Ca2+/calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival. *Circ Res* **98**, 777–84.

Naik V., Leaf E. M., Hu J. H., Yang H.-Y., Nguyen N. B., Giachelli C. M., Speer M. Y. (2012) Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovascular research* **94**, 545–554.

Nakamura K., Koga Y., Sakai H., Homma K., Ikebe M. (2007) cGMP-dependent relaxation of smooth muscle is coupled with the change in the phosphorylation of myosin phosphatase. *Circ Res* **101**, 712–22.

Nakashima Y., Plump A. S., Raines E. W., Breslow J. L., Ross R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* **14**, 133–40.

Narayanan K. L., Chopra V., Rosas H. D., Malarick K., Hersch S. (2016) Rho Kinase Pathway Alterations in the Brain and Leukocytes in Huntington's Disease. *Mol Neurobiol* **53**, 2132–40.

Naseem R., Zhao L., Liu Y., Silberschmidt V. V. (2017) Experimental and computational studies of poly-L-lactic acid for cardiovascular applications: recent progress. *Mechanics of Advanced Materials and Modern Processes* **3**, 1–18.

Nash C. A., Wei W., Irannejad R., Smrcka A. V. (2019) Golgi localized β1-adrenergic receptors stimulate Golgi PI4P hydrolysis by PLCε to regulate cardiac hypertrophy. *Elife* **8**.

Navab M., Ananthramaiah G. M., Reddy S. T., Van Lenten B. J., Ansell B. J., Fonarow G. C., Vahabzadeh K., et al. (2004) The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* **45**, 993–1007.

Navarro-Borelly L., Somasundaram A., Yamashita M., Ren D., Miller R. J., Prakriya M. (2008) STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy. *J Physiol* **586**, 5383–401.

Nelson A. R., Sagare A. P., Zlokovic B. V. (2017) Role of clusterin in the brain vascular clearance of amyloid-β. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 8681–8682.

Nelson A. R., Sweeney M. D., Sagare A. P., Zlokovic B. V. (2016) Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1862**, 887–900.

Neptune E. R., Frischmeyer P. A., Arking D. E., Myers L., Bunton T. E., Gayraud B., Ramirez F., Sakai L. Y., Dietz H. C. (2003) Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* **33**, 407–11.

Newby A. C. (2005) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* **85**, 1–31.

Newman W. H., Castresana M. R., Webb J. G., Wang Z. (2003) Cyclic AMP inhibits production of interleukin-6 and migration in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* **109**, 57–61.

Nichols M. R., Moss M. A., Reed D. K., Lin W. L., Mukhopadhyay R., Hoh J. H., Rosenberry T. L. (2002) Growth of beta-amyloid(1-40) protofibrils by monomer elongation and lateral association. Characterization of distinct products by light scattering and atomic force microscopy. *Biochemistry* **41**, 6115–27.

Nikolaev A., McLaughlin T., O'Leary D. D., Tessier-Lavigne M. (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**, 981–9.

Niwa K., Carlson G. A., Iadecola C. (2000) Exogenous A beta1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1659–68.

Niwa K., Porter V. A., Kazama K., Cornfield D., Carlson G. A., Iadecola C. (2001) A beta-peptides enhance vasoconstriction in cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H2417-24.

Nordestgaard B. G., Chapman M. J., Humphries S. E., Ginsberg H. N., Masana L., Descamps O. S., Wiklund O., 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. *Eur Heart J* **34**, 3478–90a.

Ogoh S. (2017) Relationship between cognitive function and regulation of cerebral blood flow. *J Physiol Sci* **67**, 345–351.

Omori K., Kotera J. (2007) Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* **100**, 309–27.

Ostlund G., Sonnhammer E. L. (2012) Quality criteria for finding genes with high mRNA-protein expression correlation and coexpression correlation. *Gene* **497**, 228–36.

Ostrom R. S., Bogard A. S., Gros R., Feldman R. D. (2012) Choreographing the adenylyl cyclase signalosome: sorting out the partners and the steps. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **385**, 5–12.

Ostrom R. S., Liu X., Head B. P., Gregorian C., Seasholtz T. M., Insel P. A. (2002) Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol Pharmacol* **62**, 983–92.

Owens G. K., Kumar M. S., Wamhoff B. R. (2004a) Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* **84**, 767–801.

Owens G. K., Kumar M. S., Wamhoff B. R. (2004b) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**, 767–801.

Ozaki T., Li Y., Kikuchi H., Tomita T., Iwatsubo T., Nakagawara A. (2006) The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 57–63.

Paes D., Lardenoije R., Carollo R. M., Roubroeks J. A. Y., Schepers M., Coleman P., Mastroeni D., et al. (2021) Increased isoform-specific phosphodiesterase 4D expression is associated with pathology and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **97**, 56–64.

Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–6.

Pálvölgyi A., Simpson J., Bodnár I., Bíró J., Palkovits M., Radovits T., Skehel P., Antoni F. A. (2018) Auto-inhibition of adenylyl cyclase 9 (AC9) by an isoform-specific motif in the carboxyl-terminal region. *Cell Signal* **51**, 266–275.

