



HAL
open science

Etude physiopathologique du tonus myogénique vasculaire : implication de Rhoa, de Notch3 et du facteur de réponse au sérum.

Kevin Retailleau

► **To cite this version:**

Kevin Retailleau. Etude physiopathologique du tonus myogénique vasculaire : implication de Rhoa, de Notch3 et du facteur de réponse au sérum.. Médicaments. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00536142

HAL Id: tel-00536142

<https://theses.hal.science/tel-00536142>

Submitted on 1 Jan 2012

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.

**ETUDE PHYSIOPATHOLOGIQUE DU TONUS MYOGENIQUE
VASCULAIRE: IMPLICATION DE RHOA, DE NOTCH3
ET DU FACTEUR DE REPONSE AU SERUM.**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Pharmacologie expérimentale et clinique

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 Mars 2010

A ANGERS

Par M^r KEVIN RETAILLEAU

Devant le jury ci-dessous :

Docteur Eric HONORE	Rapporteur	Directeur de Recherche	CNRS
Docteur Jean-Sébastien SILVESTRE	Rapporteur	Directeur de Recherche	INSERM
Docteur Josiane FONTAINE-Perus	Examineur	Directeur de Recherche	CNRS
Docteur Céline FASSOT-LUCHT	Examineur	Chargé de Recherche	INSERM
Professeur Pierre PACAUD	Examineur	Professeur	Université de Nantes

Directeur de thèse: Docteur Laurent LOUFRANI

Laboratoire de Biologie Neurovasculaire Intégrée

UMR-CNRS 6214; INSERM 771

Faculté de Médecine, Rue haute de Reulée 49045 ANGERS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier M. Eric Honoré et M. Jean-Sébastien Silvestre d'avoir accepté d'examiner mes travaux et d'en être les rapporteurs.

Je remercie M^{me} Josiane Fontaine-Perus, M^{me} Céline Fassot-Lucht et M. Pierre Pacaud d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Laurent Loufrani, de m'avoir encadré durant ces années de thèse. Merci Laurent pour ta disponibilité et tes conseils avisés qui m'ont permis de me forger une expérience scientifique et technique. Merci aussi pour ton aide précieuse et plus particulièrement pour la confiance que tu m'as accordée au cours de ces différents protocoles.

Je remercie sincèrement mon directeur de laboratoire, Daniel Henrion, de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions. Merci pour l'ensemble de vos précieux conseils. Je vous remercie également pour votre patience, votre gentillesse et vos encouragements constants.

Merci à Eric, sur qui j'ai pu compter depuis mon arrivée dans le laboratoire et qui a su être là durant toutes ces années malgré la distance.

Merci à Emilie, Anne-Laure, Bertrand, Isabelle, Gilles, Kahena et Lamine pour leur soutien dans les instants difficiles. Merci pour votre aide précieuse et pour votre bonne humeur. Je garderai de très bons souvenirs des journées passées à vos côtés. Ceux-ci ne sont que des remerciements provisoires...

Je tiens à remercier Laëtitia qui m'a soutenu quoiqu'il arrive. Merci de m'avoir apporté ce bol d'air indispensable pour pouvoir avancer. Tu m'as permis d'oublier les petits soucis de la journée.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à mes parents et à mon frère qui ont toujours été là pour me soutenir dans mes choix, qui m'ont fait confiance et qui m'ont encouragé depuis le début!

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées au cours de ma thèse et au contact desquelles j'ai énormément appris.

Je remercie Angers-Loire Métropole pour le soutien financier qui m'a permis de faire aboutir mes travaux dans de bonnes conditions.

Enfin, une petite pensée pour les principaux acteurs de mes travaux, les animaux (hamsters, rats et souris) sans qui rien n'aurait été possible!

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	2
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	3
INTRODUCTION	5
I- Structure et fonction du système vasculaire	6
I.1- Généralités	6
I.2- Structure de la paroi vasculaire	7
I.2.1- Les artères élastiques ou de compliance	8
I.2.1.1- L'intima	8
I.2.1.2- La média	8
I.2.1.3- L'adventice	9
I.2.2- Les artères musculaires	9
I.2.2.1- L'intima	9
I.2.2.2- La média	10
I.2.2.3- L'adventice	10
I.3- L'innervation de la paroi artérielle.....	10
I.4- Notch3 : un récepteur affectant la structure des artères de résistance	11
I.4.1- Généralités :	11
I.4.2- Rôle de Notch3	11
II- Les cellules musculaires lisses.....	12
II.1- Généralités	12
II.2- Structure du cytosquelette.....	14
II.2.1- Les myofilaments	14
II.2.1.1- Les Filaments fins.....	14
II.2.1.2- Les filaments épais	16
II.2.2- Les filaments intermédiaires.....	17
II.2.3- Les microtubules	18
II.2.4- L'association dystrophine/complexe glycoprotéique	18
II.2.4.1- La dystrophine	18
II.2.4.2- Le complexe glycoprotéique	19
II.2.4.3- Rôle de l'association dystrophine/complexe glycoprotéique	20
II.2.5- La filamine.....	20
II.2.5.1- Généralités.....	20
II.2.5.2- Structure	21
II.2.5.3- Rôles et régulation des filamines.....	21
II.2.6- Rôle du cytosquelette dans le maintien de la structure cellulaire.....	22
III- Les protéines de signalisation de la contraction	22
III.1- Généralités sur l'appareil contractile.....	22
III.2- Les Protéines membranaires.....	23
III.2.1- Les cavéoles	23
III.2.1.1- Généralités sur les cavéoles	23
III.2.1.2- Les cavéolines	24
a) Généralités	24
b) Structure des cavéolines	25
c) Rôle dans les voies de signalisation.....	25
III.2.2- Les sites d'adhésion focaux	26
III.2.2.1- Les intégrines	27
a) Généralités	27
b) Structure	27
c) Fonction	27
III.2.2.2- La kinase des points d'adhésion focaux (FAK).....	28
a) Structure.....	28

b) Rôle de FAK.....	28
c) Régulation.....	29
III.2.2.3- Les protéines G	29
a) Les protéines G hétérotrimériques.....	29
b) Les protéines G monomériques.....	30
→ La protéine Rho A	31
Régulation.....	31
Rôle.....	31
→ Rho-kinase et mDia, deux effecteurs de RhoA	32
Rho-kinase	32
mDia	32
III.3- Les protéines de signalisation intracellulaire (ou cytoplasmique)	33
III.3.1- Les protéines kinases.....	33
III.3.1.1- Les protéines kinases C	33
a) Généralités.....	33
b) Rôle et régulation	34
III.3.1.2- Les MAP Kinases.....	34
a) Les protéines ERK 1/2 et JNK.....	35
b) La voie de la MAPKinase p38.....	36
→ Activation et rôle	36
→ Régulation.....	36
III.4- Les protéines régulant la phosphorylation de la myosine	37
III.4.1- La MLCK	38
III.4.2- La MLCP.....	38
III.5- Le calcium	39
III.5.1- Concentration calcique intracellulaire.....	39
III.5.1.1- Les canaux calciques dépendants du voltage	39
III.5.1.2- Les canaux cationiques non-sélectifs et les CRACs	40
III.5.1.3- Le réticulum sarcoplasmique : une réserve calcique.....	40
III.5.2- Sensibilisation au calcium de l'appareil contractile.....	41
IV- Le facteur de réponse au sérum (SRF)	43
IV.1- Présentation	43
IV.2- Régulation de SRF	43
IV.2.1- Généralités	43
IV.2.2- Les cofacteurs	44
IV.3- Implication de SRF dans des pathologies	46
IV.3.1- La maladie d'Alzheimer	46
IV.3.2- Le vieillissement	46
IV.3.3- La différenciation cellulaire.....	47
IV.3.4- Les dysfonctions musculaires	47
IV.3.4.1- Le muscle cardiaque	47
IV.3.4.2- Le muscle lisse.....	48
V- Le Tonus Myogénique : une adaptation rapide à une variation de pression.....	49
V.1- La microcirculation et le flux sanguin : Généralités	49
V.2- Le tonus myogénique : Définition.....	50
V.3- Les coulisses du tonus myogénique	50
V.3.1- Induction et régulation	51
V.3.1.1- Le potentiel membranaire: un élément déterminant.....	51
V.3.1.2- Participation des canaux ioniques	51
a) Les canaux inducteurs du tonus myogénique (mécanosenseurs)	51
→ Les canaux calciques dépendants du voltage.....	52
→ Les canaux activés par l'étirement (Stretch-activated channels).....	52
→ Les canaux TRP (Transient Receptor Potential)	53
→ Le canal sodique épithéliale (ENaC)	54
b) Les canaux régulateurs du tonus myogénique.....	54
→ Les canaux potassiques.....	54

Les canaux potassiques dépendants du calcium (BKCa)	55
Les canaux potassiques dépendants du voltage (K _v)	55
Les canaux TREK-1 (TWIK-related K ⁺)	55
→ Les canaux chlore	56
V.3.1.3- Le cytosquelette.....	56
V.3.1.4- Les intégrines	57
V.3.1.5- Autre mécanosenseurs	57
a) Les jonctions gap	57
b) Les métalloprotéinases	58
V.3.2- Le tonus myogénique : des seconds messagers spécifiques.....	58
V.3.2.1- La voie RhoA/RhoKinase dans le tonus myogénique.....	59
V.3.2.2- Autres protéines kinases dans le tonus myogénique	59
a) Les PKC.....	59
b) Les MAPKineses p38 et ERK1/2	60
V.3.3- Au regard du calcium, le tonus myogénique : une contraction parmi tant d'autres.....	60
V.3.4- La sensibilité calcique, dans la contraction myogénique.....	61
V.4- Le Tonus Myogénique dans les pathologies	61
VI- Le remodelage vasculaire: une adaptation à long terme à des variations hémodynamiques.	62
VI.1- Généralités.....	62
VI.2- Le remodelage dépendant de la pression	63
VI.3- Le remodelage dépendant du débit	63
VII- Le Sildenafil dans la réactivité vasculaire.....	64
VII.1- Généralités	64
VII.2- Les phosphodiésterases (PDE).....	65
VII.2.1- Généralités	65
VII.2.2- Structure.....	65
VII.2.3- Rôle.....	65
VII.3- La Guanosine Monophosphate cyclique (GMPc).....	66
VII.4- La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG).....	66
OBJECTIF	68
RESULTATS	70
- RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries	71
- Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries	73
- Selective involvement of Serum Response Factor in pressure-induced myogenic tone in resistance arteries	75
- The PDE5 inhibitor treatment and its interruption affect myogenic tone in rat resistance arteries	77
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	79
ANNEXES	85
Complément du matériel et méthode de l'étude n°3	86
⇒ Description du modèle de souris SRF ^{smko}	86
⇒ Mesure de RhoA-GTP par G-LISA TM	87
⇒ Anticorps utilisés en Western-blot :	89
⇒ Amorces utilisées en PCR quantitative :	89
BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS PRESENTEES DANS LA THESE :

- 1/ Dubroca C, Loyer X, **Retailleau K**, Loirand G, Pacaud P, Feron O, Balligand JL, Levy BI, Heymes C, Henrion D. **RhoA activation and interaction with caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries.** *Cardiovasc Res.* 2007 Jan 1; 73(1):190-7.
- 2/ Belin de Chantemèle EJ, **Retailleau K**, Pinaud F, Vessières E, Bocquet A, Guihot AL, Lemaire B, Domenga V, Baufreton C, Loufrani L, Joutel A, Henrion D. **Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Dec;28(12):2216-24.
- 3/ **K. Retailleau**, B. Toutain, G. Galmiche, R. Sharif-Naeini, G. Kauffenstein, M. Mericskay, F. Duprat, P. Lacolley, R. Feil, D. Henrion, Z. Li, L. Loufrani. **Serum Response Factor involvement in myogenic tone regulation in resistance arteries.** *En Soumission.*
- 4/ **K. Retailleau**, D. Tsvirkun, C. Baron-Menguy, A.L. Guihot, B. Toutain, L. Grimaud, P. Pacaud, G. Loirand, D. Henrion, L. Loufrani. **Chronic PDE5 inhibition affects myogenic tone in rat resistance arteries.** *En cours.*

AUTRES PUBLICATIONS:

- 5/ **Retailleau K**, Belin de Chantemèle EJ, Chanoine S, Guihot AL, Vessières E, Toutain B, Faure S, Bagi Z, Loufrani L, Henrion D. **Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A2 reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries.** *Hypertension.* 2010 Feb;55(2):339-44.
- 6/ Loufrani L, **Retailleau K**, Bocquet A, Dumont O, Danker K, Louis H, Lacolley P, Henrion D. **Key role of alpha(1)beta(1)-integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Apr; 294(4):H1906-13.
- 7/ Pinaud F, Bocquet A, Dumont O, **Retailleau K**, Baufreton C, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. **Paradoxical role of Angiotensin II type 2 receptors in resistance arteries of old rats.** *Hypertension.* 2007 Jul; 50(1):96-102.
- 8/ Sharif-Naeini R, Folgering JH, Bichet D, Duprat F, Lauritzen I, Arhatte M, Jodar M, Dedman A, Chatelain FC, Schulte U, **Retailleau K**, Loufrani L, Patel A, Sachs F, Delmas P, Peters DJ, Honoré E. **Polycystin-1 and -2 Dosage Regulates Pressure Sensing.** *Cell.* 2009 Oct 30;139(3):587-96.
- 9/ Guilluy C, Brégeon J, Toumaniantz G, Rolli-Derkinderen M, **Retailleau K**, Loufrani L, Henrion D, Scalbert E, Bril A, Torres RM, Offermanns S, Pacaud P, Loirand G. **The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure.** *Nat Med.* 2010 Feb;16(2):183-90..
- 10/ Arnaud Bocquet, **Kevin Retailleau**, Eric Belin de Chantemèle, Yves Fromes, Daniel Henrion, Laurent Loufrani. **Alteration of microvascular flow-mediated dilation in Syrian hamsters lacking δ -sarcoglycan is caused by enhanced oxidative stress.** *Soumis à J Cell Mol Med.*

LISTE DES ABREVIATIONS

5HT ₂	Récepteur à la Sérotonine de type 2	HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
20-HETE	Acide 20-hydroxyeicosatriénoïque	Ig	Immunoglobuline
AA	Acide arachidonique	IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
Actine F	Actine Filamenteuse	JNK	Jun N-terminal kinase
Actine G	Actine Globulaire	Kv	Canaux potassiques voltage dépendants
ADN	Acide Désoxyribonucléique	LIMK	LIM domain Kinase
ADP	Adénosine Diphosphate	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique	MAPKAPK	MAPK-Activated Protein Kinase
ASK	Activator of S phase Kinase	MAPKK	MAPK Kinase
AT1	Récepteur à l'Angiotensine II de type 1	MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
ATF2	Activating Transcription Factor 2	MKK	MAP Kinase Kinase
ATP	Adénosine Triphosphate	MEC	Matrice Extracellulaire
ATPase	Enzyme hydrolysant l'ATP	MEF	Myocyte Enhancer Factor
BK _{Ca}	Canaux potassiques calcium-dépendants à grande conductance	Mg-ATPase	ATPase activée par le magnésium
CaMK	Ca ²⁺ /Calmoduline dependent kinase	MLC	Myosin Light Chain
CCVD	Canaux Calciques Voltage Dépendants	MLCK	Myosin Light Chain Kinase
CHO	Chinese Hamster Ovary	MLCP	Myosin Light Chain Phosphatase
CML(s)	Cellule(s) Musculaire(s) Lisse(s)	MLK	Mixed-Lineage Kinase
CMLV	Cellule Musculaire Lisse Vasculaire	MRTFA/B	Myocardin-Related Transcription Factor A/B
CNG	Cyclic Nucleotid Gated channel	MYPT	Myosin Phosphatase Target
CPI-17	PKC-activated protein Phosphatase Inhibitor of 17 kDa	NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
CRAC	Ca ²⁺ -Release Activated Ca ²⁺ channel	NLS	Nuclear Localization Signal
DAG	Diacylglycerol	NO	Monoxyde d'azote
Dia ½	Diaphanous ½	PAK	p21 Ras-activated kinase
ENaC	Canal sodique épithéliale	PDE	Phosphodiésterase
ERK 1/2	Extracellular Regulated Kinase 1/2	PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
ETA	Récepteur à l'Endothéline-1 de type A	PDK	Phosphoinositide Dependent Kinase
FAK	Focal Adhésion Kinase	PKG	Protéine Kinase G
FAT	Focal Adhésion Targeting	PLC	Phospholipase C
FGF	Fibroblast Growth Factor	PIGF	Placenta Growth Factor
FH1	Formin Homology 1	RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
GAP	GTPase-activating protein	ROCK	Rho-kinase
GC	Guanylate Cyclase	RS	Réticulum Sarcoplasmique
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor	SAC	Stretch Activated Chanel
GDP	Guanosine Diphosphate	SRF	Serum Response Factor
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor	TAB	TAK Binding protein
GMPC	Guanosine MonoPhosphate cyclique	TAK	TGFβ-Activated Kinase
Grb2	Growth binding protein 2	TGF	Transforming Growth Factor
GTP	Guanosine Triphosphate	TM	Tonus Myogénique
HCN	Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel	TNF	Tumor Necrosis Factor
HEK-293	Cellules embryonnaires rénales humaines 293	TREK-1	TWIK-related K ⁺
HSP27	Heat Shock Protein de 27kDa	TRP	Transient Receptor Potential
HTA	Hypertension artérielle	YY1	Yin Yang 1

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES.

TABLEAUX :

Tableau 1 : Caractéristiques des différents vaisseaux sanguins humains. *Page 6*

Tableau 2 : Protéines des filaments intermédiaires. *Page 17*

Tableau 3 : Analyse phénotypique de souris déficientes en cavéoline. *Page 25*

FIGURES :

Figure 1 : Schéma de la structure pariétale d'une artère. *Page 7*

Figure 2 : Schéma simplifié de la voie de signalisation Notch. *Page 11*

Figure 3 : Structure et formation des filaments fins. *Page 15*

Figure 4 : Structure de la myosine et formation d'un filament épais. *Page 16*

Figure 5 : Structure des filaments intermédiaires. *Page 17*

Figure 6 : Association de la Dystrophine avec le complexe glycoprotéique membranaire. *Page 19*

Figure 7 : Structure et rôle de la filamine. *Page 21*

Figure 8 : Représentation schématique du concept de tenségrité cellulaire. *Page 22*

Figure 9 : Représentation simplifiée du mécanisme de contraction des cellules musculaires lisses.
Page 23

Figure 10 : Structure des cavéoles et de la cavéoline-1. *Page 24*

Figure 11 : Exemple schématique de liens formés par les intégrines entre les milieux extra et intracellulaires. *Page 27*

Figure 12 : Protéines de signalisation des sites d'adhésion focaux. *Page 28*

Figure 13 : Cycle d'activité des protéines de la famille Rho. *Page 31*

Figure 14 : Schéma simplifié des voies de signalisation de la MAPK p38. *Page 36*

Figure 15 : Régulation de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC₂₀). *Page 37*

Figure 16 : Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation modulant la concentration en Ca²⁺ intracellulaire. *Page 40*

Figure 17 : Enregistrements simultanés de la contraction et de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire lors d'une stimulation au carbachol. *Page 41*

Figure 18 : Schéma simplifié des voies de signalisation intervenant dans la sensibilisation au Ca²⁺ de l'appareil contractile. *Page 42*

- Figure 19** : Schéma de la séquence codant pour SRF. *Page 43*
- Figure 20** : Intervention de la voie RhoA et de la polymérisation dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de SRF. *Page 45*
- Figure 21A** : Enregistrements typiques de la réponse d'un vaisseau méésentérique de résistance à une augmentation de pression. *Page 50*
- Figure 21B** : Réponse myogénique d'artérioles. *Page 50*
- Figure 22** : Dépolarisation de muscles lisses d'artères cérébrales soumises à des paliers de pression. *Page 51*
- Figure 23** : Effet du complexe Actine/Filamine/TRPP2 sur la tension de surface et sur l'activité des canaux mécanosensibles. *Page 56*
- Figure 24** : Schéma simplifié des différentes voies de signalisation intervenant dans le développement du tonus myogénique. *Page 58*
- Figure 25** : Schéma simplifié du remodelage artériel en réponse à des modifications chroniques de pression ou de flux. *Page 62*
- Figure 26** : Structure des différents inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5. *Page 64*
- Figure 27** : Mécanisme d'action du sildénafil. *Page 65*
- Figure 28** : Schéma bilan des voies mises en évidence dans cette thèse. *Page 83*

INTRODUCTION

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

Tableau 1 : Caractéristiques des différents vaisseaux sanguins humains

I- Structure et fonction du système vasculaire

I.1- Généralités

Le fonctionnement normal de l'organisme nécessite un apport en oxygène et en nutriments au niveau des tissus ainsi qu'une élimination des déchets (créatinine, CO₂, urée). C'est dans cette mission que le système cardiovasculaire joue son rôle le plus important en respectant une hiérarchie dans les distributions régionales : cerveau, rein, territoire splanchnique et membres. Comme son nom l'indique, le système cardiovasculaire est formé de différents acteurs : d'une pompe, le cœur et d'une tubulure, le système vasculaire. Le cœur se situe au début et à la fin de ce réseau hydraulique et permet la propulsion du sang, ce qui génère un débit sanguin et par conséquent de la pression résultant de la résistance opposée à son travail.

Le rôle du système cardiovasculaire ne se cantonne pas uniquement au ravitaillement des organes en nutriments et en oxygène, il forme également un réseau de contrôle permettant le transport et la sécrétion d'hormones. Il participe aussi à la défense de l'organisme via la mobilité qu'il donne aux cellules immunitaires. Enfin, il intervient dans le maintien de la température corporelle en acheminant la chaleur produite par les organes jusqu'à la peau.

Le système vasculaire peut être divisé en deux parties : le **réseau artériel**, qui part du cœur vers les organes, et le **réseau veineux**, qui ramène le sang au cœur. La répartition du sang dans l'organisme impose une structure allant des plus gros vaisseaux (macrocirculation) aux plus fins (microcirculation). A l'inverse, pour ramener le sang au cœur, le système veineux rassemble une multitude de petits vaisseaux formant les grosses veines. Il existe différents types de vaisseaux qui se succèdent le long de cet arbre vasculaire, classés selon leur taille et leur fonction (Tableau 1).

Les artères se divisent en 2 types différents : les **artères élastiques** ou de conductance et les **artères musculaires** ou de résistance. Les artères élastiques comme aorte et carotide ont un rôle d'amortisseur de la pulsativité engendrée par l'activité cardiaque. Elles emmagasinent du sang pendant la systole qu'elles restituent pendant la diastole. Elles transforment le flot discontinu du sang éjecté par le ventricule gauche en flot pulsé mais continu à la périphérie. Dans les grosses artères, la résistance à l'écoulement est très faible et la vitesse d'écoulement du sang est très élevée. A l'opposé, les artères musculaires (artères coronaires, mésentériques...) distribuent le sang en adaptant leur débit aux besoins des organes cibles. Dans ces artères, la résistance à l'écoulement est

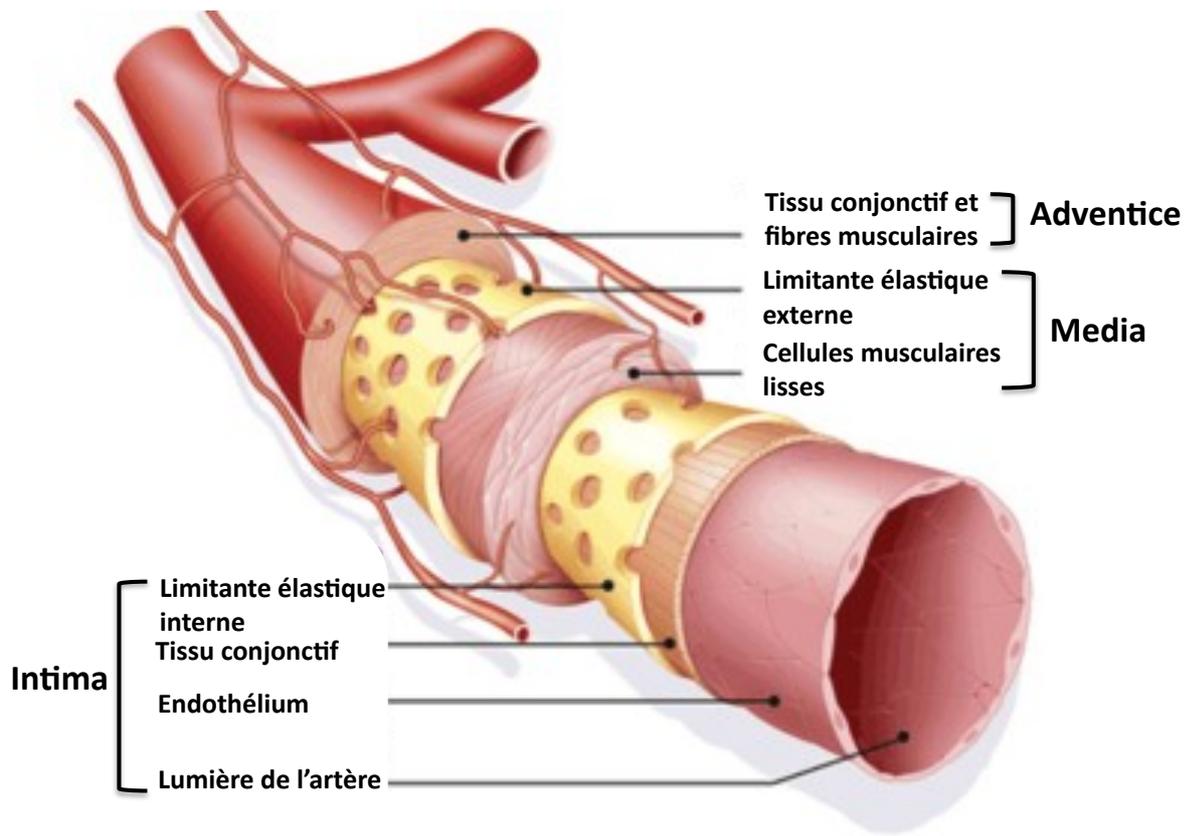


Figure 1 : Schéma de la structure pariétale d'une artère.

très élevée, ce qui induit une importante chute de pression, mais la vitesse d'écoulement du sang y reste élevée.

L'ensemble du réseau artériel systémique assure le transport du sang du ventricule gauche vers capillaires tissulaires, ainsi que le réglage de la distribution sanguine via l'intervention de phénomènes actifs de vasomotricité. Ainsi, le débit ne varie pratiquement pas au niveau de certains organes, tels que le cerveau, alors que dans d'autres cas il peut être multiplié par 20 ou même 40 pour s'adapter à l'activité fonctionnelle (au niveau de la peau) ou métabolique de l'organe (cas du muscle).

En considérant le sang comme un liquide newtonien circulant avec une pression moyenne, le débit au niveau d'un organe se calcule selon le rapport : Pression efficace sur la Résistance à l'écoulement (Loi de Darcy). La pression efficace (pression artérielle moyenne et veineuse) ne variant pratiquement pas, le seul facteur de variation du débit au niveau d'un organe est donc la résistance à l'écoulement (R) du sang, or d'après la loi de Poiseuille : $R=8\eta l/\pi r^4$ (η : la viscosité ; l : la longueur du vaisseau ; r : rayon du vaisseau). Dans cette équation, seul « r » n'est pas constant. C'est donc en faisant varier leur calibre que les vaisseaux contrôlent le débit au niveau des organes qu'ils irriguent. De plus, sachant que dans la loi de Poiseuille le rayon du vaisseau est élevé à la puissance 4, la moindre variation de ce dernier suffit à faire augmenter le débit significativement. Ces changements actifs du calibre des vaisseaux constituent la vasomotricité.

Les fibres musculaires lisses, qui constituent la paroi des artères, régissent leur calibre et peuvent répondre à des stimuli divers incluant des signaux d'ordre hémodynamique, tels que la pression et le flux. Ainsi, les variations de pression sanguine sont perçues par la paroi vasculaire comme des contraintes tensionnelles qui induisent à leur tour des variations du diamètre des artères. Il en est de même pour le flux qui induit des forces de cisaillement à la surface des cellules endothéliales. Les forces de cisaillement provoquent ainsi une dilatation dite flux-dépendante. Dans les conditions physiologiques, ces deux mécanismes s'équilibrent permettant le maintien d'un tonus basal vasculaire. Ces réponses fonctionnelles à la pression et au flux constituent la mécanotransduction.

I.2- Structure de la paroi vasculaire

Les vaisseaux sanguins sont constitués de tuniques morphologiquement distinctes qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : **l'intima** avec la limitante élastique interne, **la média** avec la limitante élastique externe et **l'adventice** (Figure 1). Cette division est très nette dans les gros troncs artériels.

L'importance et la complexité de ces tuniques dépendent du vaisseau sanguin et peuvent être très grandes ou réduites à une simple monocouche. Ainsi les artères élastiques et les artères musculaires ont une structure différente.

I.2.1- Les artères élastiques ou de compliance

Les artères élastiques sont essentiellement l'aorte, les carotides primitives, les artères pulmonaires, les artères iliaques, les artères sous-clavières et les artères brachio-céphaliques. Ces vaisseaux de gros calibre (de 1 à 2 cm de diamètre chez l'homme), intervenant dans le transport du sang, sont caractérisés par la présence dans leur paroi d'une importante charpente élastique (environ 40% d'élastine).

I.2.1.1- L'intima

L'intima est une couche vasculaire caractérisée par un endothélium constitué d'une monocouche de cellules plates ($2\mu\text{m}$), les cellules endothéliales, possédant un grand axe ($50\mu\text{m}$) parallèle à celui du vaisseau. Cette orientation est déterminée par les forces de cisaillement appliquées à leur surface par le flux sanguin¹. Ces cellules sont recouvertes d'un glycocalix (couche de mucopolysaccharides chargés négativement) dont le rôle essentiel est d'empêcher la thrombose sur la surface endothéliale et, plus récemment, on lui a découvert un rôle de mécanosenseur². Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées (*tight junctions*) et des jonctions communicantes (*gap junctions*) permettant les échanges d'ions, de métabolites et d'autres facteurs de régulation intercellulaire. La présence de filaments de myosine confère aux cellules endothéliales des propriétés contractiles. Cette contractilité permet un élargissement des espaces intercellulaires et par conséquent une augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, l'endothélium est un régulateur de la vasomotricité artérielle par la sécrétion de substances contractantes telles que l'endothéline ou le thromboxane A₂, ainsi que relaxantes comme la prostacycline ou le monoxyde d'azote agissant sur les cellules musculaires lisses (CMLs) de la média sous-jacente. L'endothélium repose sur une couche de tissu conjonctif constitué de microfibrilles de collagène (principalement de type IV) et de glycoprotéines : la lame basale. Elle sert de support lors de la régénération de l'endothélium. L'intima est délimitée par une limitante élastique interne, constituée de fibres élastiques transversales et ponctuée de fenestrations susceptibles de faciliter les communications entre les deux tuniques.

I.2.1.2- La média

La média est une tunique formée de lames élastiques unies les unes aux autres par des fibres élastiques obliques et positionnées de manière concentrique. Leur nombre est très variable en

fonction du diamètre de l'artère et peut atteindre par exemple 60 à 70 dans l'aorte chez l'homme adulte. Entre les lames élastiques, se trouve un tissu conjonctif, constitué de fibres de collagène de type I. On y observe principalement des cellules musculaires, à disposition concentrique réunissant les lames élastiques les unes aux autres, des microfibrilles d'élastine et des glycosaminoglycanes de la substance fondamentale. Cet ensemble forme une unité lamellaire³ qui sera ensuite caractérisée plus précisément comme un « feuillet musculo-élastique »⁴. Chaque feuillet correspond à un groupe de cellules enveloppées par une matrice, constitué d'une lame basale et d'un fin réseau de fibrille de collagène de type III et IV. Le tout est entouré d'un tapis de fibres élastiques dont l'orientation est identique à celle des grands axes des cellules. Cette organisation en structure lamellaire n'existe que dans les artères élastiques, les artères musculaires ne possédant pas cette architecture. Le nombre de feuillets est proportionnel au diamètre du vaisseau et augmente progressivement avec le poids et la taille chez les différentes espèces animales. La dernière lame élastique de la média constitue la limitante élastique externe.

1.2.1.3- L'adventice

L'adventice est une couche vasculaire peu développée dans les artères élastiques et formée d'un réseau de collagène prenant naissance à partir de la dernière lame élastique de la média. A ce niveau, on trouve des vaisseaux et des nerfs qui constituent respectivement les vasa vasorum et les nervi vasorum. Les vasa vasorum sont un réseau capillaire assurant la nutrition des cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau. Les apports en oxygène et en nutriments de l'intima et des deux tiers de la média se font directement par la diffusion des éléments du sang circulant. Les nervi vasorum, quant à eux, permettent une innervation des vaisseaux.

1.2.2- Les artères musculaires

Ce type d'artères constitue une grande part de l'arbre vasculaire. On peut citer notamment les artères des membres (artères coronaires, spléniques, rénales, humérales), les artères mésentériques et les artères cérébrales. Ces artères de petit calibre contiennent une grande proportion de cellules musculaires lisses par rapport aux artères élastiques, et jouent un rôle prépondérant dans la régulation systémique de la pression artérielle, pour une distribution optimale du sang au niveau de chaque tissu.

1.2.2.1- L'intima

Assez semblable à celle des artères élastiques, elle comporte un endothélium qui repose sur une couche conjonctive sous-endothéliale. Elle est limitée à sa partie profonde par une limitante élastique interne, épaisse, réfringente, et bien visible.

1.2.2.2- La média

La média est formée de fibres musculaires lisses, à disposition circulaire. Entre elles, s'intercalent quelques fibres de collagène ainsi qu'un fin réseau élastique se raccordant à la limitante élastique externe, formée de lamelles élastiques disposées en faisceaux irréguliers.

1.2.2.3- L'adventice

Formée de tissu conjonctif, l'adventice est souvent bien développée au niveau des artères musculaires et se continue en dehors avec le tissu conjonctif environnant. Le réseau élastique se raccorde aux lamelles élastiques de la limitante élastique externe. Les éléments conjonctifs se groupent en de volumineux faisceaux de fibres de collagène souvent orientés longitudinalement. L'adventice des artères de résistance contient de l'élastine, du collagène, des fibroblastes, des mastocytes, des macrophages, et parfois des cellules de Schwann associées à des terminaisons nerveuses. L'épaisseur de cette couche varie en fonction du lit vasculaire et de l'espèce. Elle est très développée au niveau des microvaisseaux. Le tissu conjonctif de l'adventice assure l'arrimage du vaisseau aux organes environnants.

1.3- L'innervation de la paroi artérielle

C'est au niveau de l'adventice que se trouvent les fibres nerveuses. Il s'agit principalement de fibres nerveuses amyéliniques, appartenant au système nerveux autonome, en particulier sympathique. Les afférences de ces fibres sont étroitement liées aux faisceaux de la limitante élastique externe.

Au niveau de leurs varicosités, se trouvent des vésicules synaptiques contenant le médiateur chimique (surtout noradrénergique mais aussi cholinergique). La libération de ce médiateur entraîne une dépolarisation de la membrane au niveau des fibres musculaires lisses de la média. La propagation de cette dépolarisation est assurée grâce aux zones de faible résistance électrique que sont les « nexus », jonctions heptalamellaires de type « gap » qui réunissent les fibres musculaires lisses entre elles. Les jonctions neuromusculaires du muscle lisse ne sont pas celles trouvées au niveau du muscle squelettique. Les fibres nerveuses rejoignent le sommet d'un feuillet de fibres musculaires. Il n'y a pas de contact direct entre les fibres musculaires et les fibres nerveuses, mais il y a formation de ce que l'on appelle des jonctions diffuses, qui sécrètent leur substance médiatrice à l'intérieur du liquide interstitiel à quelques nanomètres des cellules musculaires ; la substance médiatrice diffuse ensuite vers les cellules. De plus, là où il existe plusieurs couches de cellules musculaires, les fibres nerveuses n'innervent souvent que la couche externe, et l'excitation du

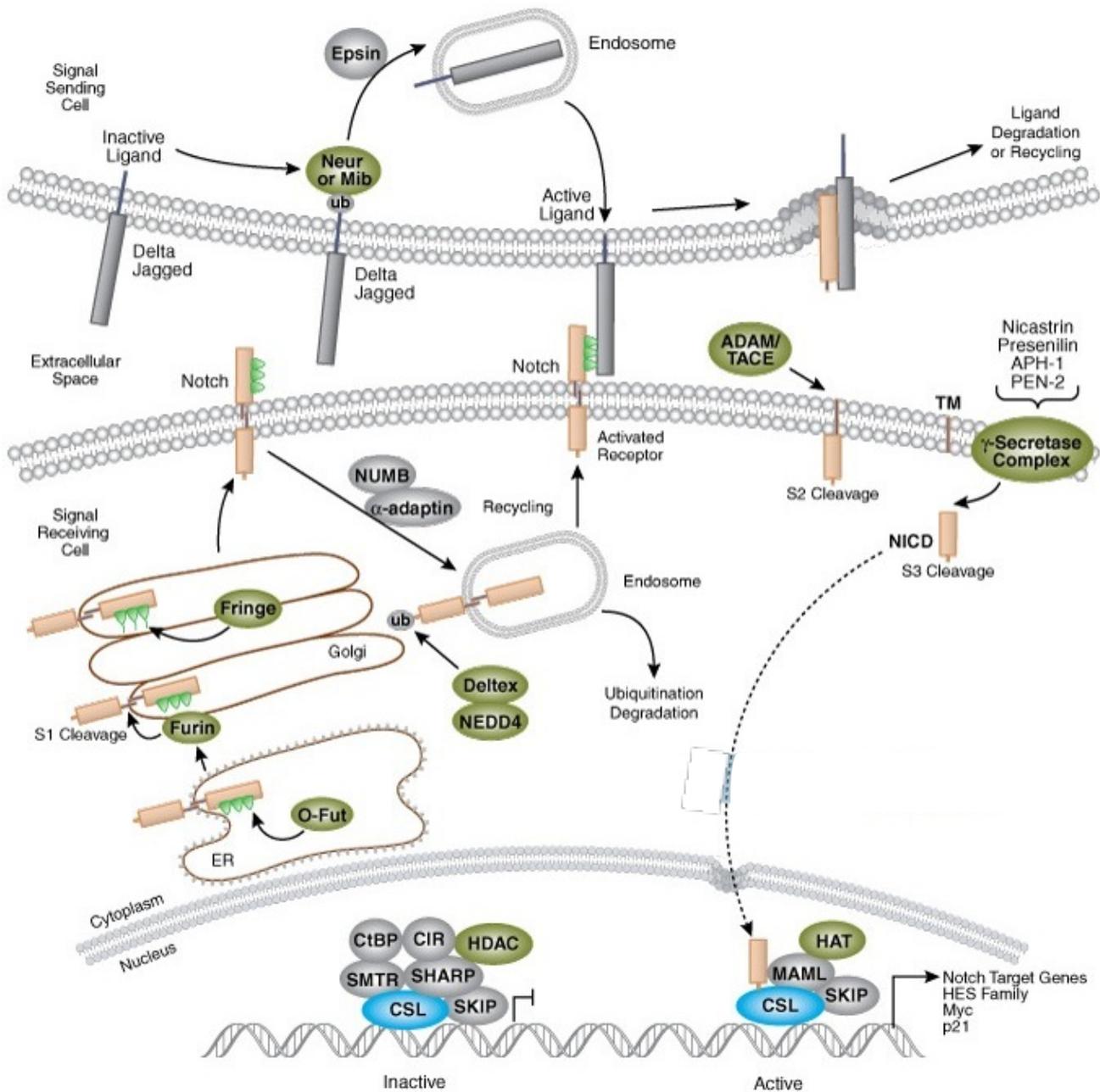


Figure 2: Schéma simplifié de la voie de signalisation Notch.

Pendant la maturation de la protéine, Notch subit un premier clivage par la furine (S1). Après l'interaction avec son ligand, Delta ou Jagged, sur ses motifs extracellulaires EGF-like, Notch subit un second clivage (S2) par une métalloprotéase TACE. Le domaine extracellulaire (NECD) du récepteur Notch est relargué, et le fragment tronqué du domaine extracellulaire restant devient le substrat du complexe γ -sécrétase qui libère le fragment intracellulaire du récepteur (NICD). Celui-ci s'associe avec une protéine cytoplasmique RBP-J κ et migre dans le noyau où il forme un complexe avec des facteurs de transcription comme CSL et MAM activant l'expression de gènes cibles.

muscle est transmise ensuite de cette couche vers les couches internes, soit par la propagation du potentiel d'action dans la masse musculaire, soit par la diffusion ultérieure de substances médiatrices telles que la noradrénaline et l'AVP (Atrial Vasoactive Peptide).

I.4- Notch3 : un récepteur affectant la structure des artères de résistance

I.4.1- Généralités :

Les récepteurs Notch sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 hautement conservées qui, en plus d'intervenir dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (différenciation, prolifération et survie cellulaire), contrôlent le devenir de la cellule⁵.

Chez les mammifères, quatre protéines Notch ont été décrites (Notch 1 à 4). Notch3 est codé par un gène présent sur le bras court du chromosome 19⁶. Ce récepteur, qui ne présente que quelques différences structurelles subtiles par rapport à Notch1 et Notch2, a une expression fortement restreinte aux CMLs des petites artères⁷. C'est probablement dû à sa distribution tissulaire limitée que la délétion de Notch3 n'engendre pas de mortalité embryonnaire⁸ contrairement à celle de Notch1 ou Notch2^{9,10}. Cependant, l'activation constitutive de Notch3, induite expérimentalement par la génération de souris transgéniques ou suite à des mutations génétiques spontanées, aboutit au développement de pathologies^{11,12}.

La liaison du récepteur Notch avec son ligand (Jagged et Delta), exprimé sur la cellule voisine, provoque des événements protéolytiques qui conduisent à la translocation du domaine intracellulaire de Notch vers le noyau (Figure 2). Ce domaine y interagit avec des facteurs de transcription qui induisent à leur tour l'expression de facteurs de transcription spécifiques de tissu régulant le destin de la cellule.

I.4.2- Rôle de Notch3

Des études génétiques effectuées chez l'homme et la souris ont mis en évidence que ce récepteur est un acteur clé dans la physiologie normale et la pathologie des petites artères. Chez l'homme, des mutations du domaine extracellulaire de Notch3 sont responsables de la maladie CADASIL. Les mutations CADASIL sont extrêmement stéréotypées, elles conduisent toutes à la présence d'un nombre impair de cystéines dans l'un des motifs EGF du domaine extracellulaire de Notch3. Dans ce cas, il y a une accumulation de la partie membranaire du récepteur dans la paroi artérielle. Cette maladie est une forme autosomique dominante de maladies systémiques des petites artères, caractérisée par des altérations des CMLs vasculaires (CMLVs) et la présence de dépôts

granulaires osmiophiles très spécifiques, appelés GOM (Granular Osmiophilic Material)⁶. Une des conséquences de cette maladie héréditaire est une dégénérescence progressive de la structure des petites artères cérébrales¹². Cela se traduit par un épaississement de la paroi des artérioles, l'endothélium est respecté mais la média est épaissie, avec une déformation et une dégénérescence des CMLs entraînant des accidents ischémiques cérébraux, une paralysie pseudobulbaire et de multiples infarctus sous-corticaux conduisant au décès du patient car il n'existe aucun traitement.