Parihar M. S., Brewer G. J. (2010) Amyloid-β as a modulator of synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis* **22**, 741–63.

Paris D., Humphrey J., Quadros A., Patel N., Crescentini R., Crawford F., Mullan M. (2003) Vasoactive effects of A beta in isolated human cerebrovessels and in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: role of inflammation. *Neurol Res* **25**, 642–51.

Park S. A., Han S. M., Kim C. E. (2020) New fluid biomarkers tracking non-amyloid-β and non-tau pathology in Alzheimer's disease. *Exp Mol Med* **52**, 556–568.

Parker T., Dave V., Falotico R. (2010) Polymers for drug eluting stents. *Current pharmaceutical design* **16**, 3978–3988.

Passeri E., Elkhoury K., Morsink M., Broersen K., Linder M., Tamayol A., Malaplate C., Yen F. T., Arab-Tehrany E. (2022) Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *Int J Mol Sci* **23**.

Paulson O. B., Strandgaard S., Edvinsson L. (1990) Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **2**, 161–92.

Pfaltzgraff E. R., Bader D. M. (2015) Heterogeneity in vascular smooth muscle cell embryonic origin in relation to adult structure, physiology, and disease. *Developmental Dynamics* **244**, 410–416.

Pidoux G., Taskén K. (2010) Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol* **44**, 271–84.

Pinho J., Araújo J. M., Costa A. S., Silva F., Francisco A., Quintas-Neves M., Soares-Fernandes J., Ferreira C., Oliveira T. G. (2021) Intracerebral Hemorrhage Recurrence in Patients with and without Cerebral Amyloid Angiopathy. *Cerebrovasc Dis Extra* **11**, 15–21.

Plummer S., Van den Heuvel C., Thornton E., Corrigan F., Cappai R. (2016) The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis* **7**, 163–79.

Plump A. S., Smith J. D., Hayek T., Aalto-Setälä K., Walsh A., Verstuyft J. G., Rubin E. M., Breslow J. L. (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **71**, 343–53.

Polito M., Vincent P., Guiot E. (2014) Biosensor imaging in brain slice preparations. *Methods Mol Biol* **1071**, 175–94.

Porrello E. R., Delbridge L. M., Thomas W. G. (2009) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 958–72.

Potier M., Gonzalez J. C., Motiani R. K., Abdullaev I. F., Bisaillon J. M., Singer H. A., Trebak M. (2009) Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J* **23**, 2425–37.

Prasher V. P., Farrer M. J., Kessling A. M., Fisher E. M., West R. J., Barber P. C., Butler A. C. (1998) Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol* **43**, 380–3.

Price J. M., Sutton E. T., Hellermann A., Thomas T. (1997) beta-Amyloid induces cerebrovascular endothelial dysfunction in the rat brain. *Neurol Res* **19**, 534–8.

Puskin J. S., Gunter T. E., Gunter K. K., Russell P. R. (1976) Evidence for more than one Ca2+ transport mechanism in mitochondria. *Biochemistry* **15**, 3834–42.

Puzzo D., Privitera L., Leznik E., Fà M., Staniszewski A., Palmeri A., Arancio O. (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* **28**, 14537–45.

Qi C., Sorrentino S., Medalia O., Korkhov V. M. (2019) The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein. *Science* **364**, 389–394.

Qiao J. H., Tripathi J., Mishra N. K., Cai Y., Tripathi S., Wang X. P., Imes S., et al. (1997) Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* **150**, 1687–99.

Qiu J., Zheng Y., Hu J., Liao D., Gregersen H., Deng X., Fan Y., Wang G. (2014) Biomechanical regulation of vascular smooth muscle cell functions: from in vitro to in vivo understanding. *J R Soc Interface* **11**, 20130852.

Quartey M. O., Nyarko J. N. K., Maley J. M., Barnes J. R., Bolanos M. A. C., Heistad R. M., Knudsen K. J., et al. (2021) The Aβ(1-38) peptide is a negative regulator of the Aβ(1-42) peptide implicated in Alzheimer disease progression. *Sci Rep* **11**, 431.

Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R. (2005) Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10427–32.

Radoux-Mergault A., Oberhauser L., Aureli S., Gervasio F. L., Stoeber M. (2023) Subcellular location defines GPCR signal transduction. *Sci Adv* **9**, eadf6059.

Rahman A., Ekman M., Shakirova Y., Andersson K. E., Mörgelin M., Erjefält J. S., Brundin P., Li J. Y., Swärd K. (2013) Late onset vascular dysfunction in the R6/1 model of Huntington's disease. *Eur J Pharmacol* **698**, 345–53.

Rajagopal S., Shenoy S. K. (2018) GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal* **41**, 9–16.

Rall T. W., Sutherland E. W. (1962) Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *J Biol Chem* **237**, 1228–32.