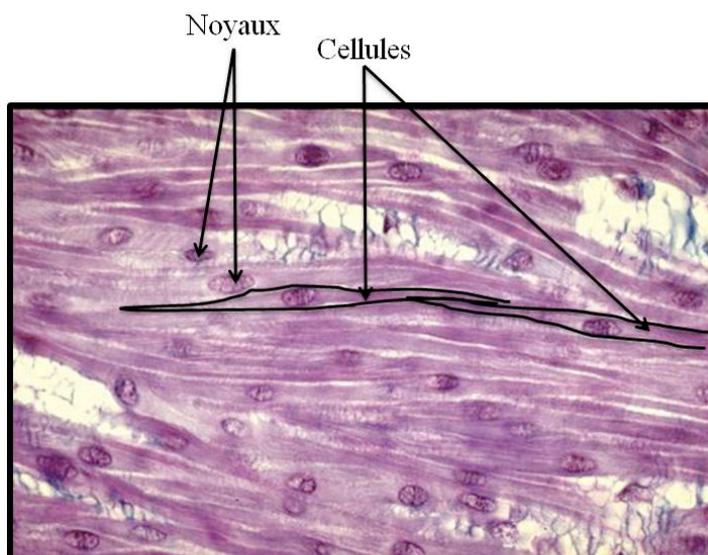
Chez la souris, Notch3 est nécessaire pour la maturation postnatale des petites artères, en contrôlant l'identité artérielle et le remodelage du cytosquelette des CMLs. L'inhibition de la maturation post-natale induit une malformation des CMLVs et une désorganisation de la média. Chez la souris, la délétion de Notch3 affecte spécifiquement la structure des artères cérébrales et caudales. Les artères de conductance, exprimant également Notch3, ne sont pas affectées par sa délétion⁸. Des études précédentes ont montré que la mutation de Notch3, à l'origine de la maladie CADASIL, entraîne un ancrage et une adhésion perturbés des CMLs avec les cellules endothéliales, ainsi que des anomalies de leur cytosquelette¹³. Or, comme nous allons le voir, la réorganisation du cytosquelette et son association avec les protéines contractiles sont des étapes importantes dans la modulation de la contraction des CMLs. De plus, cette mutation induit une augmentation du tonus myogénique et une diminution de la dilatation flux dépendante des artères de résistance¹⁴.

II- Les cellules musculaires lisses.

II.1- Généralités

L'organisme est constitué de trois types de muscles de fonctionnement bien distinct : les muscles squelettique, cardiaque et lisse. Le muscle lisse (ou viscéral par opposition avec le muscle squelettique) constitue l'élément principal de la paroi des organes creux contractiles comme l'intestin et l'utérus. Il est le principal composant de la paroi vasculaire et intervient dans la vasoconstriction jouant ainsi un rôle primordial dans la régulation du diamètre du vaisseau. Embryologiquement, les CMLs, comme tous les autres types de cellules musculaires (squelettiques et cardiaques), hormis les cellules myoépithéliales, sont issues du mésoderme.

Les CMLs sont des cellules mononucléées, généralement fusiformes avec des extrémités pointues et parfois bifides, d'un diamètre de 2 à 10 μm pour une longueur très variable selon le tissu (de 15 μm pour les plus petites à 500 μm pour les CML utérines).



Cellules musculaires lisses

Ces cellules sont associées entre elles par du tissu conjonctif constitué majoritairement de collagène et d'élastine. Elles sont connectées par des jonctions adhérentes et serrées ainsi que par des jonctions gap dont le nombre varie en fonction des tissus.

La contraction des CMLs diffère en plusieurs points de celles des autres types musculaires. La différence majeure est la capacité qu'ont certaines de ces CMLs, formant le muscle lisse dit tonique, à maintenir une contraction permanente qui permet l'induction d'un tonus musculaire au niveau du système vasculaire. En opposition, les autres CMLs dites phasiques ont un cycle de contraction-relaxation similaire aux autres types musculaires avec cependant un temps de contraction plus long par rapport aux muscles squelettique et cardiaque.

La contraction des CMLs est contrôlée par le système nerveux autonome (neurovégétatif) et par le système hormonal. Ces deux systèmes régulent précisément l'état de contraction et de relaxation de ces CMLs en intervenant sur le Ca^{2+} intracellulaire.

Une autre propriété de la CML est de générer une contraction nécessitant une faible dépense énergétique (300 à 500 fois moins d'énergie qu'une cellule musculaire squelettique). Les CMLs se distinguent également par leur innervation ainsi que par la transmission du signal. Contrairement au muscle squelettique où toutes les cellules musculaires sont innervées sans être connectées entre elles, les CMLs sont faiblement innervées et possèdent des «*gap junction*» qui permettent un fort couplage électrique et fonctionnel entre elles par le passage de molécules de bas poids moléculaire telles que le Ca^{2+} et l'adénosine monophosphate (AMPc). Le muscle lisse est composé de fibres beaucoup plus petites que celles du muscle squelettique : ses fibres musculaires mesurent habituellement de 2 à 5 μm de diamètre et de 20 à 500 μm de longueur, alors que les fibres musculaires squelettiques ont un diamètre 20 fois plus grand et une longueur de plusieurs centaines de fois supérieure.

II.2- Structure du cytosquelette

Le maintien de la structure de ces cellules est assuré par un cytosquelette formé principalement par trois types de filaments : les myofilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces filaments sont associés à d'autres protéines, qui confèrent à cette chape cellulaire une flexibilité et des points d'ancrage à la membrane cellulaire nécessaires aux fonctions des cellules musculaires lisses.

II.2.1- Les myofilaments

On distingue deux types de myofilaments : les filaments fins, essentiellement composés d'actine mais contenant également des protéines régulatrices qui lui sont associées, et les filaments épais composés de myosine. Ces filaments d'actine sont attachés à des structures appelées corps denses^{15,16} (car denses aux électrons) dont certains sont liés à la membrane cellulaire. D'autres corps denses sont dispersés à l'intérieur de la cellule et maintenus en place par un échafaudage d'éléments structurels protéiques les reliant les uns aux autres. C'est principalement à travers ces liaisons que les forces de contraction sont transmises d'une cellule à l'autre. L'un des composants majoritaires de ces corps denses est l' α -actinine, laissant supposer qu'ils puissent avoir un rôle comparable à celui des disques Z du muscle squelettique. Plusieurs corps denses peuvent être reliés par des filaments d'actine en plaques denses au niveau de la membrane plasmique. Ces plaques denses sont le point d'ancrage des filaments d'actine dans les membranes et ont un rôle dans la genèse de la force mécanique entre les CMLs¹⁷.

II.2.1.1- Les Filaments fins

Les filaments fins sont des polymères, d'un diamètre d'environ 7 nm, formés de monomères d'actine globulaire. Ces filaments sont regroupés de manière hexagonale pour former des câbles parallèles orientés tout au long du grand axe de la CML. L'actine est une protéine ubiquitaire présente dans toutes les cellules eucaryotes (animales et végétales). Elle représente 40% des protéines totales d'une cellule.

Les CMLs expriment 4 isoformes d'actine : l' α -actine du muscle lisse (sm- α -actine), la γ -actine du muscle lisse (γ -sm-actine), la β -actine non-musculaire (β -NM-actine) et la γ -actine non-musculaire (γ -NM-actine)¹⁸. La forme α est prédominante dans les CMLs vasculaires, elle y représente 70% de l'actine totale¹⁹. Cette protéine s'exprime durant les stades les plus précoces de la vasculogénèse^{20,21}. Au cours du développement, l'expression de l' α actine augmente alors que celle de la β actine diminue.

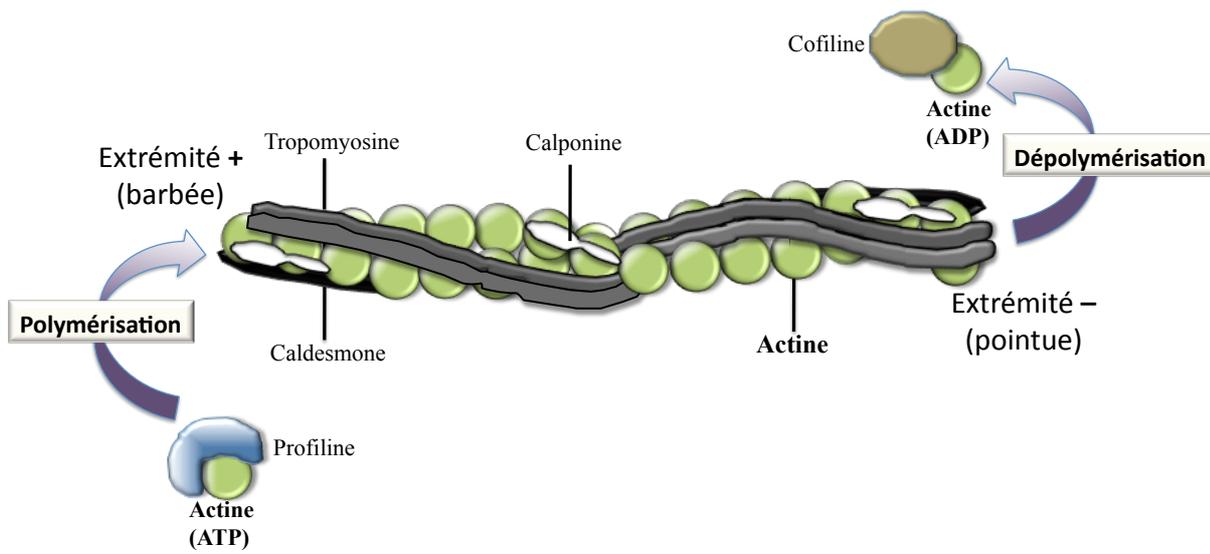


Figure 3 : Structure et formation des filaments fins.

À l'une des extrémités, notée (+) ou extrémité barbue, les constantes cinétiques sont 10 fois supérieures à celles de l'autre extrémité, notée (-) ou extrémité pointue. Cette différence est due à la structure tridimensionnelle des monomères d'actine⁴²⁸. L'actine associée à un filament a tendance à hydrolyser son ATP. Cette propriété est, avec la polarité du filament, à l'origine du phénomène dit de "tapis roulant" (anglais : treadmilling). En effet, l'extrémité (+) va avoir tendance à capter en très grande majorité de l'ATP-actine, favorisant par conséquent la polymérisation à cette extrémité. En revanche, l'extrémité (-) étant moins active car l'actine du filament qui en est proche a passé plus de temps sous forme filamentaire et est majoritairement sous forme d'ADP-actine. Par conséquent, à l'extrémité (-) l'équilibre est déplacé vers la dépolymérisation.

L'actine peut exister soit sous forme de molécules monomériques (actine G ou globulaire), soit sous forme de polymères filamenteux (actine F). Cependant elle n'est fonctionnelle que sous sa forme filamenteuse. Chacune des deux formes peut se transformer en l'autre de façon réversible selon les conditions de température, d'environnement ionique, ou sous l'influence de protéines telles que la profiline et la cofiline.

La polymérisation s'amorce par une phase de nucléation, où sont formés des trimères en présence d'ATP. Les monomères associés à l'ATP, présents en majorité dans les cellules vivantes, polymérisent alors que ceux associés à l'ADP restent sous forme globulaire. Les monomères s'assemblent suivant une double hélice (Figure 3).

Protéines associées aux filaments fins :

Les principales protéines régulatrices associées aux filaments d'actine sont la tropomyosine, la caldesmone et la protéine SM 22. D'autres protéines telles que la profiline et la cofiline régulent la polymérisation de l'actine.

- La **Tropomyosine** est, avec l' α -actine, le principal composant des filaments fins. Cette protéine de 76 kDa intervient au niveau de l'activité Mg-ATPasique de la myosine dont elle potentialise l'expression²². La tropomyosine protège et renforce la stabilité des filaments fins. Elle pourrait aussi jouer un rôle dans la modulation de la réponse au flux calcique transmembranaire²³.

- La régulation de la polymérisation des filaments d'actine dépend aussi de leur stabilité. La **Cofiline** ou ADF (actin depolymerizing factor) est une protéine qui déstabilise l'actine lorsqu'elle est sous sa forme filamenteuse. Elle se fixe sur la partie comportant l'actine contenant l'ADP et la soumet à une torsion supérieure à l'angle normal de 166°.

- La **Profiline** est une protéine régulant l'activité Mg-ATPasique de l'actine, contrôlant ainsi la dynamique de polymérisation. La profiline permet le remplacement d'un ADP par un ATP. Elle séquestre le monomère d'actine lorsque l'extrémité dite barbée du filament est bloquée. Au contraire, le complexe profiline-actine G-MgATP peut s'associer à l'extrémité barbée libre, ce qui provoque un abaissement de la concentration critique partielle de polymérisation de l'actine-MgATP, et favorise la polymérisation au niveau de l'extrémité +.

-La polymérisation de l'actine peut être induite par une protéine comme la **Caldesmone** en absence de tout autre agent polymérisant. Cette protéine de 90 kDa dissocie le complexe de la profilactine (profiline et actine G) favorisant ainsi la polymérisation. De plus, en interagissant à la fois avec l'actine et la myosine, la caldesmone réduit la formation du complexe actine-myosine en inhibant l'activité actomyosine Mg-ATPasique²⁴. Ce rôle de la caldesmone est régulé par son interaction avec le couple Ca^{2+} /Calmoduline qui entraîne une levée de cette inhibition permettant

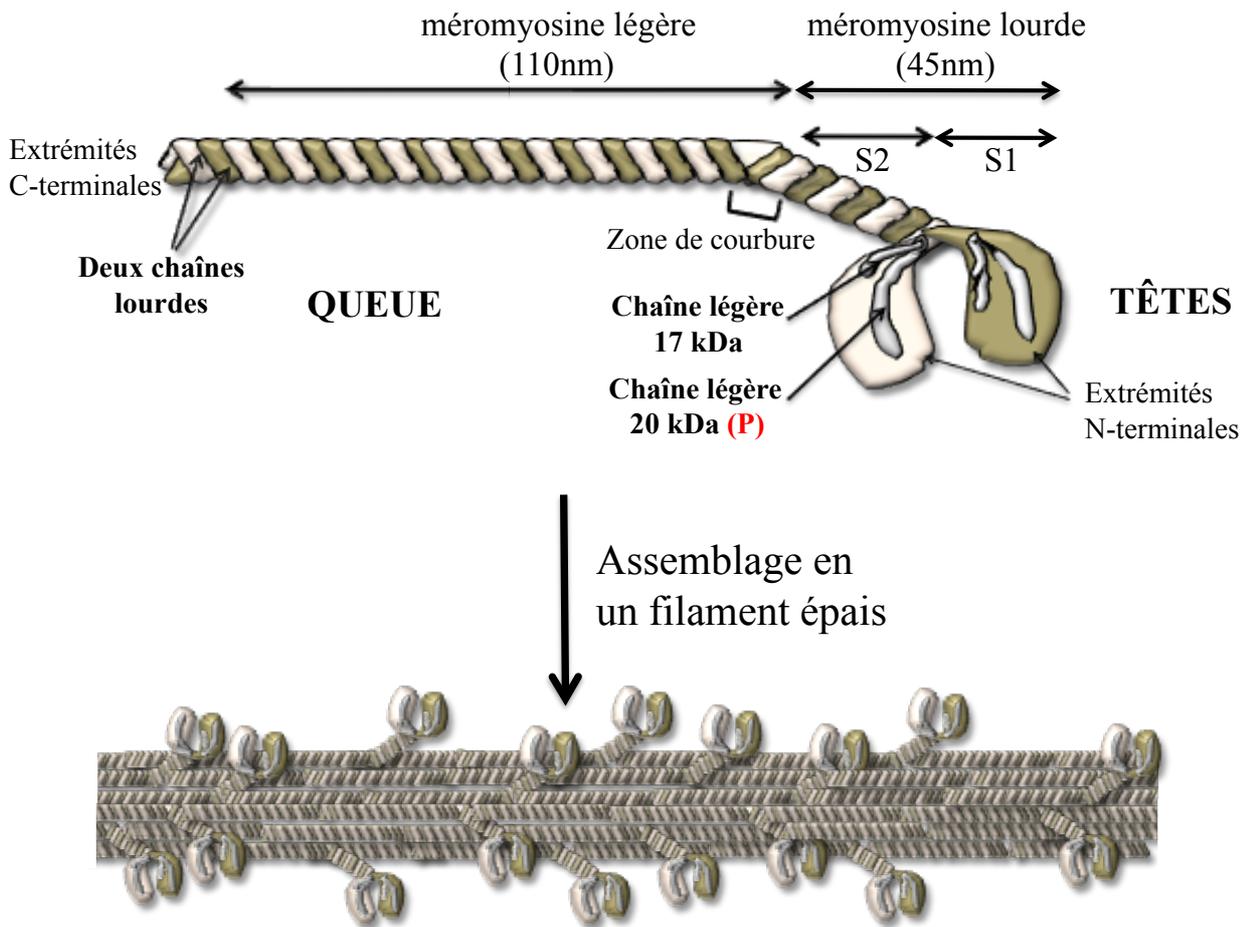


Figure 4 : Structure de la myosine et formation d'un filament épais.

ainsi la contraction. Par ce biais, la caldesmone joue un rôle physiologique important en régulant le tonus musculaire lisse.

- L'activité Mg-ATPasique de la myosine activée par l'actine peut également être inhibée par la **Calponine**. Cette protéine de 34 kDa²⁵ interagit aussi avec l'actine, la myosine, la tropomyosine et les protéines liant le Ca²⁺. Ainsi, la calponine pourrait entrer en compétition avec la caldesmone au niveau du même filament fin ou bien agir sur un filament différent. Mais la caldesmone semble avoir une plus forte affinité pour le site de contraction de l'actine, alors que la calponine se fixerait majoritairement sur le domaine impliqué dans la formation du cytosquelette^{26,27}.

- Enfin, la protéine SM22 est une protéine spécifique du muscle lisse retrouvée dans l'aorte, l'utérus, l'intestin et les voies aériennes. Sa fonction reste encore méconnue mais elle semble jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette²⁸ et le maintien de l'état de différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires, favorisant la formation de filaments d'actine²⁹. Cette protéine a aussi un rôle dans la contractilité vasculaire indépendante du Ca²⁺³⁰.

II.2.1.2- Les filaments épais

Dans les CMLs, comme dans le muscle strié squelettique, les filaments épais sont des assemblages polymériques de molécules de myosine de type II d'environ 12 à 15 nm de diamètre et d'une longueur moyenne de 2 µm. Les myosines ont la capacité de se lier à l'actine, d'hydrolyser l'ATP et ainsi de générer un mouvement^{31,32}. Quinze familles de myosine ont été identifiées. La myosine de classe II est celle présente au niveau des CMLs.

La myosine est une protéine hexamérique formée d'une paire de chaînes lourdes (poids moléculaire : 200-250 kDa) associées en hélices α , et de cinq isoformes de chaînes légères (MLC : Myosin Light Chain) : deux isoformes de chaîne essentielle distale de 17 kDa (MLC₁₇), deux isoformes de la chaîne régulatrice proximale de 20kDa (MLC₂₀) et un isoforme d'une chaîne de 23kDa (MLC₂₃). Ces chaînes légères, localisées au niveau des têtes de myosine, sont liées de façon covalente aux chaînes lourdes.

L'extrémité C-terminale de la myosine possède une structure coiled-coil qui s'homodimérise pour former la queue de la myosine^{33,34}. Cette partie de la myosine peut se diviser en deux fragments : la méromyosine lourde et la méromyosine légère. La méromyosine lourde contient les deux têtes de la myosine (S1) et une portion de la formation coiled-coil (S2). C'est sur le sous-fragment S1 qu'est localisé le site de fixation à l'actine ainsi que le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie nécessaire à la fonction du moteur moléculaire (Figure 4).

Type	Protéines	Taille (kDa)	Association	Expression prédominante dans :
I	Kératine acide (~15 protéines)	40-65	avec type II	Cellules épithéliales
II	Kératine neutre ou basique (~15 protéines)	51-86	avec type I	Cellules épithéliales
III	Desmine	53	homopolymère	Cellules musculaires
	Protéine acide des fibrille	50	homopolymère	Cellules gliales
	Périphérine	57	homopolymère	Neurones périphériques
	Synémine	190	avec membre de type III	Cellules musculaires
IV	Vimentine	54	homo ou hétéro	Fibroblastes
	Protéines de neurofilaments			
	NF-Light	60-70	avec L, M ou H de cette classe	neurones
	NF-Mean	105-110		neurones
NF-Hight	135-150	neurones		
V	Internexine α	66	homopolymère	Neurones embryonnaires
	Lamines nucléaires	62-72	homopolymère	Lamina nucléaire de tous types cellulaires
VI	Nestine	200	homopolymère	Cellules souches du système nerveux central

Tableau 2 : Protéines des filaments intermédiaires.

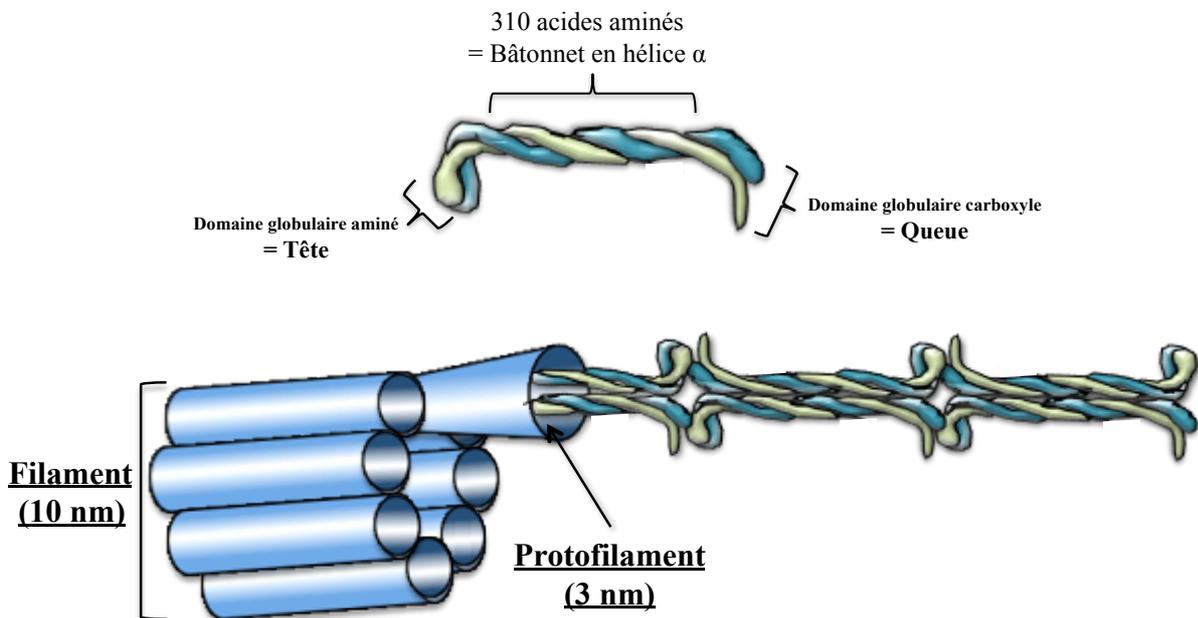


Figure 5 : Structure des filaments intermédiaires.

Chaque chaîne polypeptidique contient une région centrale homologue, d'environ 310 résidus d'acides aminés, qui forme une longue hélice en bâtonnet avec trois courtes interruptions dont la structure n'est pas α -hélicoïdale. Les deux chaînes polypeptidiques, dans un homodimère de filaments intermédiaires, s'alignent parallèlement pour former un domaine central en forme de bâtonnet avec des domaines globulaires aminé (tête) et carboxyle (queue) à chaque extrémité. En s'assemblant en un filament intermédiaire, les domaines en forme de bâtonnets interagissent les uns avec les autres pour constituer la partie centrale uniforme du filament, alors que les domaines globulaires, dont la taille varie dans les différentes protéines des filaments intermédiaires, dépassent à la surface du filament. Ces domaines déterminent la spécificité de fonction de chaque protéine de filament intermédiaire.

L'activité de la myosine est régulée par phosphorylation des chaînes légères, et plus particulièrement la MLC₂₀. La MLC₂₀ est phosphorylée au niveau de la sérine 19³⁵ par la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK). Le taux de phosphorylation atteint son maximum 4 secondes après diverses stimulations permettant un changement de conformation de la myosine. Cela déclenche l'activité ATPasique de la myosine et la contraction de la CML. Un rapport existe entre le taux de MLC₂₀ phosphorylée et la force de la contraction, cependant ce rapport change en fonction de l'agoniste utilisé³⁶. Pour finir, la déphosphorylation de la MLC₂₀ entraîne une relaxation des CMLs³⁷.

II.2.2- Les filaments intermédiaires

Principalement composés de vimentine et de desmine, ils sont moins nombreux que les myofilaments et jouent un rôle structural dans le maintien de l'organisation architecturale du système des filaments épais et fins. Contrairement à l'actine, qui est une protéine globulaire, les sous-unités des filaments intermédiaires sont des protéines fibreuses présentant une résistance élastique élevée. On trouve ces filaments intercalés entre les filaments épais et fins dans le cytoplasme de la majorité des cellules eucaryotes supérieures. Ces fibres de 8 à 10 nm de diamètre sont réparties dans la cellule selon une distribution similaire à celle des microtubules, c'est-à-dire concentrées autour du noyau et irradiant vers la périphérie de la cellule en rangées légèrement incurvées. A l'inverse des filaments d'actine et des microtubules, les filaments intermédiaires ne présentent pas de polarité et n'interviennent donc pas dans le transport directionnel. Ils interviennent principalement dans le maintien de la structure cellulaire et dans la résistance aux stress mécaniques.

Les filaments intermédiaires, contrairement aux autres types de filaments, sont composés de polypeptides de taille variable en fonction des types cellulaires considérés. Selon la base de leur séquence d'acides aminés, les filaments intermédiaires sont classés en six grandes catégories (type I, II, III, IV, V, VI) répertoriées dans le tableau ci-contre (Tableau 2)

En dépit de leur grande diversité de taille et de séquence, les protéines de filaments intermédiaires sont codées par la même famille multigénique, ce qui leur confère une structure commune (Figure 5).

Contrairement à l'actine, la majorité des filaments intermédiaires se trouvent sous la forme polymérisée. Les composants des filaments intermédiaires se trouvent rarement dans leur état libre (monomère) et ont toujours tendance à se lier à un filament en polymérisation. Dans les conditions ioniques du cytoplasme, les filaments intermédiaires isolés sont parfaitement stables, en revanche, tout changement ionique provoque leur dépolymérisation. Cependant, l'assemblage ou la

dissociation du filament peut s'effectuer mais cela nécessite toujours un processus lent (plusieurs minutes alors qu'il ne faut que quelques secondes dans le cas de l'actine et de la tubuline).

II.2.3- Les microtubules

Les microtubules sont présents dans l'ensemble des cellules eucaryotes. Ils peuvent être fortement représentés dans certains types cellulaires, comme les neurones, où ils ont un rôle fondamental dans le transport axonal des vésicules, ou dans des cellules à forte activité sécrétoire.

Un microtubule est un tube d'environ 25nm de diamètre et d'une longueur variable dont la paroi est constituée généralement de 13 protofilaments de tubuline. Chaque protofilament est lui-même constitué de dimères de tubuline α et β . Cet assemblage polymérique est extrêmement labile. Les microtubules sont des structures polaires comme l'actine des microfilaments avec une extrémité (+) à croissance rapide, dirigée vers la périphérie de la cellule, et une extrémité (-) qui est associée au centrosome.

Les microtubules sont des structures dynamiques qui sont en permanence et à vitesse variable (quelques secondes ou quelques minutes) en cours de polymérisation et de dépolymérisation. La durée de vie d'un microtubule est d'environ dix minutes. Il existe des protéines associées aux microtubules qui ont soit un rôle dans la stabilisation des microtubules, soit sont spécialisées dans le mouvement des vésicules et des organites le long des microtubules, telles que les kinésines et les dynéines.

Il a été montré que l'état de polymérisation des microtubules influençait la contraction des CMLs. Effectivement, le désassemblage de ces éléments du cytosquelette entraîne une augmentation de la phosphorylation de la MLC_{20} stimulant ainsi la contraction³⁸.

II.2.4- L'association dystrophine/complexe glycoprotéique

II.2.4.1- La dystrophine

La dystrophine est une protéine de 427kDa appartenant à la famille des protéines du cytosquelette β -spectrine/ α -actinine³⁹. Elle est exprimée constitutivement dans les cellules musculaires striées, cardiaques et lisses, ainsi qu'au niveau de la rétine et des cellules de Purkinje chez un individu sain. L'absence ou une forme tronquée de cette protéine peut être à l'origine de pathologies telles que la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker. La dystrophine a la capacité de se lier à la membrane plasmique via un complexe glycoprotéique (DAPC: Dystrophin Associated Protein Complex) présent à la membrane. Il a été observé que dans le cas de la dystrophie de Duchenne et Becker, ce domaine de liaison peut être altéré voir absent.

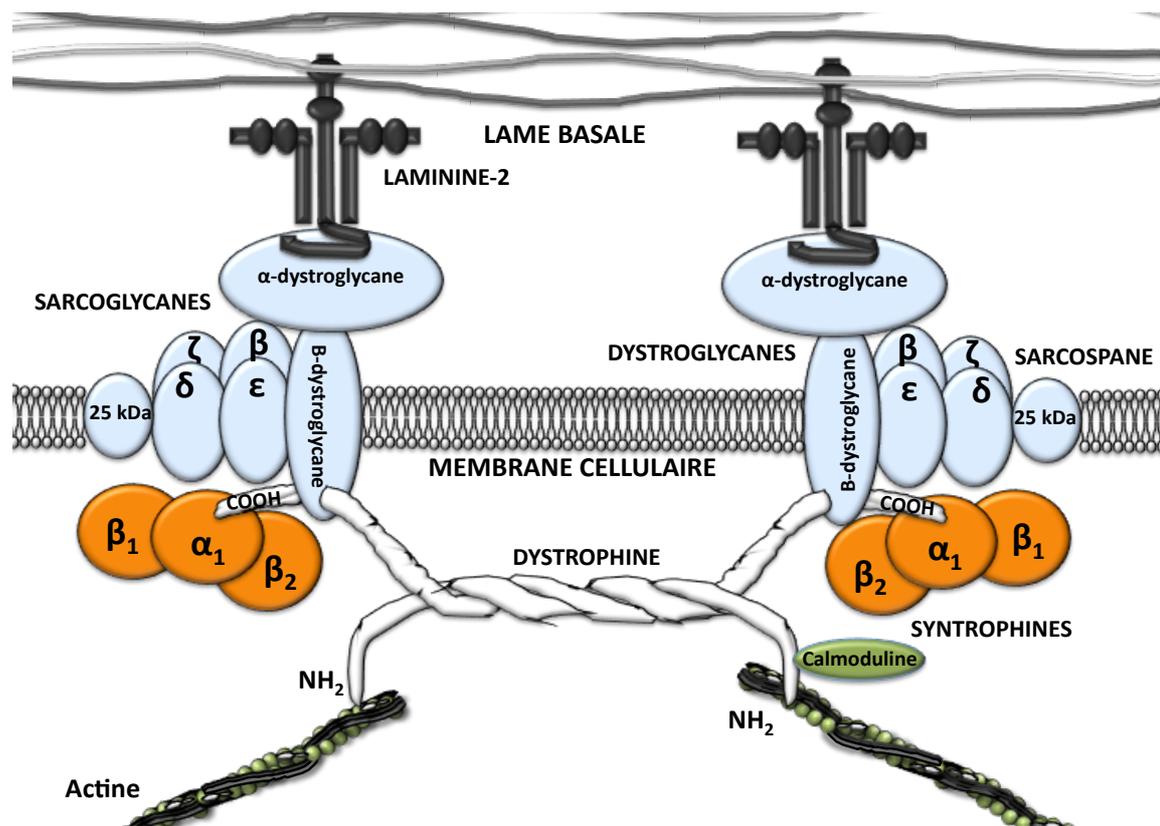


Figure 6 : Association de la Dystrophine avec le complexe glycoprotéique membranaire.

La dystrophine est constituée de quatre domaines distincts dont un domaine N-terminal, lui permettant de se lier à l'actine⁴⁰ et à la calmoduline⁴¹ (Figure 6). Cette interaction est primordiale dans le maintien de la structure cellulaire. Elle possède aussi un domaine central constitué de 24 répétitions de motifs de 109 résidus organisés en triple hélice alpha, ce qui lui confère de la flexibilité⁴², et il possède aussi des sites de liaison à l'actine^{43,44}. De plus, la dystrophine possède un domaine riche en cystéines lui permettant de se lier à la partie C-terminale du β -dystroglycane^{45,46} et d'interagir avec la calmoduline de manière dépendante du Ca^{2+} ^{47,48}. Pour finir, son extrémité C-terminale (caractéristique de la superfamille des dystrophines) peut interagir avec différentes protéines constituant le complexe glycoprotéique.

II.2.4.2- Le complexe glycoprotéique

Les protéines associées à la dystrophine constituent un complexe protéique d'échafaudage qui traverse la membrane et fait le lien entre le cytosquelette d'actine et la lame basale du muscle. Ce complexe protéique est constitué de trois éléments distincts⁴⁹: le complexe dystroglycane, le complexe sarcoglycane-sarcospane, et le complexe cytoplasmique composé entre autres des syntrophines.

- **Le complexe dystroglycane** est formé par le dystroglycane α (156 kDa) extracellulaire et le β (43 kDa) qui est transmembranaire⁵⁰. L'interaction de ce complexe avec les éléments cytoplasmiques, dont la région riche en cystéines de la dystrophine, se fait via l'extrémité C-terminale intracellulaire du β -dystroglycane. Au niveau extracellulaire, l' α -dystroglycane interagit avec la composante majeure de la lame basale, la laminine. Le C-terminal du β -dystroglycane fixe aussi une protéine adaptatrice Grb2⁵¹. Cette interaction suggère l'hypothèse d'une participation du β -dystroglycane à la transduction d'un signal extra-cellulaire vers le cytosquelette du muscle (outside-in).

- Le **complexe sarcoglycane/sarcospane** du muscle lisse est majoritairement composé de cinq protéines transmembranaires: les sarcoglycanes, β (43 kDa), δ (35 kDa), ϵ (45 kDa) et ζ (40 kDa), et le sarcospane (25 kDa)⁵⁰. Un autre sarcoglycane, le α (50 kDa) surtout présent dans les muscles cardiaque et squelettique^{52,53}, peut aussi être trouvé dans certains muscles lisses⁵⁴. Au niveau du muscle lisse, c'est le sarcoglycane ϵ qui remplacerait le α ⁵⁵. Au vue des interactions entre sarcoglycanes, β -dystroglycane et certains éléments de la matrice extracellulaire, le complexe sarcoglycane a été proposé comme un élément stabilisateur du complexe protéique⁵⁶. Ce complexe interagit également avec les intégrines et la dystrophine au niveau des γ et ζ -sarcoglycanes⁵⁷. Des études ont identifié une interaction entre la filamine C et ce complexe glycoprotéique⁵⁸ ce qui placerait les sarcoglycanes, en plus de leur rôle de support structural, comme des éléments du signal

permettant le maintien de l'intégrité du muscle. La déficience en δ -sarcoglycane, au même titre que pour la dystrophine, entraîne un dysfonctionnement de la contraction musculaire.

L'autre élément de ce complexe, le **sarcospane**, est constitué de quatre domaines transmembranaires et possède des extrémités N et C-terminales intracellulaires⁵⁹. Le rôle de cet élément reste mal connu.

- Pour finir, le **complexe des syntrophines** est composé de trois isoformes de 59 kDa : $\alpha 1$ (acide), et $\beta 1$ et $\beta 2$ (basiques)^{60,61}. Il interviendrait en tant qu'adaptateur en liant des protéines associées à la membrane avec le complexe glycoprotéique lié à la dystrophine. Il a été montré que la dystrophine possédait, en C-terminal, des sites de liaison aux syntrophines⁶².

II.2.4.3- Rôle de l'association dystrophine/complexe glycoprotéique

L'association de la dystrophine avec le complexe glycoprotéique participe au maintien de l'architecture des fibres musculaires en servant de lien entre la matrice extracellulaire et les filaments d'actine du cytosquelette. Cette organisation permet de protéger les cellules musculaires d'éventuels dommages pouvant avoir lieu lors des contractions musculaires. Une étude a mis en évidence que la dystrophine stabilise et régule l'insertion du complexe protéique dans la membrane. Leur association permet une stabilisation des interactions entre le cytosquelette et la membrane⁶³. Le complexe formé par la dystrophine et le complexe glycoprotéique possède des fonctions de signalisation et des fonctions mécaniques.

II.2.5- La filamine

II.2.5.1- Généralités

La filamine est une protéine décrite il y a plus de 30 ans comme la première protéine non-musculaire se liant à l'actine^{64,65}. C'est une protéine du cytosquelette, aux fonctions complexes puisqu'à ce jour plus de 30 protéines ont été décrites comme interagissant avec elle. Elle a un rôle important dans le développement du cerveau, du cœur et des vaisseaux sanguins. Comme d'autres protéines, telles que la caldesmone et la desmine, la filamine est abondante au niveau du muscle lisse alors qu'elle est absente dans le muscle squelettique. Il en existe trois isoformes : l' α -filamine (FLNA, filamine 1 ou A), la β -filamine (FLNB, filamine 3 ou B) et la γ -filamine (FLNC, filamine 2 ou C)^{66,67}. La filamine A et la filamine B sont ubiquitaires tandis que la filamine C est spécifique des cellules musculaires. Les filamines sont localisées au niveau des fibres de stress et des régions sous-membranaires.

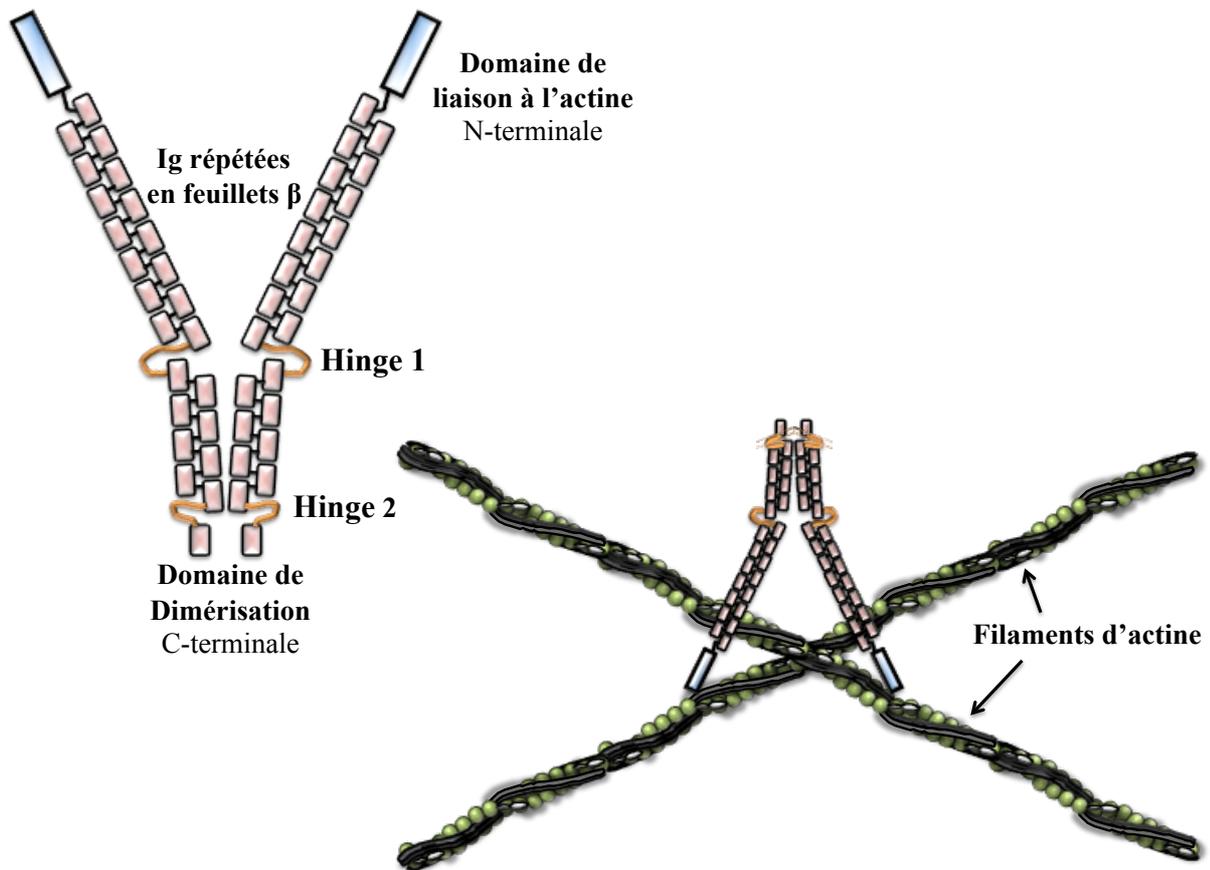


Figure 7 : Structure et rôle de la filamine.

II.2.5.2- Structure

La filamine est un homodimère cytoplasmique de 560 kDa qui fait partie de la superfamille des protéines liant l'actine (actin binding proteins ou ABP). Elle est formée de deux grands protomères liés par un site de dimérisation situé à l'extrémité C-terminale qui forment une molécule flexible en forme de V. Cette structure permet de réticuler les filaments d'actine entrecroisés en filet tridimensionnel lâche (Figure 7). Le domaine de liaison à l'actine se situe au niveau de l'extrémité N-terminale de chaque protomère. La filamine est constituée de 24 domaines de type immunoglobuline (Ig) structurés en feuillets β . Le 24^{ème} Ig est le domaine impliqué dans la dimérisation. Dans le cas des isoformes A et B, deux régions charnières (~30 acides aminés) s'intercalent entre ces Ig : la région hinge 1 présente entre l'Ig15 et l'Ig16 et la région hinge 2 intercalée entre l'Ig23 et l'Ig24. Ces régions charnières confèrent aux filamines une grande flexibilité leur permettant de subir les contraintes du cytosquelette sans cassure⁶⁸. Dans le cas de la filamine C, il n'y a pas de région hinge 1, par contre une séquence de 78 acides aminés est insérée au niveau de l'Ig 20.

II.2.5.3- Rôles et régulation des filamines

Les filamines sont des protéines de pontage des filaments d'actine (Figure 7). Elles participent alors à la formation et à l'organisation des réseaux d'actine filamenteuse permettant une structure tridimensionnelle dynamique de la cellule. Elles permettent aussi l'ancrage du cytosquelette à la membrane en formant des liaisons avec les intégrines, grâce aux complexes d'adhésion riches en protéines telles que la vinculine, la paxiline et la taline^{58,69}.