Raoux M., Vacher P., Papin J., Picard A., Kostrzewa E., Devin A., Gaitan J., et al. (2015) Multilevel control of glucose homeostasis by adenylyl cyclase 8. *Diabetologia* **58**, 749–57.

Reiner D. J., Lundquist E. A. (2018) Small GTPases. *WormBook* **2018**, 1–65.

Reisberg B., Auer S. R., Monteiro I. M. (1996) Behavioral pathology in Alzheimer's disease (BEHAVE-AD) rating scale. *Int Psychogeriatr* **8 Suppl 3**, 301–8; discussion 351-4.

Rensen S. S. M., Doevendans P. A. F. M., Eys G. J. J. M. van (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal* **15**, 100–108.

Reynolds J. L., Joannides A. J., Skepper J. N., McNair R., Schurgers L. J., Proudfoot D., Jahnen-Dechent W., Weissberg P. L., Shanahan C. M. (2004) Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2857–67.

Rhyne J., Mantaring M. M., Gardner D. F., Miller M. (2009) Multiple splice defects in ABCA1cause low HDL-C in a family with Hypoalphalipoproteinemia and premature coronary disease. *BMC Medical Genetics* **10**, 1–11.

Richter W., Conti M. (2002) Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs). *J Biol Chem* **277**, 40212–21.

Richter W., Day P., Agrawal R., Bruss M. D., Granier S., Wang Y. L., Rasmussen S. G., et al. (2008) Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J* **27**, 384–93.

Ridker P. M. (2016) A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein. *J Am Coll Cardiol* **67**, 712–723.

Ridker P. M., Everett B. M., Thuren T., MacFadyen J. G., Chang W. H., Ballantyne C., Fonseca F., et al. (2017) Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* **377**, 1119–1131.

Risinger G. M., Hunt T. S., Updike D. L., Bullen E. C., Howard E. W. (2006) Matrix metalloproteinase-2 expression by vascular smooth muscle cells is mediated by both stimulatory and inhibitory signals in response to growth factors. *J Biol Chem* **281**, 25915–25.

Robinson J. G., Farnier M., Krempf M., Bergeron J., Luc G., Averna M., Stroes E. S., et al. (2015) Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med* **372**, 1489–99.

Rochais F., Abi-Gerges A., Horner K., Lefebvre F., Cooper D. M., Conti M., Fischmeister R., Vandecasteele G. (2006) A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* **98**, 1081–8.

Rodenbeck S. D., Zarse C. A., McKenney-Drake M. L., Bruning R. S., Sturek M., Chen N. X., Moe S. M. (2017) Intracellular calcium increases in vascular smooth muscle cells with progression of chronic kidney disease in a rat model. *Nephrology Dialysis Transplantation* **32**, 450–458.

Rombouts S. A., Goekoop R., Stam C. J., Barkhof F., Scheltens P. (2005) Delayed rather than decreased BOLD response as a marker for early Alzheimer's disease. *Neuroimage* **26**, 1078–85.

Rooij J. de, Zwartkruis F. J., Verheijen M. H., Cool R. H., Nijman S. M., Wittinghofer A., Bos J. L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474–7.

Roos J., DiGregorio P. J., Yeromin A. V., Ohlsen K., Lioudyno M., Zhang S., Safrina O., et al. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. *J Cell Biol* **169**, 435–45.

Rosell M., Fernández-Recio J. (2018) Hot-spot analysis for drug discovery targeting protein-protein interactions. *Expert Opin Drug Discov* **13**, 327–338.

Rovner A. S., Murphy R. A., Owens G. K. (1986) Expression of smooth muscle and nonmuscle myosin heavy chains in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **261**, 14740–5.

Ruitenberg A., Heijer T. den, Bakker S. L., Swieten J. C. van, Koudstaal P. J., Hofman A., Breteler M. M. (2005) Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Ann Neurol* **57**, 789–94.

Rybalkin S. D., Rybalkina I., Beavo J. A., Bornfeldt K. E. (2002) Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* **90**, 151–7.

Rykowska I., Nowak I., Nowak R. (2020) Drug-Eluting Stents and Balloons-Materials, Structure Designs, and Coating Techniques: A Review. *Molecules* **25**.

Saeed S., Bonnefond A., Tamanini F., Mirza M. U., Manzoor J., Janjua Q. M., Din S. M., et al. (2018) *Loss-of-function mutations in ADCY3 cause monogenic severe obesity.*

Saeedi M., Vahidi O., Moghbeli M. R., Ahmadi S., Asadnia M., Akhavan O., Seidi F., et al. (2022) Customizing nano-chitosan for sustainable drug delivery. *J Control Release* **350**, 175–192.

Sagare A., Deane R., Bell R. D., Johnson B., Hamm K., Pendu R., Marky A., et al. (2007) Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med* **13**, 1029–31.

Sagare A. P., Deane R., Zetterberg H., Wallin A., Blennow K., Zlokovic B. V. (2011) Impaired lipoprotein receptor-mediated peripheral binding of plasma amyloid-β is an early

biomarker for mild cognitive impairment preceding Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **24**, 25–34.

Saido T., Leissring M. A. (2012) Proteolytic degradation of amyloid β-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006379.

Saleh S. N., Albert A. P., Peppiatt C. M., Large W. A. (2006) Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *J Physiol* **577**, 479–95.

Salim S., Sinnarajah S., Kehrl J. H., Dessauer C. W. (2003) Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J Biol Chem* **278**, 15842–9.

Sanabra C., Mengod G. (2011) Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain. *J Chem Neuroanat* **41**, 43–54.

Sanders K. M. (2001) Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol (1985)* **91**, 1438–49.

Sandwall E., O'Callaghan P., Zhang X., Lindahl U., Lannfelt L., Li J. P. (2010) Heparan sulfate mediates amyloid-beta internalization and cytotoxicity. *Glycobiology* **20**, 533–41.

Santos R., Ursu O., Gaulton A., Bento A. P., Donadi R. S., Bologa C. G., Karlsson A., et al. (2017) A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 19–34.

Sassi Y., Lipskaia L., Vandecasteele G., Nikolaev V. O., Hatem S. N., Cohen Aubart F., Russel F. G., et al. (2008) Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest* **118**, 2747–57.

Sassone-Corsi P. (2012) The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.

Scheibel A. B., Duong T. H., Jacobs R. (1989) Alzheimer's disease as a capillary dementia. *Ann Med* **21**, 103–7.

Scholich K., Wittpoth C., Barbier A. J., Mullenix J. B., Patel T. B. (1997) Identification of an intramolecular interaction between small regions in type V adenylyl cyclase that influences stimulation of enzyme activity by Gsalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9602–7.

Schwarz D. S., Blower M. D. (2016) The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* **73**, 79–94.

Seebacher T., Linder J. U., Schultz J. E. (2001) An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity. *Eur J Biochem* **268**, 105–10.

Seimon T. A., Nadolski M. J., Liao X., Magallon J., Nguyen M., Feric N. T., Koschinsky M. L., et al. (2010) Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* **12**, 467–82.

Selkoe D. J. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487–98.

Selkoe D. J., Hardy J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**, 595–608.

Serra-Batiste M., Ninot-Pedrosa M., Bayoumi M., Gairí M., Maglia G., Carulla N. (2016) Aβ42 assembles into specific β-barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10866–71.

Sethi B., Kumar V., Mahato K., Coulter D. W., Mahato R. I. (2022) Recent advances in drug delivery and targeting to the brain. *J Control Release* **350**, 668–687.

Shakur Y., Takeda K., Kenan Y., Yu Z. X., Rena G., Brandt D., Houslay M. D., Degerman E., Ferrans V. J., Manganiello V. C. (2000) Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3). Two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **275**, 38749–61.

Shanahan C. M., Weissberg P. L. (1998) Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 333–8.

Shanahan C. M., Weissberg P. L., Metcalfe J. C. (1993) Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **73**, 193–204.

Shankman L. S., Gomez D., Cherepanova O. A., Salmon M., Alencar G. F., Haskins R. M., Swiatlowska P., Newman A. A., Greene E. S., Straub A. C. (2015) KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature medicine* **21**, 628–637.

Shao Y., Saredy J., Yang W. Y., Sun Y., Lu Y., Saaoud F., Drummer C., et al. (2020) Vascular Endothelial Cells and Innate Immunity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, e138–e152.

Sherrington R., Froelich S., Sorbi S., Campion D., Chi H., Rogaeva E. A., Levesque G., et al. (1996) Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* **5**, 985–8.

Shi X., Gao J., Lv Q., Cai H., Wang F., Ye R., Liu X. (2020) Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe. *Front Physiol* **11**, 56.

Shi X.-D., Sun K., Hu R., Liu X.-Y., Hu Q.-M., Sun X.-Y., Yao B., Sun N., Hao J.-R., Wei P. (2016) Blocking the interaction between EphB2 and ADDLs by a small peptide rescues impaired synaptic plasticity and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* **36**, 11959–11973.

Shibata M., Yamada S., Kumar S. R., Calero M., Bading J., Frangione B., Holtzman D. M., Miller C. A., Strickland D. K., Ghiso J. (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-β 1-40 peptide from brain by LDL receptor–related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation* **106**, 1489–1499.

Simard T., Hibbert B., Ramirez F. D., Froeschl M., Chen Y. X., O'Brien E. R. (2014) The evolution of coronary stents: a brief review. *Can J Cardiol* **30**, 35–45.

Sisodia S. S. (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6075–9.

Skålhegg B. S., Taskén K. (1997) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* **2**, d331-42.

Smith B. A., Clayton E. W., Robertson D. (2011) Experimental arrest of cerebral blood flow in human subjects: the red wing studies revisited. *Perspect Biol Med* **54**, 121–31.

Smith C. J., Craighead D. H., Alexander L. M. (2017) Effects of vehicle microdialysis solutions on cutaneous vascular responses to local heating. *J Appl Physiol (1985)* **123**, 1461–1467.