Plusieurs travaux décrivent les calpaïnes comme des régulateurs des fonctions des filamines ubiquitaires par clivage de la région hinge 1⁷⁰, favorisant une déstructuration rapide du cytosquelette. C'est un rôle qui s'avère très important au cours de phénomènes tels que la fusion des membranes cytoplasmiques des myoblastes au cours de la différenciation musculaire, ou bien lors de l'activation plaquettaire^{71,72}.

La filamine interagit avec la desmine formant ainsi le système F-A-D (Filamine Actine Desmine) qui peut fixer, transitoirement, l'ensemble du système sur toute sa longueur via les interactions entre la filamine et les filaments croisés d'actine provenant des corps denses⁷³. Au niveau de ces plaques denses enrichies en intégrines, les filamines, et plus particulièrement les isoformes A et B, interagissent avec la caveoline-1. La cavéoline-1 se fixe avec une grande affinité sur le domaine de dimérisation de ces protéines⁷⁴. Cette interaction pourrait intervenir dans la régulation de l'internalisation et du trafic des cavéoles⁷⁵.

La filamine C interagit avec le sarcoglycane sous membranaire de la fibre musculaire, et

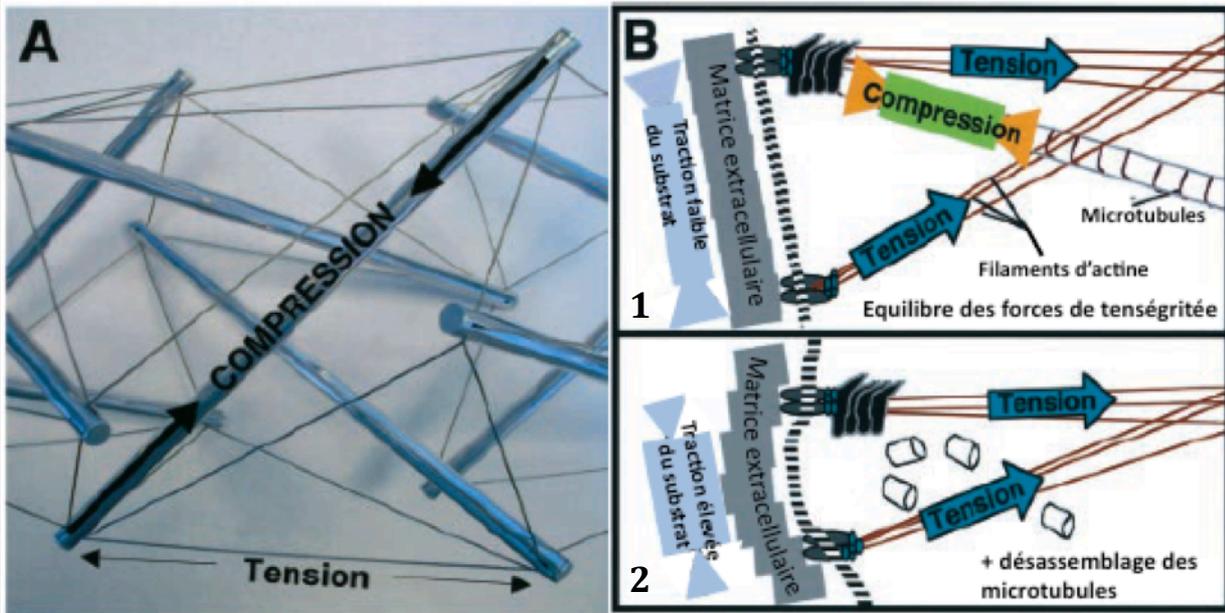


Figure 8 : Représentation schématique du concept de tenségrité cellulaire.

(d'après Ingber. Circ Res. ; 2002⁷⁹)

A- Modélisation de la tenségrité. Chaque élément du cytosquelette exerce des forces (tension ou compression) régulant la structure de l'ensemble.

B1- Schéma simplifié des forces exercées dans une cellule par les filaments d'actine et les microtubules (les filaments intermédiaires ne sont pas représentés). La tension des filaments d'actine ancrés à la membrane, engendre une force de compression à laquelle s'opposent les microtubules, permettant le maintien d'une certaine tension de la membrane plasmique.

B2- La destruction des microtubules provoque un transfert des la forces de compression au niveau des sites d'adhésions entrainant une modification de l'équilibre tensionnel qui provoque le relâchement et la déformation de la membrane plasmique.

plus précisément avec le γ - et le δ -sarcoglycane. L'analyse par microscopie confocale de biopsies de patients ayant des dystrophies musculaires liées aux sarcoglycanes, a révélé une forte localisation de γ -filamine à la membrane par comparaison à des sujets sains. Les auteurs de ces travaux suggèrent que dans les dystrophies, la filamine compenserait la perte de liaison aux sarcoglycanes par une fixation aux intégrines, ce qui expliquerait le maintien de sa localisation membranaire⁵⁸. Effectivement, les deux autres types de filamine sont connus pour lier certaines des intégrines dans leur domaine cytoplasmique. Ceci implique que les filamines interviennent, via les intégrines, dans la transmission du signal, dans l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire⁷⁶⁻⁷⁸.

II.2.6- Rôle du cytosquelette dans le maintien de la structure cellulaire.

Grâce à ses différents constituants, le cytosquelette contribue à de nombreuses fonctions au sein de la cellule, telles que le transport de protéines ou d'ARNm, la contraction, ainsi que l'ancrage aux membranes des cellules voisines. Tous ces éléments du cytosquelette sont également nécessaires au maintien d'une structure précise des cellules musculaires lisses et endothéliales, leur permettant d'effectuer leur fonction. D'après Ingber⁷⁹, chaque élément du cytosquelette exerce des forces sur la structure cellulaire (Figure 8A). L'ensemble des forces exercées par ces différents éléments s'équilibre afin de maintenir la cellule dans un état d'équilibre tensionnel. Une modification de la tension de surface par une modification d'un élément du cytosquelette (Figure 8B) peut avoir des répercussions sur les protéines ancrées à la membrane.

⇒ Outre l'importance de leur structure, la fonction contractile des CMLs nécessite la transmission d'un signal, initié par les différents stimuli extracellulaires, de la membrane jusqu'à l'appareil contractile. Cette transmission requiert le recrutement et l'activation de protéines de signalisation membranaires et cytoplasmiques spécifiques de chaque type de stimulus.

III- Les protéines de signalisation de la contraction

III.1- Généralités sur l'appareil contractile

La contraction des CMLs fait intervenir un appareil contractile formé par la myosine et l'actine (Figure 9). Un filament épais de myosine peut être en contact avec six filaments fins d'actine. Les mouvements des têtes de myosine d'un même filament ne se font pas tous en même temps. Ainsi, pendant toute la durée de la contraction, les filaments d'actine restent en contact avec

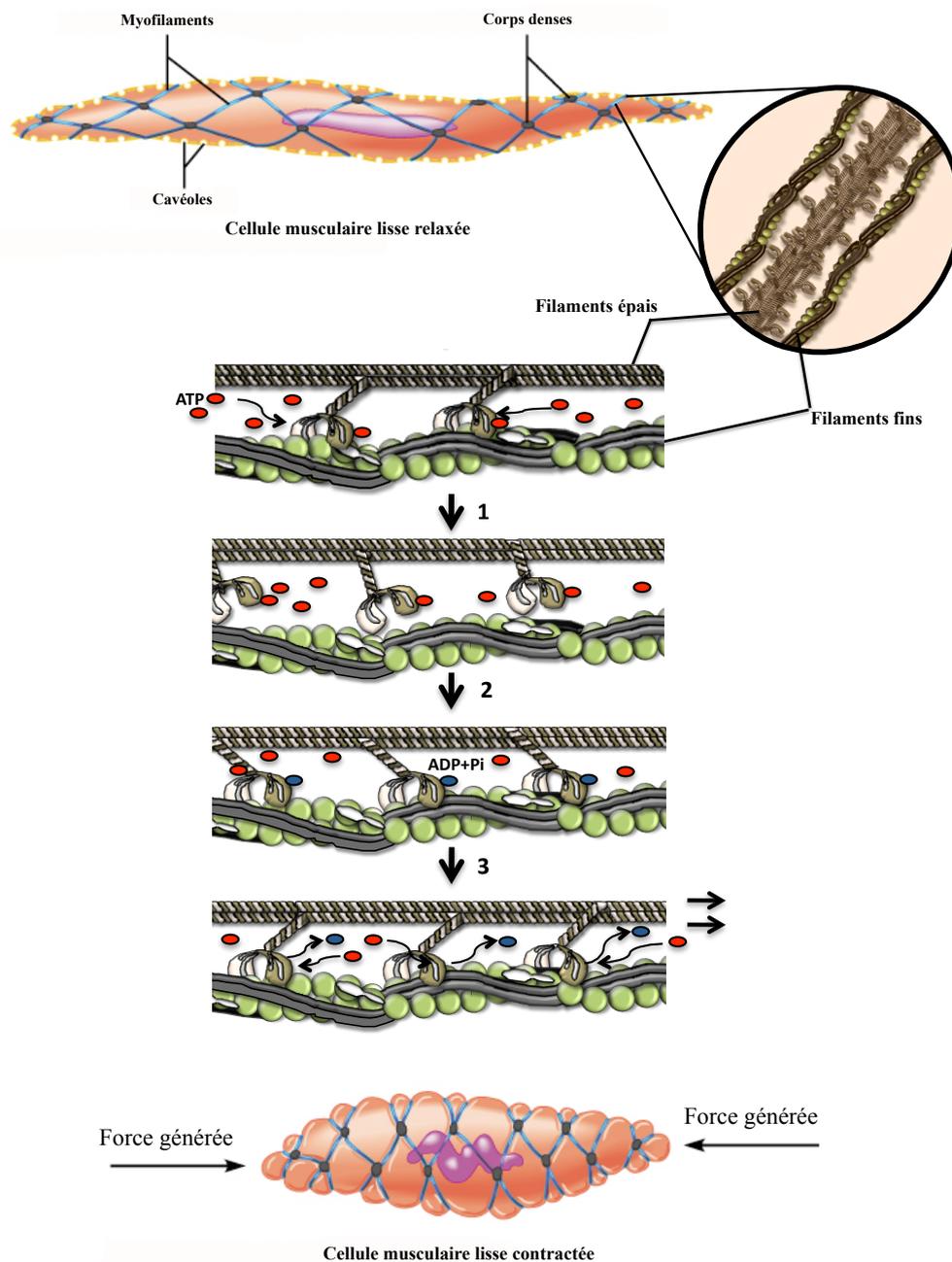


Figure 9 : Représentation simplifiée du mécanisme de contraction des cellules musculaires lisses.

Le cycle de contraction commence au moment où la tête de myosine est en position de basse énergie, repliée sur elle-même et liée à une molécule d'actine. L'énergie chimique nécessaire à l'interaction d'une molécule d'actine avec une molécule de myosine provient de l'hydrolyse de l'ATP. Une molécule d'ATP vient se fixer sur une tête de myosine qui se détache alors de la molécule d'actine. L'énergie de l'ATP est transférée sur la tête de myosine qui se déplie en position de haute énergie (1).

L'ATP ayant libéré son énergie se retrouve sous forme d'ADP+P qui reste lié à la tête de myosine. Les têtes de myosine ainsi activées sont fortement attirées par des sites de liaison situés sur les molécules d'actine. Elles s'accrochent donc au site le plus proche permettant la formation d'une interaction actine-myosine. Pendant cette phase d'accrochage, la tête de myosine se replie sur elle-même entraînant une traction de la molécule d'actine, provoquant un raccourcissement^{80, 81}. Ce déplacement consomme l'énergie emmagasinée dans la tête qui repasse à un niveau de basse énergie (2).

Pendant ce déplacement les molécules d'ADP et le phosphate sont libérés et laissent la place libre pour de nouvelles molécules d'ATP (3). Tant qu'il y a de l'ATP dans le milieu, les têtes de myosine peuvent pivoter et faire avancer le filament de myosine entre les molécules d'actine. Ce cycle peut se reproduire plusieurs fois par seconde.

le filament de myosine ce qui leur empêche tout glissement en arrière. Les interactions actine-myosine répétées entraînent un glissement relatif des filaments d'actine par rapport à la myosine, ce qui rapproche les corps denses et génère une force aux extrémités de la cellule musculaire^{80,81}.

Malgré une petite quantité relative de filaments de myosine dans le muscle lisse, et en dépit de la lenteur du cycle de formation des ponts transversaux entre la myosine et les filaments d'actine, la force maximale engendrée par la contraction du muscle lisse est souvent plus grande que celle du muscle squelettique : 4 à 6 kg par cm² de surface de section transversale pour le muscle lisse, contre 3 à 4 kg par cm² de surface de section transversale pour le muscle squelettique.

Ce mécanisme est au centre de la contraction des CMLs. Il est activé en réponse à différents stimuli. La modulation de l'état des différents éléments de ce système (phosphorylation, polymérisation) varie en fonction des multiples voies de signalisation initiées par chaque stimulus. Cette diversité commence au niveau de la membrane.

III.2- Les Protéines membranaires

Pour le bon fonctionnement de l'organisme, il est important qu'il y ait une communication entre la cellule, ses cellules voisines et son environnement. Pour cela les cellules eucaryotes ont développé une très grande variété de molécules « sensibles » à l'environnement extracellulaire. Elles peuvent ainsi transmettre des informations verticalement du milieu extracellulaire vers le noyau, d'où est alors transcrite une réponse génomique adéquate. Cette sensibilité des cellules à leur environnement dépend en grande partie de molécules dites de « signalisation ou d'adhésion » comme les cavéolines, les intégrines, les molécules d'adhésion focales, les protéines kinases, ou les protéines G. Il peut aussi exister une transmission dite « horizontale » de l'information de cellule à cellule via des structures telles que les *gap junction*.

III.2.1- Les cavéoles

III.2.1.1- Généralités sur les cavéoles

Comme nous avons pu le voir précédemment, la membrane plasmique des CMLs est caractérisée par la présence de plaques denses au niveau desquelles s'insère l'appareil contractile. A la surface des ces cellules se trouvent aussi des sites d'invaginations vésiculaires. Il existe deux types majeurs de structures vésiculaires : les « coated pits » ou puits recouverts de clathrine, et les « lipid rafts ». Les cavéoles font partie des « lipid rafts » et sont caractérisées par la présence de protéines d'assemblage, les cavéolines⁸².

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètre, abondantes dans les cellules endothéliales, musculaires striées et lisses. Elles existent sous la forme

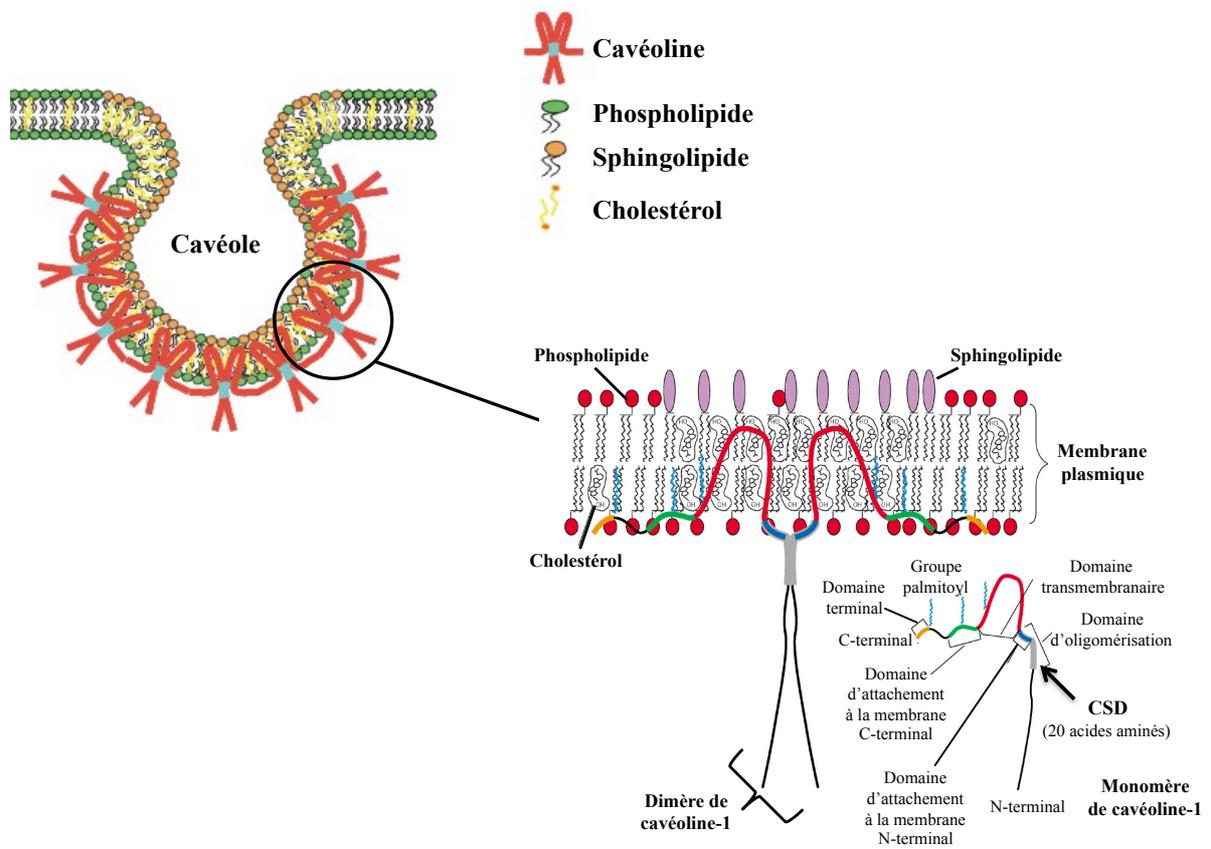


Figure 10: Structure des cavéoles et de la cavéoline-1.

de vésicules détachées ou aplaties dans le plan de la membrane plasmique, et peuvent également fusionner entre elles pour former des structures en grappes ou en tubules⁸³.

Les cavéoles sont composées de lipides spécifiques (glycosphingolipides, sphingomyéline, et cholestérol), de glycolipides et de protéines⁸³. Elles contiennent également des lipides de signalisation tels que la phosphatidylsérine, les céramides et le diacylglycérol. Ces invaginations sont décrites comme des réservoirs enrichis en protéines de signalisation via des interactions directes avec des molécules telles que les protéines G, les tyrosines kinases de la famille des Src, et la protéine kinase C (PKC)^{82,84}. Les cavéoles jouent un rôle important dans la compartimentation, la modulation et l'intégration des signaux moléculaires à la surface cellulaire ainsi qu'à l'endocytose, la transcytose, la potocytose et l'homéostasie du cholestérol cellulaire.

III.2.1.2- Les cavéolines

a) Généralités

La cavéoline est la protéine membranaire d'assemblage spécifique des cavéoles. Il existe trois isoformes de cavéoline de 18 à 25 kDa, codées par trois gènes distincts^{85,86}:

- cavéoline-1 (Cav-1) → cellules endothéliales, fibroblastes, adipocytes, CMLs
- cavéoline-2 (Cav-2) → ubiquitaire.
- cavéoline-3 (Cav-3) → cellules musculaires (squelettiques, lisses ou striées)^{87,88}.

Liées avec du cholestérol, les cavéolines s'associent ensemble et forment des complexes oligomériques qui déterminent et stabilisent la structure de la cavéole. Cav-1 peut former des complexes homo-oligomériques (Figure 10) mais aussi hétéro-oligomériques en interagissant avec Cav-2⁸⁹. Cav-3 peut elle aussi interagir avec Cav-2 dans les cardiomyocytes de rats⁹⁰.

Cav-1 tient une place importante dans la formation des cavéoles au niveau du muscle lisse. Des études ont montré que des souris déficientes en Cav-1 présentent une disparition des cavéoles au niveau des CMLs, alors que les cavéoles sont présentes au niveau du muscle strié, ce qui montre alors la nécessité de Cav-1 spécifiquement dans le muscle lisse. De plus, Cav-3 ne parvient pas à compenser la fonction physiologique de Cav-1 au niveau des CMLs⁹¹. Contrairement à la déficience en Cav-1, l'absence de Cav-2 ou de Cav-3 n'affecte pas le nombre de cavéoles présentes dans le muscle lisse⁹². Cav-1 apparaît donc comme la cavéoline intervenant dans la structure des cavéoles du muscle lisse, alors que Cav-2 et -3 interviendraient plutôt dans la modulation de l'expression de Cav-1, de la signalisation cellulaire et du métabolisme.

Phenotypic analysis of caveolin-deficient mice

Cav-1 Knock-out	Cav-2 Knock-out	Cav-3 Knock-out
Loss of caveolae In fibroblasts, endothelin, and adipocytes	Caveolae intact	Loss of caveolae In skeletal muscle fibers
Near total deficiency of Cav-2 Rescued by Cav-1 expression	Partial reduction in Cav-1 in certain tissues	Myopathic changes (mild-to-moderate) Variability in muscle fiber size Presence of necrotic fibers
MEFs Defects in caveolar endocytosis Hyperproliferative phenotype Decreases in G ₀ /G ₁ -phase Increases in S-phase		Dystrophin-glycoprotein complex Mislocalized No longer targeted to lipid rafts
Lung abnormalities Hypercellularity Thickened alveolar septa Exercise intolerance Defects in caveolar endocytosis	Lung abnormalities (identical to Cav-1 KO) Thickened alveolar septa Exercise intolerance	T-tubule abnormalities Mislocalization of T-tubule markers Ryanodine receptor DHPR-1a T-tubules (ferrocyanate staining) Dilated/swollen Longitudinally oriented Run in irregular directions
Decreased Vascular Tone Secondary to eNOS activation		
Adipocyte/lipid abnormalities Resistant to diet-induced obesity Atrophic fat pads Reduction in adipose cell diameter Hypercellular/poorly differentiated Hypertriglyceridemia		
Clinical relevance Restrictive lung diseases Cancer Dominant negative mutation in human breast cancer Cav-1 (P132L) (sporadic) Obesity, hyperlipidemias, diabetes	Clinical relevance Restrictive lung diseases Important animal model in conjunction with Cav-1 KO	Clinical relevance Muscular dystrophy Dominant negative mutations in LGMD-1C in humans Cav-3 (P104L) and others (autosomal dominant)

Tableau 3 : Analyse phénotypique de souris déficientes en cavéoline.