Smith E. E., Greenberg S. M. (2009) Beta-amyloid, blood vessels, and brain function. *Stroke* **40**, 2601–6.

Smith M. C., Gestwicki J. E. (2012) Features of protein-protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity. *Expert Rev Mol Med* **14**, e16.

Smith S. A., Newby A. C., Bond M. (2019) Ending Restenosis: Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by cAMP. *Cells* **8**.

Sodani K., Patel A., Kathawala R. J., Chen Z. S. (2012) Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer* **31**, 58–72.

Somlyo A. P., Somlyo A. V. (2002) The sarcoplasmic reticulum: then and now. *Novartis Found Symp* **246**, 258–68; discussion 268-71, 272–6.

Somlyo A. P., Somlyo A. V. (2003) Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325–58.

Sorokin L. (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**, 712–23.

Sorokin V., Vickneson K., Kofidis T., Woo C. C., Lin X. Y., Foo R., Shanahan C. M. (2020) Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. *Front Immunol* **11**, 599415.

Sorolla A., Wang E., Golden E., Duffy C., Henriques S. T., Redfern A. D., Blancafort P. (2020) Precision medicine by designer interference peptides: applications in oncology and molecular therapeutics. *Oncogene* **39**, 1167–1184.

Sorrentino S., Polini A., Arima V., Romano A., Quattrini A., Gigli G., Mozetic P., Moroni L. (2022) Neurovascular signals in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Biotechnol* **74**, 75–83.

Soscia S. J., Kirby J. E., Washicosky K. J., Tucker S. M., Ingelsson M., Hyman B., Burton M. A., et al. (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* **5**, e9505.

Speer M. Y., Yang H. Y., Brabb T., Leaf E., Look A., Lin W. L., Frutkin A., Dichek D., Giachelli C. M. (2009) Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* **104**, 733–41.

Steiner D., Saya D., Schallmach E., Simonds W. F., Vogel Z. (2006) Adenylyl cyclase type-VIII activity is regulated by G(betagamma) subunits. *Cell Signal* **18**, 62–8.

Stoeber M., Jullié D., Lobingier B. T., Laeremans T., Steyaert J., Schiller P. W., Manglik A., Zastrow M. von (2018) A Genetically Encoded Biosensor Reveals Location Bias of Opioid Drug Action. *Neuron* **98**, 963-976.e5.

Strickland S. (2018) Blood will out: vascular contributions to Alzheimer's disease. *J Clin Invest* **128**, 556–563.

Stull J. T., Tansey M. G., Tang D. C., Word R. A., Kamm K. E. (1993) Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca2+ desensitization. *Mol Cell Biochem* **127–128**, 229–37.

Sturchler-Pierrat C., Abramowski D., Duke M., Wiederhold K. H., Mistl C., Rothacher S., Ledermann B., et al. (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13287–92.

Sunahara R. K., Dessauer C. W., Whisnant R. E., Kleuss C., Gilman A. G. (1997) Interaction of Gsalpha with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **272**, 22265–71.

Suo Z., Humphrey J., Kundtz A., Sethi F., Placzek A., Crawford F., Mullan M. (1998) Soluble Alzheimers beta-amyloid constricts the cerebral vasculature in vivo. *Neurosci Lett* **257**, 77–80.

Sutherland E. W., Wosilait WD (1956) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. I. Liver phosphorylase; preparation and properties. *J Biol Chem* **218**, 459–68.

Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., Kamada N., Kataoka M., Jishage K., Ueda O., et al. (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* **386**, 292–6.

Swarbrick S., Wragg N., Ghosh S., Stolzing A. (2019) Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* **56**, 6156–6167.

Sweeney M. D., Kisler K., Montagne A., Toga A. W., Zlokovic B. V. (2018) The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* **21**, 1318–1331.

Tabbasum V. G., Cooper D. M. F. (2019) Structural and Functional Determinants of AC8 Trafficking, Targeting and Responsiveness in Lipid Raft Microdomains. *J Membr Biol* **252**, 159–172.

Tai L. M., Holloway K. A., Male D. K., Loughlin A. J., Romero I. A. (2010) Amyloid-beta-induced occludin down-regulation and increased permeability in human brain endothelial cells is mediated by MAPK activation. *J Cell Mol Med* **14**, 1101–12.

Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153–208.

Takeya K., Wang X., Sutherland C., Kathol I., Loutzenhiser K., Loutzenhiser R. D., Walsh M. P. (2014) Involvement of myosin regulatory light chain diphosphorylation in sustained vasoconstriction under pathophysiological conditions. *J Smooth Muscle Res* **50**, 18–28.

Tamaoka A., Odaka A., Ishibashi Y., Usami M., Sahara N., Suzuki N., Nukina N., Mizusawa H., Shoji S., Kanazawa I. (1994) APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* **269**, 32721–4.

Tanaka S., Nakamura S., Ueda K., Kameyama M., Shiojiri S., Takahashi Y., Kitaguchi N., Ito H. (1988) Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 472–9.

Tang E. H., Vanhoutte P. M. (2009) Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther* **122**, 140–9.

Tang W. J., Gilman A. G. (1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin. *Science* **268**, 1769–72.

Taskén K., Aandahl E. M. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* **84**, 137–67.

Taylor S. S., Knighton D. R., Zheng J., Ten Eyck L. F., Sowadski J. M. (1992) cAMP-dependent protein kinase and the protein kinase family. *Faraday Discuss* 93, 143–52.

Terry R. D. (1996) The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 1023–5.

Tesmer J. J., Sunahara R. K., Gilman A. G., Sprang S. R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS. *Science* **278**, 1907–16.

Thal D. R., Ghebremedhin E., Rüb U., Yamaguchi H., Del Tredici K., Braak H. (2002) Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 282–93.

Thal D. R., Griffin W. S., Vos R. A. de, Ghebremedhin E. (2008) Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **115**, 599–609.

Thangavel M., Liu X., Sun S. Q., Kaminsky J., Ostrom R. S. (2009) The C1 and C2 domains target human type 6 adenylyl cyclase to lipid rafts and caveolae. *Cell Signal* **21**, 301–8.

Thinakaran G., Koo E. H. (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* **283**, 29615–9.

Thomas T., Sutton E. T., Bryant M. W., Rhodin J. A. (1997) In vivo vascular damage, leukocyte activation and inflammatory response induced by beta-amyloid. *J Submicrosc Cytol Pathol* **29**, 293–304.

Thomas T., Thomas G., McLendon C., Sutton T., Mullan M. (1996) beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* **380**, 168–71.

Tian L., Zhang X., Nemati F., Vallerand D., Raimonide C., Decaudin D., Brossas J. Y., et al. (2016a) Identification of ras/raf binding site and design of interfering peptide with potential clinical application. *Integrative Molecular Medicine* **3**.

Tian L., Zhang X., Nemati F., Vallerand D., Raimonide C., Decaudin D., Brossas J. Y., et al. (2016b) Identification of ras/raf binding site and design of interfering peptide with potential clinical application. *Integrative Molecular Medicine* **3**.

Tikka S., Mykkänen K., Ruchoux M. M., Bergholm R., Junna M., Pöyhönen M., Yki-Järvinen H., et al. (2009) Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain* **132**, 933–9.

Tomlinson B., Chan P., Zhang Y., Lam C. W. K. (2020) Efficacy and safety of add on therapies in patients with hypercholesterolemia undergoing statin therapy. *Expert Opin Pharmacother* **21**, 2137–2151.

Torre J. C. de la (2004) Alzheimer's disease is a vasocognopathy: a new term to describe its nature. *Neurol Res* **26**, 517–24.

Torre J. de la (2018) The Vascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Key to Preclinical Prediction of Dementia Using Neuroimaging. *J Alzheimers Dis* **63**, 35–52.

Toumba M., Fanis P., Vlachakis D., Neocleous V., Phylactou L. A., Skordis N., Mantzoros C. S., Pantelidou M. (2022) Molecular modelling of novel ADCY3 variant predicts a molecular target for tackling obesity. *Int J Mol Med* **49**.

Tsubuki S., Takaki Y., Saido T. C. (2003) Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of Abeta to physiologically relevant proteolytic degradation. *Lancet* **361**, 1957–8.

Tsvetanova N. G., Zastrow M. von (2014) Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis. *Nat Chem Biol* **10**, 1061–5.

Tullio M. B. de, Morelli L., Castaño E. M. (2008) The irreversible binding of amyloid peptide substrates to insulin-degrading enzyme: a biological perspective. *Prion* **2**, 51–6.

Uprety A., Kang Y., Kim S. Y. (2021) Blood-brain barrier dysfunction as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Arch Pharm Res* **44**, 487–498.

Vaibhav Dhyani et al (2020) GPCR mediated control of calcium dynamics: A systems perspective. *Cellular Signalling* **74**.

Vallin B., Legueux-Cajgfinger Y., Clément N., Glorian M., Duca L., Vincent P., Limon I., Blaise R. (2018) Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1865**, 1326–1340.

Van Lieshout J. J., Wieling W., Karemaker J. M., Secher N. H. (2003) Syncope, cerebral perfusion, and oxygenation. *J Appl Physiol (1985)* **94**, 833–48.

Van Nostrand W. E., Schmaier A. H., Farrow J. S., Cunningham D. D. (1991) Platelet protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor. Possible pathologic and physiologic functions. *Ann N Y Acad Sci* **640**, 140–4.

VanBavel E., Sorop O., Andreasen D., Pfaffendorf M., Jensen B. L. (2002) Role of T-type calcium channels in myogenic tone of skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2239-43.

Vandersteen A., Hubin E., Sarroukh R., De Baets G., Schymkowitz J., Rousseau F., Subramaniam V., et al. (2012) A comparative analysis of the aggregation behavior of amyloid-β peptide variants. *FEBS Lett* **586**, 4088–93.

Vassar R., Bennett B. D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E. A., Denis P., Teplow D. B., et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735–41.