(d'après Razani et al. *Pharmacol Rev.* ; 2002 ⁸³)

b) Structure des cavéolines

Les cavéolines sont formées (Figure 10) par^{83,93} :

- Un domaine d'oligomérisation en hélice α qui sert de séquence d'homo- et d'hétéro-dimérisation, mais aussi à l'interaction avec d'autres protéines.
- Un domaine d'attachement membranaire N-terminal.
- Un domaine transmembranaire.
- Un groupe palmitoyl.
- Un domaine d'attachement membranaire C-terminal.

Les interactions entre les différentes protéines et les cavéolines se font au niveau d'une séquence protéique de 20 acides aminés, le CSD (caveolin scaffolding domain), présent du côté N-terminal proche du domaine transmembranaire des cavéolines⁹⁴. Le CSD est un site de fixation des sous-unités α des protéines G, des tyrosines kinases de la famille Src, et des isoformes de la PKC^{95,96}. Le site de liaison à la cavéoline de ces protéines de signalisation est situé à l'intérieur de leur domaine catalytique actif, ce qui suggère que la cavéoline peut se comporter comme un inhibiteur de ces kinases⁹⁶⁻⁹⁸.

c) Rôle dans les voies de signalisation

Les cavéoles, grâce à leur structure particulière, ont la capacité de concentrer et de réguler de nombreuses voies de signalisation par la présence de nombreux récepteurs, de diverses protéines de signalisation et de canaux ioniques. Les cavéoles sont ainsi des régulateurs importants de l'activité cellulaire^{83,99}.

Une grande variété de récepteurs couplés aux protéines G, tels que le récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT1), est associée aux cavéoles. Après la liaison avec leur agoniste, ces récepteurs et leurs effecteurs sont soit transportés à l'intérieur (pour les récepteurs à la bradykinine B1 et B2¹⁰⁰) ou à l'extérieur des cavéoles (cas du récepteur β_2 -adrénergique¹⁰¹), soit maintenus dans ces invaginations (cas du récepteur à l'endothéline ET1A¹⁰²). Les cavéoles ont ainsi un rôle dynamique dans la transduction du signal. Des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des protéines kinases telles que les MAP kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) sont également localisés dans les cavéoles¹⁰³. Une surexpression de Cav-1 inhibe les voies médiées par ERK1/2. Dans ce cas, Cav-1 fonctionnerait donc comme un inhibiteur endogène des kinases¹⁰⁴. Par la suite, l'utilisation de modèles murins Knock-out pour l'une des trois cavéolines a permis d'évaluer les conséquences physiopathologiques d'une telle déficience, mettant ainsi en évidence de multiples fonctions pour ces protéines membranaires (Tableau 3).

La localisation des cavéoles à proximité d'organelles associées aux flux de Ca^{2+} intracellulaire, telles que le réticulum sarcoplasmique (RS) et les mitochondries, suggère que les cavéoles ont un rôle dans la régulation du relargage calcique nécessaire à l'activation de l'appareil contractile^{105,106}. Une stimulation du muscle lisse par un agoniste provoque une accumulation de récepteurs transmembranaires couplés à la production d'IP3 dans les cavéoles. Cette production localisée d'IP3 activerait les récepteurs à l'IP3 présents au niveau du RS. Cela entraînerait une libération de Ca^{2+} et une contraction musculaire, ainsi que la translocation de protéines de signalisation telles que RhoA et PKC α ¹⁰⁷. Dans des CMLs intactes, l'introduction cytoplasmique d'un peptide correspondant au CSD de Cav-1 est capable d'inhiber cette translocation lors d'une stimulation des récepteurs α -adrénergiques^{108,109}. Ces travaux suggèrent que, dans le muscle lisse, les cavéoles constituent des régions spécialisées de la membrane plasmique jouant un rôle dans le couplage excitation-contraction, via leur implication dans l'intégration de signaux contractiles extracellulaires, et l'activité d'effecteurs intracellulaires tels que RhoA et PKC α . Parallèlement, il a été montré que la stimulation du muscle lisse vasculaire par du KCl entraîne la translocation et l'activation de Rho-kinase au niveau des cavéoles, ce qui induit le processus de sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile¹¹⁰. Des études récentes ont aussi montré que Cav-1 facilite la mobilisation en Ca^{2+} intracellulaire et la contraction induite par un agoniste au niveau de CMLs des voies aériennes humaines^{111,112}.

III.2.2- Les sites d'adhésion focaux

Les sites d'adhésion focaux sont localisés au niveau de la membrane cellulaire. Ils permettent un lien entre le cytosquelette, la matrice extracellulaire (MEC) et les régions de signalisation cellulaire. Les principaux composants des sites d'adhésion focaux sont les intégrines, qui appartiennent à une famille de protéines hétérodimériques transmembranaires : les kinases d'adhésion focale (FAK), c-Src, la paxiline et l'HSP27 (Heat Shock Protein de 27kDa).

Quatre facteurs majeurs influencent le taux d'assemblage, la taille, la constitution et l'impact fonctionnel des sites d'adhésion focaux : les propriétés biochimiques et biophysiques de la matrice extracellulaire, l'activation et l'avidité des intégrines, l'état de contraction du cytosquelette et le milieu spécifique de la cellule et du tissu.

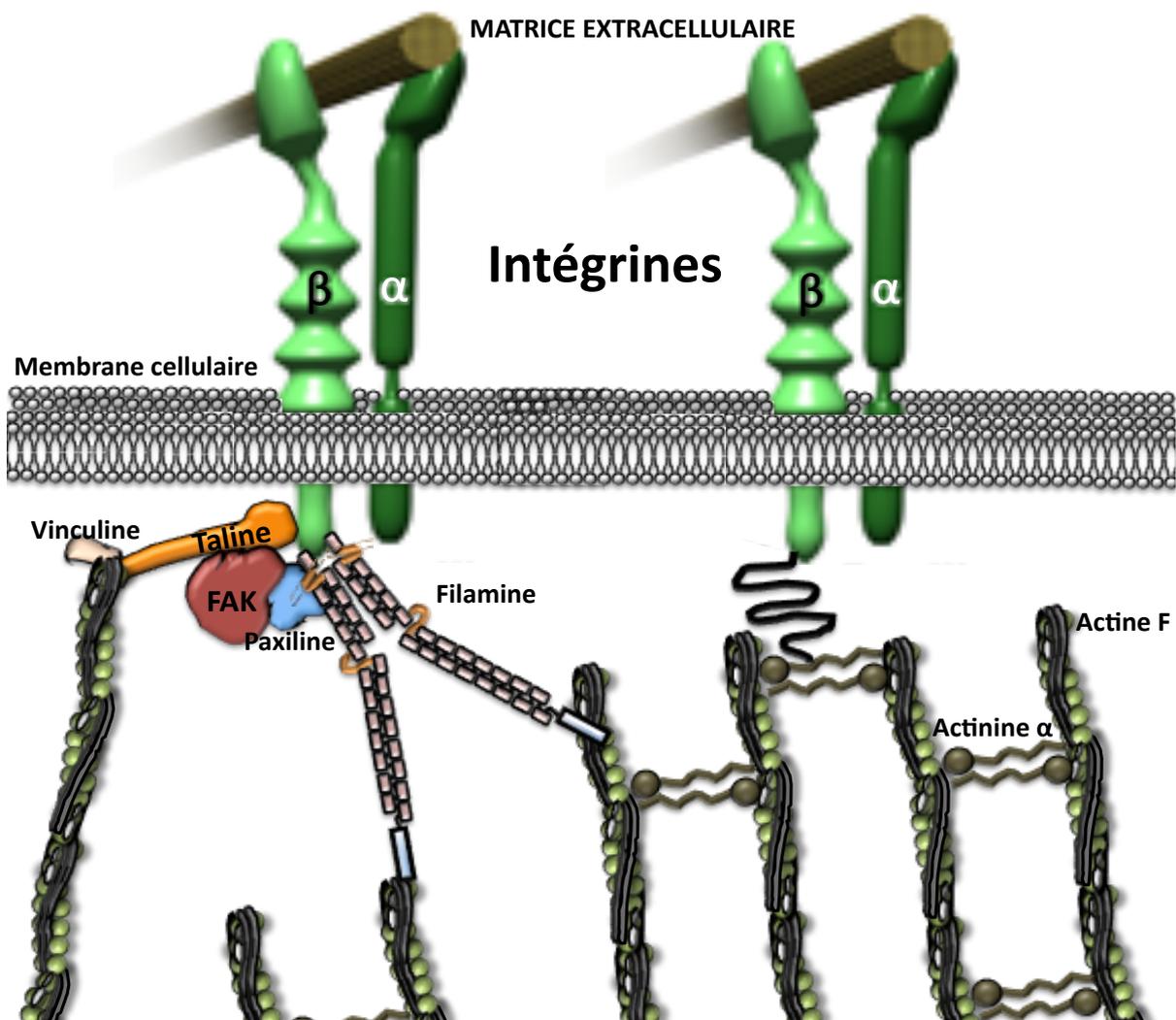


Figure 11 : Exemple schématique de liens formés par les intégrines entre les milieux extra et intracellulaires.

III.2.2.1- Les intégrines

a) Généralités

Les intégrines sont une grande famille de récepteurs de surface qui joue un rôle d'adhésion des cellules à la fois avec la matrice extracellulaire et avec les cellules voisines. Les intégrines fonctionnent comme des points d'ancrage et de couplage membranaires pour des éléments du cytosquelette et des voies de signalisation cellulaire. Pour se faire, elles sont stratégiquement positionnées pour mécaniquement et structurellement lier les milieux extra et intracellulaire selon l'axe 'MEC-Intégrine-Cytosquelette' (Figure 11).

Il existe différentes familles d'intégrines classées en fonction de leur sous-unité β . La majorité des chaînes β s'associent avec de multiples sous-unités α . En revanche, seules quelques sous-unités α s'associent à plus d'une sous-unité β . Il existe 18 chaînes α et 8 β différentes. On dénombre approximativement 24 intégrines connues dont 16 ont été décrites comme intervenant à différents niveaux de la biologie vasculaire. Parmi ces 16, les intégrines $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ sont présentes au niveau des cellules endothéliales, alors qu'au niveau des cellules musculaires lisses sont localisées les intégrines $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_6\beta_4$ ¹¹³.

b) Structure

Les chaînes α et β possèdent un long domaine extracellulaire en N-terminal, qui forme une tête globulaire se fixant de manière cation-dépendante sur des séquences d'acides aminés spécifiques, présentes sur des protéines de la matrice extracellulaire ou sur des récepteurs d'autres cellules. Ces sous-unités α et β possèdent un court domaine intracellulaire en C-terminal sans activité de kinase intrinsèque, mais avec la capacité de s'associer avec une grande variété de protéines d'adhésion focales incluant des protéines du cytosquelette et des protéines kinases¹¹⁴⁻¹¹⁶. Le domaine cytoplasmique des intégrines est essentiel pour la formation des sites d'adhésion focaux. Ainsi, la délétion du domaine cytoplasmique de β_1 , par exemple, inhibe la formation de l'hétérodimère de l'intégrine correspondante¹¹⁷. Le domaine cytoplasmique des sous-unités β est responsable du ciblage des intégrines dans les sites d'adhésion focaux, alors que la séquence cytoplasmique de la sous-unité α inhibe la formation de ces sites.

c) Fonction

En plus de leur rôle dans l'arrimage de la cellule aux éléments de la matrice extracellulaire, les intégrines interviennent dans la transduction de signaux qui mènent à la différenciation, la morphogénèse, la prolifération, la migration, la régulation de la structure cellulaire, l'apoptose et la

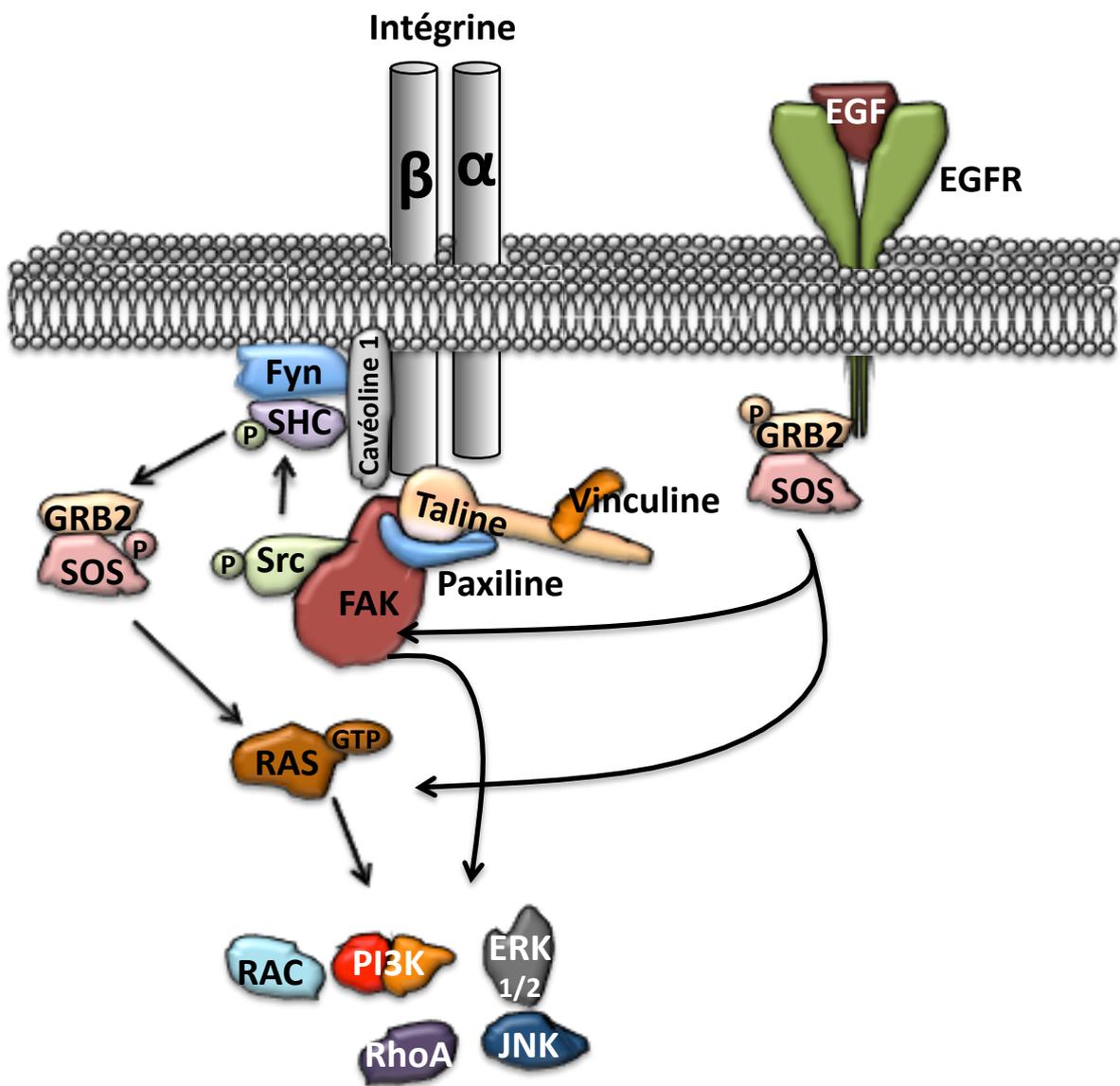


Figure 12: Protéines de signalisation des sites d'adhésion focaux.

régulation du tonus vasomoteur. Le lien intégrine-cytosquelette est important pour tous ces mécanismes. Les interactions entre l'intégrine et le cytosquelette se font par le domaine cytoplasmique β de l'intégrine qui s'associe avec trois protéines majeures : la taline, la filamine et l'actinine α (Figure 11). Le rôle de pont joué par les intégrines entre le milieu extracellulaire, les protéines du cytosquelette et les protéines kinases, leur permet de transmettre des signaux de la matrice extracellulaire vers la cellule, ainsi que de participer aux transmissions de force. Les intégrines activent de nombreux éléments tels que les canaux calciques, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, la phospholipase-C γ , les tyrosine et sérine/thréonine kinases, des phosphatases, des protéines fixant le GTP de la famille Rho et des MAPKinases¹¹⁸⁻¹²⁰.

III.2.2.2- La kinase des points d'adhésion focaux (FAK).

a) Structure

La « Focal Adhesion Kinase » (FAK ou pp125^{FAK}) est une protéine à activité tyrosine kinase associée aux sites d'adhésion focaux¹²¹. Cette protéine de 125 kDa est composée de trois domaines :

- le domaine C-terminal est un domaine riche en prolines qui possède une séquence cible des sites d'adhésion focaux (FAT: Focal Adhésion Targeting), ainsi qu'un site de liaison pour deux protéines, la paxilline et la taline¹²²
- le domaine central qui porte l'activité catalytique de la protéine
- le domaine N-terminal qui se lie au domaine cytoplasmique β 1 de l'intégrine

b) Rôle de FAK

L'activation de FAK par les intégrines mais aussi par différents facteurs de croissance, cytokines ou hormones, se traduit par une phosphorylation et une activation de protéines telles que celles de la famille src, Fyn et c-Src. Ces dernières vont à leur tour phosphoryler d'autres protéines, ce qui entraîne une cascade de phosphorylations qui active la voie de Jnk, la voie de Erk et la voie de la pI3-kinase (Figure 12). Ces trois voies vont entre autres réguler des processus vitaux tels que la prolifération et la migration cellulaire, donc la survie de la cellule. La phosphorylation de résidus tyrosine de protéines du cytosquelette, en réponse aux propriétés d'adhérence des intégrines, est un mécanisme important de la transmission de signaux contrôlant de nombreux processus cellulaires. Plusieurs protéines tyrosine kinases peuvent intervenir dans ces mécanismes de phosphorylation et FAK y joue un grand rôle.

c) Régulation

Si la protéine est activée par des intégrines, alors le domaine carboxy-terminal va jouer un rôle très important puisque sa région FAT va permettre la localisation de la FAK au niveau du complexe d'adhérence focale, en reconnaissant la liaison entre la taline et la paxiline, deux protéines de ce complexe. La taline est le médiateur de l'activation de FAK par les intégrines, elle permet aussi l'interaction avec les filaments d'actine. Cette interaction est nécessaire à l'activation de FAK car on sait que des filaments d'actines anormaux empêchent l'activation de FAK. Les interactions de la partie N-terminale avec les récepteurs de facteurs de croissance et les intégrines, et celles entre le site FAT et la taline, suggèrent qu'en fonction du stimulus initial, la régulation de FAK se fait de manière différente. La partie C-terminale interviendrait plus dans l'activation par les intégrines alors que la partie amino-terminale aurait un rôle plus important lors d'une activation par les facteurs de croissance¹²³.

III.2.2.3- Les protéines G

Les protéines G sont capables d'hydrolyser le GTP. Leur activité GTPasique intrinsèque est très lente et nécessite l'intervention de catalyseurs. Les protéines G sont essentielles à la transduction du signal, à l'organisation du cytosquelette et au transport cellulaire. Elles constituent des commutateurs moléculaires qui oscillent entre une forme active liée au GTP, et interagissent avec des effecteurs, et une forme inactive liée au GDP. Les protéines G sont composées de trois classes de protéines de poids moléculaire et de structure différents : les protéines G hétérotrimériques qui sont couplées aux récepteurs à sept domaines transmembranaires, les protéines G de taille intermédiaire telles que les facteurs d'élongation Tu et G, et pour finir les petites protéines G monomériques. Nous ne nous intéresserons qu'aux protéines G hétérotrimériques et monomériques.

a) Les protéines G hétérotrimériques

Ces protéines sont couplées à des récepteurs RCPG (Récepteur Couplé à une Protéine G) et sont liées à la surface interne de la membrane. Elles sont constituées de sous-unités α , β et γ qui sont étroitement liées entre elles. Quand un ligand (ThromboxaneA2, Phényléphrine, Angiotensine II...) se lie au RCPG, la protéine G se lie au récepteur entraînant la libération de la liaison GDP de la sous-unité G_α , et lie une molécule de GTP à la place. Ce mécanisme provoque la dissociation de la sous-unité G_α , du dimère $G_{\beta\gamma}$, et du récepteur. Les sous-unités G_α -GTP et $G_{\beta\gamma}$ peuvent chacune induire des voies de signalisation différentes via des seconds messagers et des protéines effectrices, tandis que le récepteur est de nouveau capable d'activer une nouvelle protéine G. Le signal

activateur se termine lorsque la sous-unité G_α hydrolyse le GTP en GDP entraînant sa réassociation aux sous-unités $G_{\beta\gamma}$.

Chez les mammifères, il existe plus de 16 sous-unités G_α différentes ainsi que 5 sous-types de β et 14 de γ . La multitude d'associations possibles entre ces différentes sous-unités entraîne une grande diversité de protéines G, permettant l'association des différents RCPG avec des effecteurs précis nécessaire à la transduction d'un message donné.