Vercellino I., Rezabkova L., Olieric V., Polyhach Y., Weinert T., Kammerer R. A., Jeschke G., Korkhov V. M. (2017) Role of the nucleotidyl cyclase helical domain in catalytically active dimer formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E9821–E9828.

Vergallo A., Mégret L., Lista S., Cavedo E., Zetterberg H., Blennow K., Vanmechelen E., et al. (2019) Plasma amyloid β 40/42 ratio predicts cerebral amyloidosis in cognitively normal individuals at risk for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **15**, 764–775.

Virdis A., Neves M. F., Amiri F., Touyz R. M., Schiffrin E. L. (2004) Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* **22**, 535–42.

Vromman A., Trabelsi N., Rouxel C., Béréziat G., Limon I., Blaise R. (2013a) β-amyloid context intensifies vascular smooth muscle cells induced inflammatory response and de-differentiation. *Aging Cell* **12**, 358–369.

Vromman A., Trabelsi N., Rouxel C., Béréziat G., Limon I., Blaise R. (2013b) β-amyloid context intensifies vascular smooth muscle cells induced inflammatory response and de-differentiation. *Aging Cell* **12**, 358–369.

Vrselja Z., Brkic H., Mrdenovic S., Radic R., Curic G. (2014) Function of circle of Willis. *J Cereb Blood Flow Metab* **34**, 578–84.

Vukic V., Callaghan D., Walker D., Lue L. F., Liu Q. Y., Couraud P. O., Romero I. A., Weksler B., Stanimirovic D. B., Zhang W. (2009) Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiol Dis* **34**, 95–106.

Wang D., Govindaiah G., Liu R., De Arcangelis V., Cox C. L., Xiang Y. K. (2010) Binding of amyloid beta peptide to beta2 adrenergic receptor induces PKA-dependent AMPA receptor hyperactivity. *FASEB J* **24**, 3511–21.

Wang D., Yuen E. Y., Zhou Y., Yan Z., Xiang Y. K. (2011) Amyloid beta peptide-(1-42) induces internalization and degradation of beta2 adrenergic receptors in prefrontal cortical neurons. *J Biol Chem* **286**, 31852–63.

Wang G., Jacquet L., Karamariti E., Xu Q. (2015) Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *The Journal of Physiology* **593**, 3013–3030.

Wang L., Hubert F., Idres S., Belacel-Ouari M., Domergue V., Domenichini S., Lefebvre F., et al. (2023) Phosphodiesterases type 2, 3 and 4 promote vascular tone in mesenteric arteries from rats with heart failure. *Eur J Pharmacol* **944**, 175562.

Wang Y., Dubland J. A., Allahverdian S., Asonye E., Sahin B., Jaw J. E., Sin D. D., Seidman M. A., Leeper N. J., Francis G. A. (2019) Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in ApoE (Apolipoprotein E)-Deficient Mouse Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 876–887.

Webb R. C. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* **27**, 201–6.

Weintraub W. S. (2007) The pathophysiology and burden of restenosis. *Am J Cardiol* **100**, 3K-9K.

Weller R. O., Djuanda E., Yow H. Y., Carare R. O. (2009) Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol* **117**, 1–14.

Weller R. O., Subash M., Preston S. D., Mazanti I., Carare R. O. (2008) Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **18**, 253–66.

Wellington C. L., Yang Y.-Z., Zhou S., Clee S. M., Tan B., Hirano K., Zwarts K., Kwok A., Gelfer A., Marcil M. (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**, 1939–1949.

Whisnant R. E., Gilman A. G., Dessauer C. W. (1996) Interaction of the two cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6621–5.

White A. W., Westwell A. D., Brahemi G. (2008) Protein-protein interactions as targets for small-molecule therapeutics in cancer. *Expert Rev Mol Med* **10**, e8.

Wilkins E., Wilson L., Wickramasinghe K., Bhatnagar P., Leal J., Luengo-Fernandez R., Burns R., Rayner M., Townsend N. (2017) European cardiovascular disease statistics 2017.

Willie C. K., Tzeng Y.-C., Fisher J. A., Ainslie P. N. (2014) Integrative regulation of human brain blood flow. *The Journal of Physiology* **592**, 841–859.

Willoughby D. (2012) Organization of cAMP signalling microdomains for optimal regulation by Ca2+ entry. *Biochem Soc Trans* **40**, 246–50.

Willoughby D., Cooper D. M. (2007) Organization and Ca2+ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* **87**, 965–1010.

Wilson C. A., Doms R. W., Lee V. M. (1999) Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 787–94.

Wirka R. C., Wagh D., Paik D. T., Pjanic M., Nguyen T., Miller C. L., Kundu R., et al. (2019) Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat Med* **25**, 1280–1289.

Wisniewski H. M., Wegiel J. (1994) Beta-amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. *Acta Neuropathol* **87**, 233–41.

Wootten D., Christopoulos A., Marti-Solano M., Babu M. M., Sexton P. M. (2018) Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 638–653.