Par exemple, dans le cas du thromboxane A₂, sa fixation sur son récepteur TP peut activer les protéines $G_{\alpha_{q/11}}$, $G_{\alpha_{12/13}}$, $G_{\beta\gamma}$, G_{α_i} , G_{α_s} et G_h , et par conséquent active différentes voies de signalisation conduisant à des réponses physiologiques diverses¹²⁴. Ainsi le thromboxane A₂ induit une contraction via l'activation des protéines $G_{\alpha_{q/11}}$ et $G_{\alpha_{12/13}}$ alors que dans le cas de la phényléphrine, stimulant les récepteurs α_1 adrénergiques, la contraction ne résulte que des voies de signalisation initiées par l'activation de la protéine $G_{\alpha_{q/11}}$, sachant que la protéine $G_{\alpha_{12/13}}$ n'intervient pas¹²⁵.

b) Les protéines G monomériques

Ces protéines font partie de la super-famille ras qui compte 154 membres chez l'homme¹²⁶. Cette super-famille est divisée, selon les homologies de structure et de fonction (environ 60%), en 5 familles : Ras, Rho, Rab, Arf et Ran. Les petites protéines G possèdent un motif CAAX en C-terminal. Ce motif sert de substrat pour plusieurs types d'enzymes, catalysant la création d'un domaine lipidique hydrophobe permettant ainsi leur ancrage à la membrane. Grâce à des variations de structure et de modifications post-traductionnelles, les protéines G monomériques ont des localisations subcellulaires et interagissent avec différents partenaires. Les combinaisons "Protéine G/régulateurs/effecteurs" sont multiples et orchestrent donc la spécificité des réponses cellulaires. Les protéines G sont impliquées dans des pathologies humaines (cancers, infections, maladies cardiovasculaires) et constituent ainsi des cibles d'intérêt thérapeutique.

Leur activité est contrôlée dans l'espace et dans le temps par trois grandes classes de protéines qui régulent l'alternance entre la forme inactive -GDP, et la forme active -GTP:

- les facteurs d'échange nucléotidique ou GEFs, qui permettent l'activation des protéines G en stimulant la dissociation du GDP.
- les GTPase Activating Proteins ou GAPs, qui à l'inverse, terminent le signal en activant l'hydrolyse du GTP.
- les Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors ou GDI, qui partitionnent certaines protéines G entre les membranes et le cytoplasme.

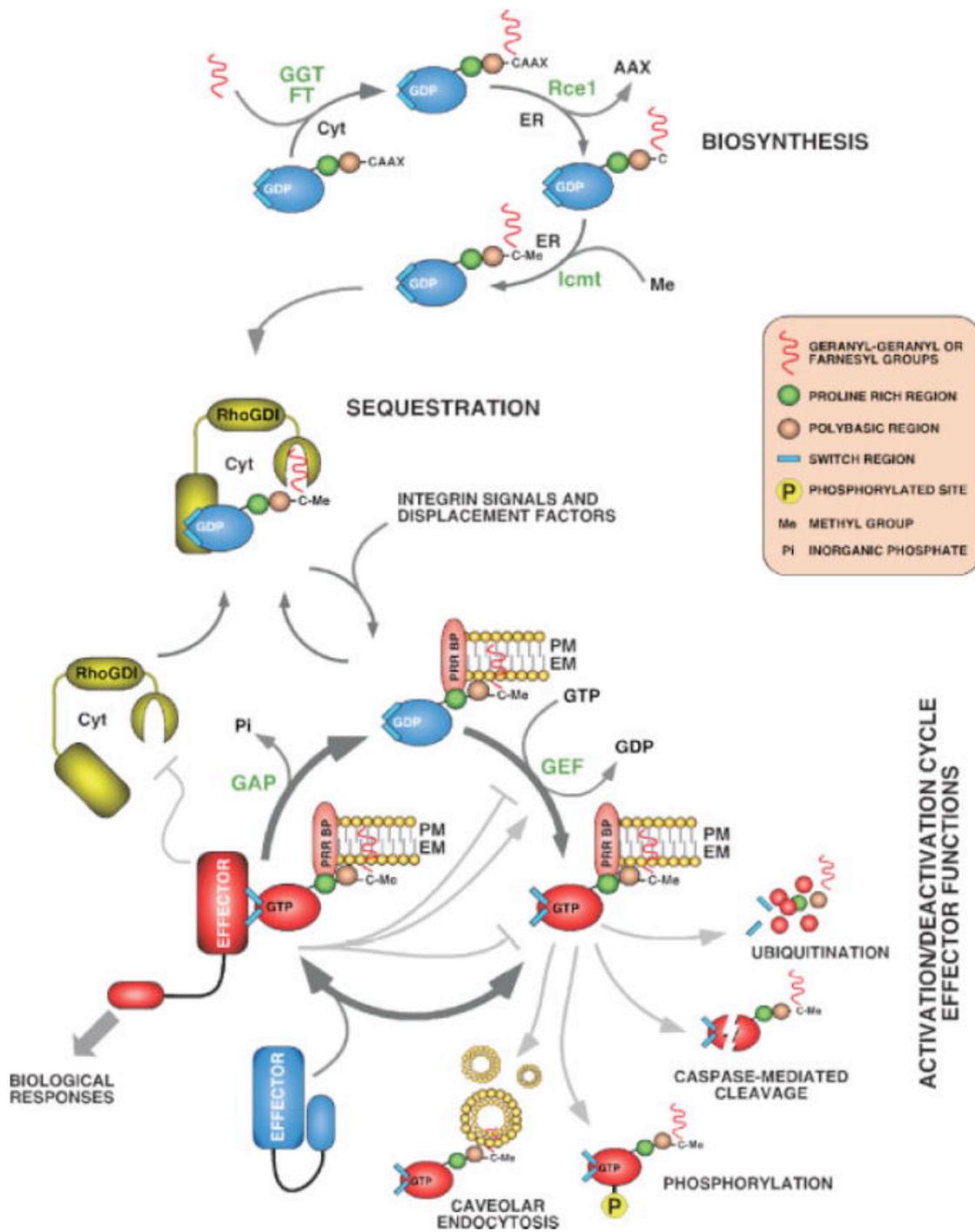


Figure 13: Cycle d'activité des protéines de la famille Rho.

D'après Bustelo et al (2007)⁴²⁹

▪ **La protéine Rho A**

L'assemblage des sites d'adhésion focaux est régulé par les petites protéines G Rho (Ras Homologue), qui font partie de la famille des protéines Ras. Le premier membre de la famille Rho à avoir été identifié est RhoA¹²⁷.

Régulation

L'activité de RhoA nécessite que la protéine soit ancrée à la membrane plasmique pour que puisse s'effectuer l'échange du GDP par du GTP en excès dans la cellule (Figure 13). Cet échange est catalysé par les GEFs, alors que le retour à l'état inactif par hydrolyse du GTP est accéléré par l'intervention des GAPs. L'ancrage à la membrane est déterminé par la présence d'un groupement géranylgeranyl en C-terminal permettant l'ancrage, et par l'éjection du GDI séquestrant RhoA sous sa forme inactive dans le cytosol¹²⁸.

Un grand nombre de stimuli peut activer RhoA, incluant les facteurs solubles via les récepteurs membranaires couplés à une protéine G hétérotrimérique (RCPG), les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs aux cytokines^{129,130}. Le désassemblage des microtubules intervient aussi sur l'activité de RhoA en stimulant l'activité du facteur d'échange nucléotidique GEF-H1, ce qui entraîne une augmentation rapide de la quantité de RhoA-GTP¹³¹.

Des protéines kinases, comme la PKA et la PKG, peuvent réguler la translocation à la membrane de RhoA. La phosphorylation de RhoA par ces kinases au niveau de la sérine 188 entraîne son extraction de la membrane par le GDI. Le GDI séquestre ainsi RhoA dans le cytosol, le rendant incapable d'activer ses effecteurs membranaires tels que Rho-kinase. En effet, dans les CMLs, la stimulation de la PKG inhibe les fonctions contractiles de RhoA^{132,133}. De plus, la phosphorylation de la sérine 188 modifie l'affinité de RhoA pour certains de ses effecteurs¹³⁴ entraînant une diminution de son affinité pour Rho-kinase et une augmentation de celle pour un autre effecteur tel que mDia. De plus, la séquestration dans le cytosol protège RhoA de la dégradation¹³⁵ probablement en empêchant sa colocalisation avec les ubiquitines ligases qui dégradent RhoA. Le contrôle de la phosphorylation de RhoA par la PKG est donc un mécanisme essentiel de la régulation de l'activité de la voie RhoA/Rho-kinase dans la cellule musculaire.

Rôle

Cette petite protéine G intervient au niveau des CMLVs dans différents processus¹³⁶ tels que :

- la différenciation, en régulant le facteur de transcription SRF (Serum Response Factor) qui contrôle l'expression de gènes spécifiques des CMLs.
- la prolifération, en intervenant sur différentes protéines régulatrices du cycle cellulaire.

- la migration via l'activation de Rho-kinase qui, en fonction des cas, active ou inhibe ce mécanisme.

Mais avant tout, RhoA tient une place importante dans la contraction des CMLs par son rôle dans la sensibilisation de l'appareil contractile. Des travaux ont montré que l'addition de la protéine RhoA activée sur des artères mésentériques perméabilisées induit, avec une concentration en Ca^{2+} intracellulaire constante, une contraction par la sensibilisation au Ca^{2+} des protéines contractiles^{137,138}.

RhoA est donc un régulateur des fonctions majeures (migration, différenciation...) des cellules qui composent la paroi vasculaire. La régulation de ces fonctions détermine le tonus et la structure vasculaire ce qui explique pourquoi un dysfonctionnement de RhoA est un événement couramment observé dans la pathogénie des maladies vasculaires, comme l'hypertension artérielle (HTA)¹³⁹ et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)¹⁴⁰. Ces pathologies se caractérisent par une augmentation de la pression artérielle liée à une augmentation des résistances périphériques pour l'HTA, et par une augmentation de la pression à l'intérieur des artères pulmonaires causée par une vasoconstriction exacerbée et un remodelage de ces artères pour l'HTAP.

▪ **Rho-kinase et mDia, deux effecteurs de RhoA**

Rho-kinase

Rho-kinase (ROCK) a été le premier effecteur de RhoA à être identifié et caractérisé. Cette protéine ubiquitaire à tout d'abord été décrite comme intervenant dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation des points d'adhésion focaux¹⁴¹. ROCK intervient aussi dans la contraction des CMLs. L'utilisation d'un inhibiteur de cette kinase, le Y27632 par l'équipe de Kaibuchi¹⁴² a permis de montrer que Rho-kinase inhibe la MLCP en phosphorylant la thr697 de sa sous-unité MYPT1 qui fixe la myosine. De plus, il a été montré que la Rho-kinase peut directement phosphoryler la MLC_{20} ¹⁴³ et induire une contraction des CMLs même en présence d'un inhibiteur de la MLCK¹⁴⁴. L'implication majeure de l'activité des protéines ROCK dans la régulation de la voie de sensibilisation au Ca^{2+} et dans le remodelage dynamique du cytosquelette d'actine est à présent clairement établie¹⁴⁵.

mDia

RhoA intervient aussi dans la polymérisation de l'actine via l'activation d'un autre de ses effecteurs, la Diaphanous 1 et 2 (mDia1/2). L'équipe du Dr Mack a montré que cette formin est exprimée dans les tissus riches en CMLs¹⁴⁶. mDia apparaît comme un promoteur de la polymérisation de l'actine en se liant à la profiline via son domaine FH1 riche en prolines^{147,148}.

Cette induction de la polymérisation de l'actine est corrélée à l'activation de la transcription de nombreux gènes¹⁴⁹, selon un mécanisme que nous décrirons ultérieurement (paragraphe IV.2.2). De plus, une mutation au niveau de son site de fixation aux monomères d'actine empêche la formation de fibre de stress ainsi que l'activation du promoteur SRE (Serum Response Element).

⇒ Ces différentes protéines membranaires indiquent donc l'existence d'un lien entre la matrice extracellulaire, la membrane plasmique et le cytosquelette. Elles permettent de transmettre les stimuli extracellulaires à l'intérieur de la cellule. Suite à cela, le signal est acheminé vers différentes structures, telles que l'appareil contractile ou le noyau, afin d'engendrer une réponse cellulaire adéquate. Cette transmission du signal nécessite une cascade d'activations faisant intervenir différentes protéines cytoplasmiques.

III.3- Les protéines de signalisation intracellulaire (ou cytoplasmique)

III.3.1- Les protéines kinases

Les protéines kinases tiennent une place importante dans la transmission intracellulaire du signal. Parmi ces protéines se trouvent les protéines kinases C qui, une fois activées, vont elles-mêmes phosphoryler et activer d'autres protéines intracellulaires, les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase).

III.3.1.1- Les protéines kinases C

a) Généralités

Les Protéine Kinases C (PKC) font partie de la famille des sérine-thréonine kinases. Ces protéines kinases sont activables de manière réversible par du diacylglycérol (DAG) en présence de phospholipides. La famille des PKC comprend une dizaine d'isoformes représentant des enzymes jouant un rôle important tout au long de la vie cellulaire, et en particulier durant les phases de proliférations et de différenciations^{150,151}.

Les PKCs peuvent être divisées en deux classes principales : celles dont l'activation dépend du Ca^{2+} et celles dont l'activation est indépendante du Ca^{2+} . Par ailleurs, selon la structure et la nécessité d'un activateur lipidique, elles peuvent être classées en trois sous-groupes :

- Les PKC conventionnelles (cPKC ; isoformes α , βI , βII et γ) dont l'activation dépend du Ca^{2+} , de la phosphatidylsérine et du DAG.
- Les PKCs dites nouvelles (nPKC ; isoformes δ , ϵ , η et θ) qui sont activées par la phosphatidylsérine et le DAG, mais ne nécessitent pas de Ca^{2+} .

- Les PKCs atypiques (aPKC ; isoformes ι , λ et ζ) qui sont activées par la phosphatidylserine, mais ne sont affectées ni par le Ca^{2+} ni par le DAG.

Dans les CMLs on trouve les isoformes α , β II, ϵ et ζ

b) Rôle et régulation

Les PKC conventionnelles sont des enzymes clés dans les mécanismes de signalisation, qui impliquent l'activation des récepteurs couplés à la phospholipase C, qui à son tour engendre une élévation transitoire du DAG et des inositols phosphates.

L'activité de la PKC est contrôlée par des mécanismes d'autophosphorylation et de transphosphorylation, incluant la phosphorylation d'isoenzymes de PKC par des protéines kinases dépendantes de phosphoinositides (PDKs) et de tyrosines kinases. De plus, des interactions spécifiques protéines-protéines sont importantes pour leur conférer une spécificité de substrat.

Des activateurs directs de PKC (phorbol esters, indolactam), qui sont de puissants vasoconstricteurs, sont associés à une augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} des protéines contractiles¹⁵². L'inhibition spécifique de la PKC ϵ entraîne une diminution de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile induisant ainsi une diminution de la contraction induite par de la phényléphrine¹⁵³.

III.3.1.2- Les MAP Kinases

Les protéines kinases activées par les agents mitogènes (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase) sont des sérine/thréonine kinases très conservées chez les eucaryotes. Elles ont été décrites comme intervenant dans le contrôle de la croissance cellulaire mais aussi dans la différenciation et la mobilité cellulaire, l'inflammation et l'apoptose. Elles font partie d'une cascade de kinases dans laquelle une protéine kinase va phosphoryler et activer la protéine kinase qui la succède selon une hiérarchie bien précise (MAPK Kinase Kinase \Rightarrow MAPK Kinase \Rightarrow MAPK). Les signaux extracellulaires déclenchant ces cascades sont majoritairement des facteurs de croissance extracellulaires se liant à un récepteur à activité tyrosine kinase. Une fois activé, ce récepteur active à son tour différentes petites protéines G comme RhoA.

Une MAPK activée peut aller phosphoryler de nombreuses cibles telles que des facteurs de transcription régulant ainsi l'expression génique, des protéines du cytosquelette et d'autres enzymes dont d'autres protéines kinases. Elle traduit donc les stimuli extracellulaires transmis par les protéines FAK, PLC, ou PKC, en réponses biologiques. Les MAPKs sont impliquées dans la régulation des filaments contractiles par le contrôle de l'état de phosphorylation de la myosine et de l'actine.

Malgré une homologie entre les différentes MAPK, elles sont activées par de multiples stimuli externes, et induisent donc des réponses cellulaires très diverses. Les MAPK les plus importantes sont les ERK 1 et ERK 2 ainsi que la JNK et la p38.

a) Les protéines ERK 1/2 et JNK

Les protéines ERK1 et ERK2 ("Extracellular Regulated Kinase 1 et 2"), appelées aussi p42 et p44, sont activées par une double phosphorylation sur un motif TY par les isoformes MKK1 et MKK2 (MAP Kinase Kinase 1 et 2). MKK1 et MKK2 sont elles-mêmes activées par la phosphorylation de deux résidus sérine par la protéine kinase Raf. La voie de signalisation résultante (Raf - MKK1/2 - MAPK) est activée directement par de petites protéines G (Ras). Cette interaction de Ras avec Raf permet une relocalisation de Raf au niveau de la membrane plasmique. Ras interagit avec une grande variété de protéines de signalisation comme les tyrosines kinases, les protéines G couplées à des récepteurs, et les cytokines.

Il a été montré qu'une stimulation des récepteurs α -adrénergiques, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, entraîne une activation de ERK1/2 qui phosphorylent la caldesmone entraînant une contraction du muscle lisse indépendante du Ca^{2+} ¹⁵⁴.

Les MAPKs sont les premiers membres de cette cascade de signalisation à être transloqués dans le noyau après stimulation par des facteurs de croissance¹⁵⁵. Cette translocation permet aux MAPKs de phosphoryler et d'activer plusieurs facteurs de transcription, dont le principal est Elk1 aussi appelé p62TCF¹⁵⁵. Elk1 est responsable de l'induction de l'expression de c-fos¹⁵⁶.

En 1994, une autre MAP kinase a été identifiée dans les cellules de mammifères : la protéine JNK, présentant deux isoformes p46 et p54 (aussi appelées respectivement JNK1 et JNK2 ou SAPK γ et SAPK β)¹⁵⁷. Les isoformes p46 et p54 JNK sont activées par une double phosphorylation sur un motif TY par MKK4 (aussi appelée JNKK1 ou SEK1)¹⁵⁸. La protéine MKK4 est elle même activée par une MKKK appelée MEKK1. L'activation de ces deux protéines est induite par des membres de la famille des petites protéines G, Rac et cdc42, et la sérine/thréonine kinase PAK (p21 Ras-activated kinase). Comme p42 et p44 MAPK, la protéine JNK est transloquée au niveau du noyau. La protéine JNK phosphoryle et active les facteurs de transcription Jun, ATF2, et Elk1 menant à l'induction et l'expression des gènes c-fos et c-jun¹⁵⁹.

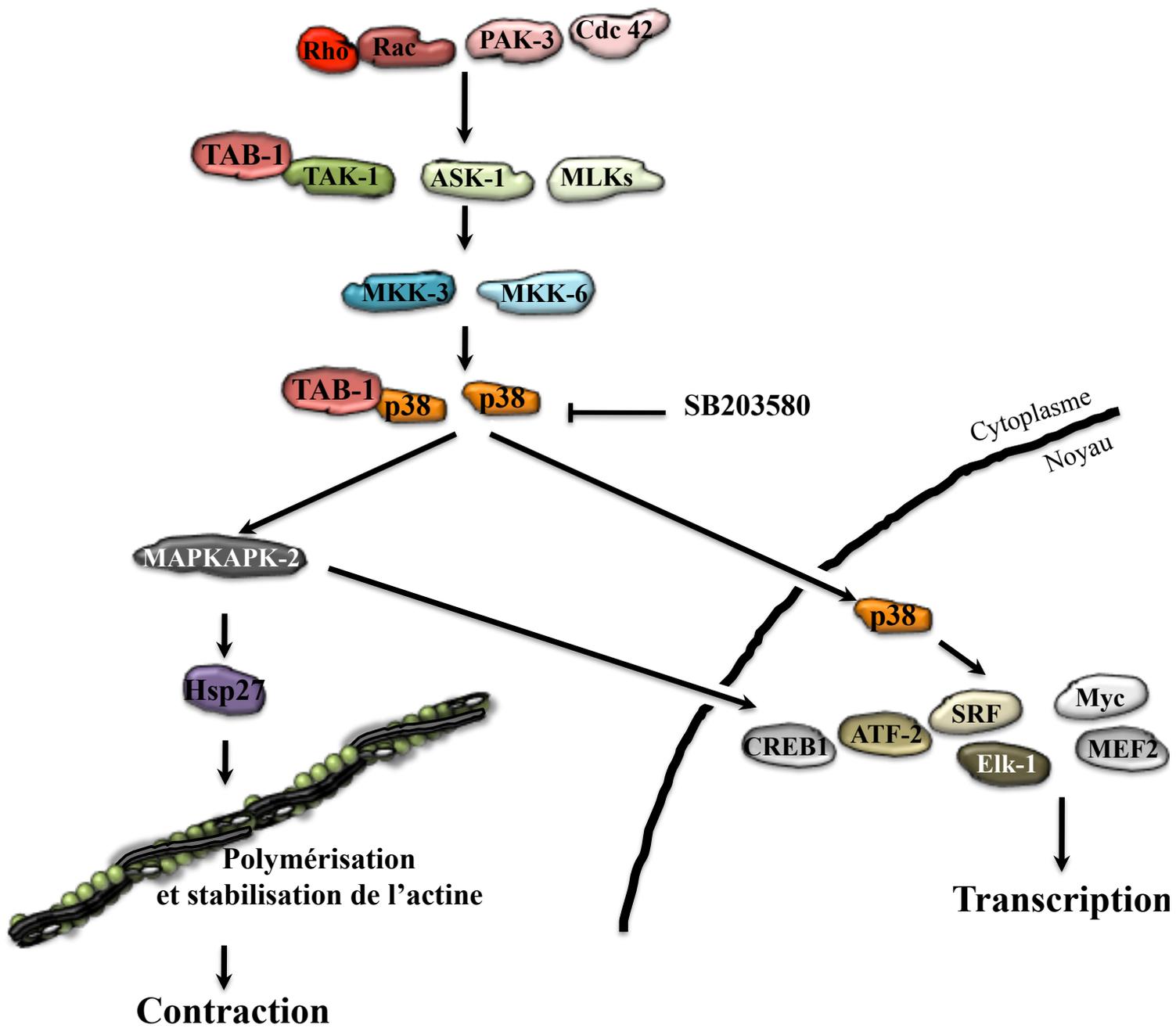


Figure 14 : Schéma simplifié des voies de signalisation de la MAPK p38.

b) La voie de la MAPKinase p38

La MAPK p38, identifiée en 1994¹⁶⁰, existe sous quatre isoformes (α , β , γ et δ) pouvant être distingués en deux groupes en fonction de leur homologie de séquence et leur sensibilité aux inhibiteurs chimiques SB203580 et SB202190. Ainsi on trouve p38 α et β sensibles à ces inhibiteurs et les isoformes p38 γ et δ qui ne le sont pas¹⁶¹⁻¹⁶³. Ces deux groupes sont surtout différenciables selon un troisième critère qu'est leur substrat. Effectivement, p38 α et β phosphorylent particulièrement des éléments tels que la glycogène synthase, les MAPKAPK-2 et -3 (MAPK-Activated Protein Kinase)¹⁶¹⁻¹⁶³, alors que p38 γ et δ prennent davantage pour cibles des protéines du cytosquelette telles que la syntrophine α 1, la SAP90/PSD95^{164,165}, et des protéines associées aux microtubules^{166,167}.