WOYDA W., BERKAS E., FERGUSON D. (1960) The atherosclerosis of aortic and pulmonary artery exchange autografts. *Surg Forum* **11**, 174–6.

Wynne B. M., Chiao C. W., Webb R. C. (2009) Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens* **3**, 84–95.

Xue Y., Lee S., Ha Y. (2011) Crystal structure of amyloid precursor-like protein 1 and heparin complex suggests a dual role of heparin in E2 dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16229–34.

Yamada A., Hirose K., Hashimoto A., Iino M. (2005) Real-time imaging of myosin II regulatory light-chain phosphorylation using a new protein biosensor. *Biochem J* **385**, 589–94.

Yamada M. (2015) Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke* **17**, 17–30.

Yamamoto H., Breemen C. van (1986) Ca2+ compartments in saponin-skinned cultured vascular smooth muscle cells. *J Gen Physiol* **87**, 369–89.

Yan S. Z., Beeler J. A., Chen Y., Shelton R. K., Tang W. J. (2001) The regulation of type 7 adenylyl cyclase by its C1b region and Escherichia coli peptidylprolyl isomerase, SlyD. *J Biol Chem* **276**, 8500–6.

Yang X., Long L., Southwood M., Rudarakanchana N., Upton P. D., Jeffery T. K., Atkinson C., Chen H., Trembath R. C., Morrell N. W. (2005) Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* **96**, 1053–63.

Yap C., Mieremet A., Vries C. J. M. de, Micha D., Waard V. de (2021) Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Krüppel-Like Factor 4). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **41**, 2693–2707.

Yasar S., Xia J., Yao W., Furberg C. D., Xue Q. L., Mercado C. I., Fitzpatrick A. L., et al. (2013) Antihypertensive drugs decrease risk of Alzheimer disease: Ginkgo Evaluation of Memory Study. *Neurology* **81**, 896–903.

Yoshida H., Kisugi R. (2010) Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* **411**, 1875–82.

Yu H., Fellows A., Foote K., Yang Z., Figg N., Littlewood T., Bennett M. (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). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 555–565.

Yu L., Edalji R., Harlan J. E., Holzman T. F., Lopez A. P., Labkovsky B., Hillen H., et al. (2009) Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer. *Biochemistry* **48**, 1870–7.

Zeron M. M., Hansson O., Chen N., Wellington C. L., Leavitt B. R., Brundin P., Hayden M. R., Raymond L. A. (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* **33**, 849–60.

Zervas N. T., Liszczak T. M., Mayberg M. R., Black P. M. (1982) Cerebrospinal fluid may nourish cerebral vessels through pathways in the adventitia that may be analogous to systemic vasa vasorum. *J Neurosurg* **56**, 475–81.

Zhai K., Hubert F., Nicolas V., Ji G., Fischmeister R., Leblais V. (2012a) β-Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One* **7**, e47826.

Zhai K., Hubert F., Nicolas V., Ji G., Fischmeister R., Leblais V. (2012b) β-Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One* **7**, e47826.

Zhang G., Xi M., Li Y., Wang L., Gao L., Zhang L., Yang Z., Shi H. (2021) The ADCY9 genetic variants are associated with glioma susceptibility and patient prognosis. *Genomics* **113**, 706–716.

Zhang J. F., Mehta S., Zhang J. (2022) Protocol for reading and imaging live-cell PKA activity using ExRai-AKAR2. *STAR Protoc* **3**, 101071.

Zhang J. H., Badaut J., Tang J., Obenaus A., Hartman R., Pearce W. J. (2012) *The vascular neural network--a new paradigm in stroke pathophysiology.*

Zhang K. Y., Card G. L., Suzuki Y., Artis D. R., Fong D., Gillette S., Hsieh D., et al. (2004) A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Mol Cell* **15**, 279–86.

Zhang L., Bouadjel K., Manoury B., Vandecasteele G., Fischmeister R., Leblais V. (2019) Cyclic nucleotide signalling compartmentation by PDEs in cultured vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **176**, 1780–1792.

Zhang L., Xia Y., Gui Y. (2023) Neuronal ApoE4 in Alzheimer's disease and potential therapeutic targets. *Front Aging Neurosci* **15**, 1199434.

Zhang S. H., Reddick R. L., Piedrahita J. A., Maeda N. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258**, 468–71.

Zhang X., Brossas J. Y., Parizot C., Zini J. M., Rebollo A. (2017) Identification and characterization of novel enhanced cell penetrating peptides for anti-cancer cargo delivery. *Oncotarget* **9**, 5944–5957.

Zhu X., Wess J. (1998) Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* **37**, 15773–84.

Zhu Y., Qu J., He L., Zhang F., Zhou Z., Yang S., Zhou Y. (2019) Calcium in Vascular Smooth Muscle Cell Elasticity and Adhesion: Novel Insights Into the Mechanism of Action. *Front Physiol* **10**, 852.

Zipfel G. J., Han H., Ford A. L., Lee J. M. (2009) Cerebral amyloid angiopathy: progressive disruption of the neurovascular unit. *Stroke* **40**, S16-9.