De manière similaire aux protéines JNK et ERK1/2, p38 est transloquée dans le noyau où elle active les facteurs de transcription ATF2, Elk1 et SRF^{160,168}.

▪ Activation et rôle

La protéine p38 MAPK, comme la protéine JNK, est activée par un environnement de stress (choc osmotique, choc thermique, UV, irradiations, et lipopolysaccharides) et par des cytokines (interleukine-1, TNF- α)¹⁶⁹. p38 a été caractérisée comme un régulateur important de la polymérisation de l'actine lors de la formation de lamellipodes induite par du PDGF, et lors de la migration de CMLs¹⁷⁰.

P38 peut aussi être activée par les récepteurs RCPG. L'utilisation de SB203580 inhibe la contraction induite par l'activation de beaucoup de RCPG, ce qui suggère que p38 contribue à la contraction de manière différente en fonction de l'agoniste^{171,172}. Cet effet de p38 n'est probablement pas dû à la phosphorylation de la caldesmone¹⁷³. Dans ce cas p38 provoque la contraction via son substrat, MAPKAPK-2, qui phosphoryle HSP27 (Heat Shock Proteine 27)¹⁷⁴. Des études montrent une association de HSP27 avec les filaments d'actine au niveau des CMLs vasculaires¹⁷⁵ et que sa phosphorylation est associée à la polymérisation de l'actine de cellules en culture¹⁷⁶ (Figure 14). La fonction précise de HSP27 sur la polymérisation n'a pas été décrite. Cependant, Gerthoffer et Gunst proposent un rôle de promoteur ou de stabilisateur de HSP27 sur l'actine polymérisée¹⁷⁷. Cela est appuyé par la diminution de la contraction avec des inhibiteurs de la polymérisation¹⁷⁸, ou avec un anticorps dirigé contre HSP27¹⁷⁹.

▪ Régulation

La régulation de la MAPK p38, en réponse aux différents stimuli, se fait par phosphorylation.

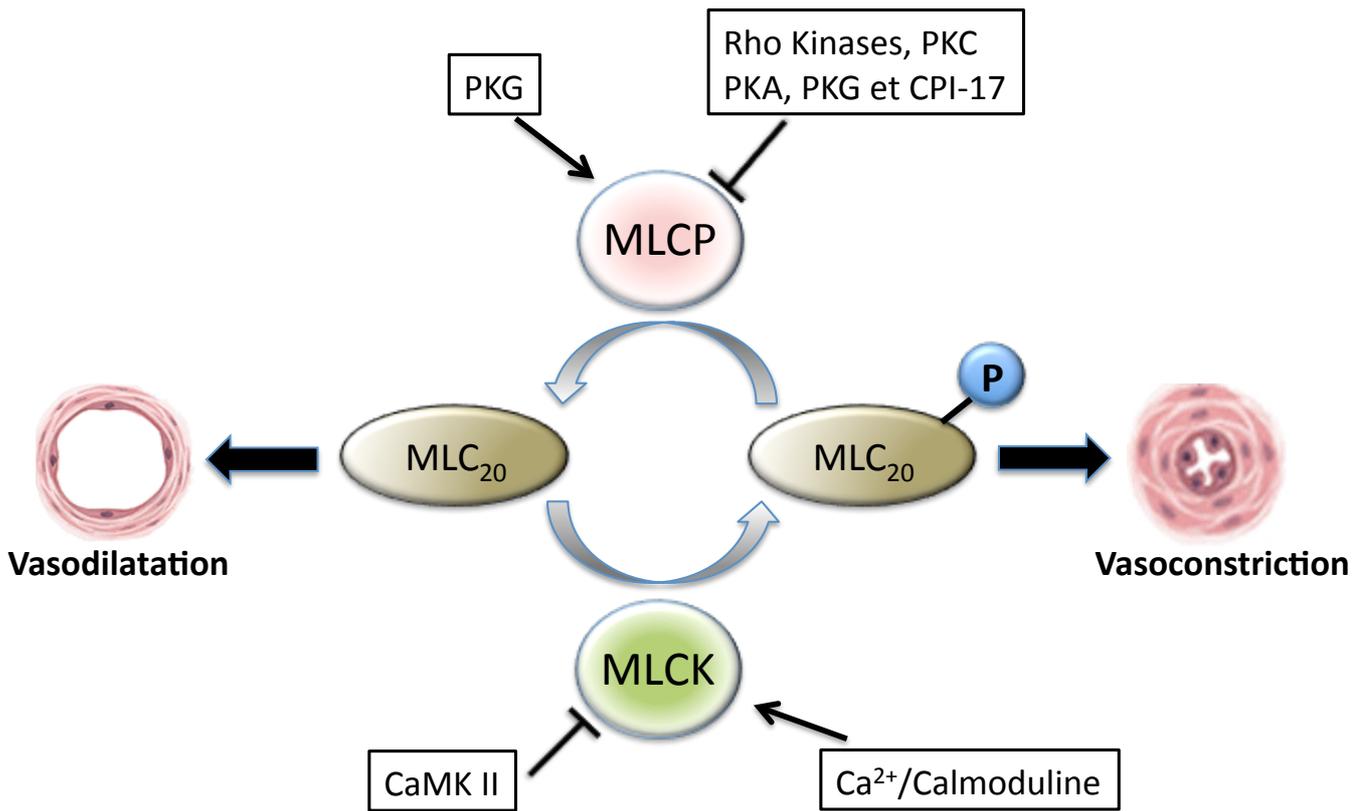


Figure 15 : Régulation de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC₂₀).

Phosphorylation par les MAP Kinase Kinases (MKK)

La protéine p38 MAPK est spécifiquement phosphorylée et donc régulée par MKK3 et MKK6¹⁸⁰⁻¹⁸². L'importance de la fonction physiologique de ces deux kinases a été élucidée par des études sur des souris Knock-out. Ces animaux présentent des défauts de vascularisation embryonnaire et ne sont donc pas viables¹⁸³. Cependant, ces kinases ont des rôles redondants car les souris dépourvues que d'une seule de ces deux kinases sont viables¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. De plus, il a aussi été montré que dans certaines circonstances, la protéine MKK4, qui active JNK, peut aussi réguler p38 α ¹⁸³.

En amont de ces deux MKKs se trouvent différentes MKKKs en fonction du tissu concerné, telles que MLKs, ASK1, TAK1 et d'autres membres de la famille des MEKKs. Ainsi, l'activation de la p38, comme pour JNK, est induite par les éléments qui activent les MKKKs tels que des membres de la famille des petites protéines G comme Rac, Rho, cdc42 et la sérine/thréonine kinase PAK-3 (p21 Ras-activated kinase)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, et des protéines G hétérotrimériques couplées à des récepteurs¹⁹⁰(Figure 14).

Autophosphorylation

Outre la phosphorylation de p38 par les MKKs, d'autres mécanismes de régulation ont été décrits. TAB1 (Transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1) binding protein 1), qui se fixe sur des kinases telles que TAK1 et p38 α , entraîne leur activation¹⁹¹. TAB1 séquestre p38 α dans le cytosol limitant ainsi ses fonctions¹⁹². L'autophosphorylation de p38, qui entraîne son activation, est facilitée par son interaction avec des molécules régulatrices telles que TAB1 (Figure 14). Cela ne semble pas représenter le mécanisme principal d'activation de p38 mais peut être une importante voie alternative intervenant en parallèle de celle des kinases dans la régulation de la signalisation intracellulaire.

III.4- Les protéines régulant la phosphorylation de la myosine

Sachant que le muscle lisse est dépourvu de troponine et que l'actine seule s'avère incapable d'activer la Mg-ATPase de la myosine, cette activation suppose un pré-requis indispensable : la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine, la MLC₂₀ (myosin light chain ou MLC). Outre l'intervention de la Rho-kinase, cette phosphorylation est régulée par deux enzymes : la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) et la phosphatase de ces mêmes chaînes (MLCP) (Figure 15). Sachant que l'amplitude de la contraction dépend de la quantité de MLC₂₀ phosphorylée, cette contraction est donc en lien direct avec l'activité des ces deux enzymes^{193,194}.

III.4.1- La MLCK

La MLCK possède un motif répété au niveau de son extrémité N-terminale, permettant sa liaison aux monomères d'actine¹⁹⁵, ainsi qu'un domaine de liaison avec la calmoduline. Elle est formée également d'un domaine catalytique et d'une séquence autoinhibitrice qui recouvre le site catalytique empêchant ainsi sa liaison avec la MLC₂₀.

Lors d'une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire, résultant de différents mécanismes que nous détaillerons ultérieurement, le calcium s'associe avec une autre protéine de 150 acides aminés, hautement conservée entre les espèces, la calmoduline. Cette dernière est dépourvue d'activité enzymatique, cependant la fixation de quatre ions Ca²⁺ sur une molécule de calmoduline provoque un changement de conformation de celle-ci, lui permettant d'interagir avec de nombreuses protéines et de les réguler. Le complexe Ca²⁺/calmoduline va se fixer à la MLCK via l'extrémité C-terminale de la calmoduline et modifie la conformation de la MLCK en décalant la partie régulatrice^{196,197}. Le site catalytique est alors découvert permettant ainsi la fixation de la MLCK au niveau de l'extrémité N-terminale de la MLC₂₀, et la phosphorylation de la sérine 19 de la chaîne légère. Cela permet l'induction de l'activité ATPasique de la MLC₂₀. Cependant il a été démontré que la fixation de la MLCK sur la myosine peut suffire à initier l'activité ATPasique sans phosphorylation¹⁹⁸.

La MLCK présente aussi des sites de phosphorylation¹⁹⁹ cibles de nombreuses protéines kinases telles que la PKA, la PKC, la protéine kinase II dépendante de la Ca²⁺/Calmoduline (CaMK II) et la PAK. La phosphorylation de ces sites peut réduire l'affinité de la MLCK pour la calmoduline inhibant ainsi son activité^{200,201}. Par exemple, la phosphorylation par la CaMK II d'une sérine spécifique (site A) situé à proximité du site de fixation à la calmoduline réduit l'affinité de la MLCK pour le complexe Ca²⁺/Calmoduline²⁰². Cela participe à un rétro contrôle négatif limitant la phosphorylation de la MLC₂₀ dans le cas de fortes hausses de Ca²⁺³⁷.

III.4.2- La MLCP

La MLCP est une protéine constituée d'une sous-unité catalytique de 38 kDa (PP-1C), d'une sous-unité régulatrice de 110 à 330 kDa (MYPT) et d'une sous-unité supplémentaire de 20 kDa dont le rôle n'est pas connu²⁰³. La sous-unité PP-1C peut être régulée par phosphorylation sur la Thr320, notamment lors de la mitose²⁰⁴, mais aucune phosphorylation n'a été observée au cours de la contraction. La sous-unité MYPT permet à la MLCP d'interagir avec différentes protéines dont la MLC₂₀ phosphorylée²⁰⁵. Au niveau de MYPT est localisée une séquence (Arg/Lys-Val/Ile-Xaa-Phe) permettant la fixation à la sous-unité catalytique. Ainsi, l'interaction entre la MLC₂₀ phosphorylée et MYPT permet d'activer la sous-unité PP-1C. Alors l'activité phosphatase entraîne

la déphosphorylation de la MLC_{20} et donc inhibe les interactions myosine-actine. La phosphorylation de MYPT sur la Thr697 permet de diminuer de cinq fois son activité phosphatase²⁰⁶.

La MLCP est systématiquement activée dans les CMLs. Lorsque la phosphorylation par la MLCK décroît, la MLCP déphosphoryle la myosine. Cette baisse de l'activation de la MLCK est causée par la diminution du Ca^{2+} intracellulaire. Contrairement à la MLCK, le fonctionnement de la MLCP est indépendant du Ca^{2+} . Ainsi, en présence d'une faible concentration de Ca^{2+} , l'équilibre est en faveur de la MLCP alors que lors d'une hausse de Ca^{2+} , c'est l'activité de la MLCK qui prédomine. Pour finir, différents travaux ont montré que la MLCP peut être activée par la PKG. Cette dernière s'oppose à l'effet de la Rho-kinase en phosphorylant la sous-unité de liaison à myosine de la MLCP, ce qui l'active^{207,208}.

III.5- Le calcium

III.5.1- Concentration calcique intracellulaire

L'état contractile des CMLs est directement lié à la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . La concentration calcique intracellulaire dans les CMLs au repos est de l'ordre de $10^{-7}M$ alors que la concentration extracellulaire est assez élevée, de l'ordre de $2,5 \cdot 10^{-3}M$. Une élévation importante du Ca^{2+} (jusqu'à $10^{-5}M$) à l'intérieur de la cellule engendre une contraction des CMLs.

L'élévation de Ca^{2+} intracellulaire peut être la conséquence de deux types de stimulation : l'activation d'un récepteur à sept domaines transmembranaires (couplage pharmaco-mécanique) ou une dépolarisation membranaire (couplage électro-mécanique). Au niveau des CMLs, la mobilisation calcique peut être effectuée de différentes manières : soit par l'activation de canaux calciques dépendants du voltage, soit par des récepteurs canaux ou des canaux couplés à des récepteurs, soit par des canaux cationiques non-sélectifs et des CRACs (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel), ou soit par une libération du Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarcoplasmique.

III.5.1.1- Les canaux calciques dépendants du voltage

Les études pharmacologiques et électrophysiologiques ont montré qu'il existe six types de canaux calciques voltage dépendants (CCVDs) : les CCVDs de type L, T, N, R, Q et P²⁰⁹. Dans les CML vasculaires, deux types sont présents: le type L (" long-lasting ") et le type T (" transient ")²¹⁰. Les canaux de type T sont activés par des dépolarisations moyennes (-30 mV) et sont inactivés rapidement (20 à 60 ms). Au niveau des CMLVs, ce sont les canaux Ca^{2+} de type L qui sont responsables de l'influx calcique²¹¹. Egalement appelés récepteurs aux dihydropyridines (DHPR) ils ont comme caractéristiques d'être à inactivation lente (300 à 600 ms) et à haut seuil d'activation (à

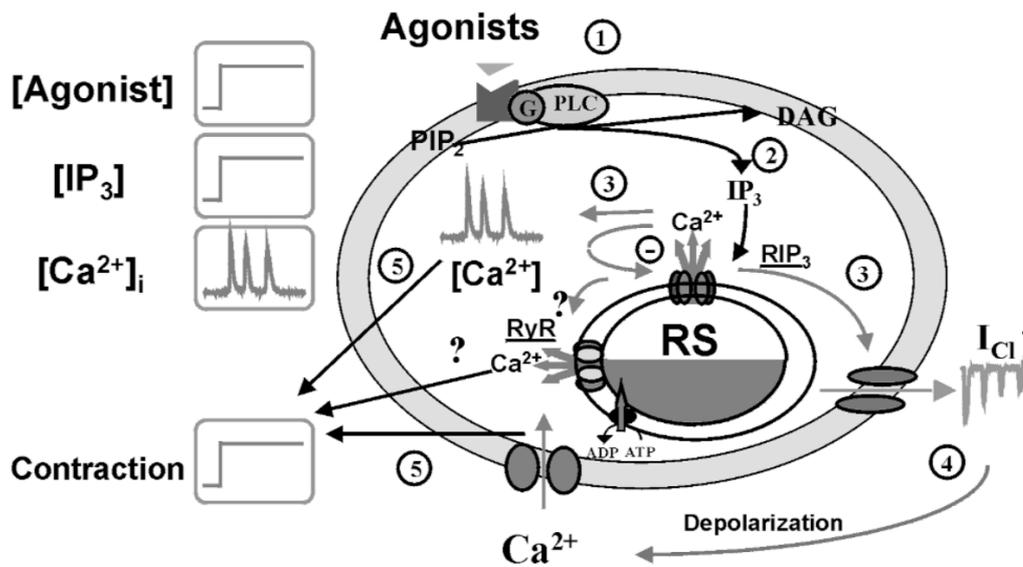


Figure 16 : Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation modulant la concentration en Ca²⁺ intracellulaire.

(d'après Savineau et al. *News Physiol Sci* ; 2000²²⁶).

Une activation de la PLC (1) engendre la production d'IP₃ à partir du PIP₂ (2). L'IP₃ va se fixer sur ces récepteurs situés sur le réticulum sarcoplasmique entraînant une libération calcique (3). Cette libération de Ca²⁺ provoque l'activation de canaux Cl⁻ (4) ou/et l'activation de canaux calciques. Tout cela engendre une oscillation du Ca²⁺ intracellulaire (5) conduisant à la contraction des CMLs.

partir de -40mV)^{210,212}. Les canaux calciques forment des pores permettant le passage rapide et sélectif d'ions Ca^{2+} au travers de la membrane plasmique. Lors d'une dépolarisation membranaire induite par de nombreux agonistes, les canaux Ca^{2+} s'ouvrent, laissant traverser les ions Ca^{2+} selon le gradient de concentration. Dans la mesure où les ions Ca^{2+} sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule, l'ouverture des canaux calciques entraîne donc un influx d'ions augmentant la concentration intracellulaire. Cette dépolarisation résulte soit d'une inhibition des canaux K^+ et/ou d'une activation des canaux Cl^- ²¹³⁻²¹⁵, soit d'une activation de canaux cationiques non-sélectifs^{216,217}.

III.5.1.2- Les canaux cationiques non-sélectifs et les CRACs

L'influx calcique dans la cellule peut aussi être médié par des canaux calciques insensibles aux inhibiteurs des canaux calciques dépendants du voltage. Parmi ces canaux se trouvent les canaux Ca^{2+} de type non-L et les CRACs^{218,219}. Ces canaux cationiques non-sélectifs jouent un rôle primordial dans l'influx de Ca^{2+} , induit par des stimuli pharmacologiques capables d'engendrer la production de facteurs vasoactifs tels que la sérotonine, l'ATP ou l'endothéline-1. Ces canaux peuvent aussi être activés par des agents induisant la vidange des stocks calciques intracellulaires.

III.5.1.3- Le réticulum sarcoplasmique : une réserve calcique

L'activation de récepteurs membranaires, couplés à certaines isoformes de phospholipase C (PLC) via des protéines G trimériques de type Gq, induit la production de l'IP3 (Inositol 1,4,5-triphosphate) et du diacylglycérol (DAG). Ces deux éléments sont générés à partir de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) membranaire par la PLC β ou γ . L'IP3 diffuse dans le cytoplasme afin d'aller se fixer sur des récepteurs spécifiques situés au niveau du réticulum sarcoplasmique²²⁰⁻²²². Ces récepteurs sont constitués de quatre sous-unités liées entre elles par des liaisons non-covalentes^{223,224}. Une séquence présente sur la partie C- terminale du récepteur à l'IP3 lui confère la fonction de canal Ca^{2+} . Ainsi, la fixation de l'IP3 sur son récepteur provoque un changement de conformation qui induit une augmentation de sa probabilité d'ouverture. Le Ca^{2+} libéré va permettre l'activation de canaux chlore dépendants du Ca^{2+} , engendrant un courant sortant de Cl^- , provoquant l'amplification de la dépolarisation et l'activation des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage. Ces récepteurs à l'IP3 sont régulés par la concentration en Ca^{2+} intracellulaire mais aussi par leur état de phosphorylation. En effet, lors d'une faible élévation de Ca^{2+} (<300 nM), l'affinité du récepteur pour l'IP3 augmente fortement, potentialisant donc l'ouverture des canaux²²⁵. A l'inverse, lorsque la concentration calcique cytosolique dépasse les 700 nM, la conductance pour le Ca^{2+} décroît. Il y a donc une oscillation de la libération du Ca^{2+} sarcoplasmique²²⁶ (Figure 16).

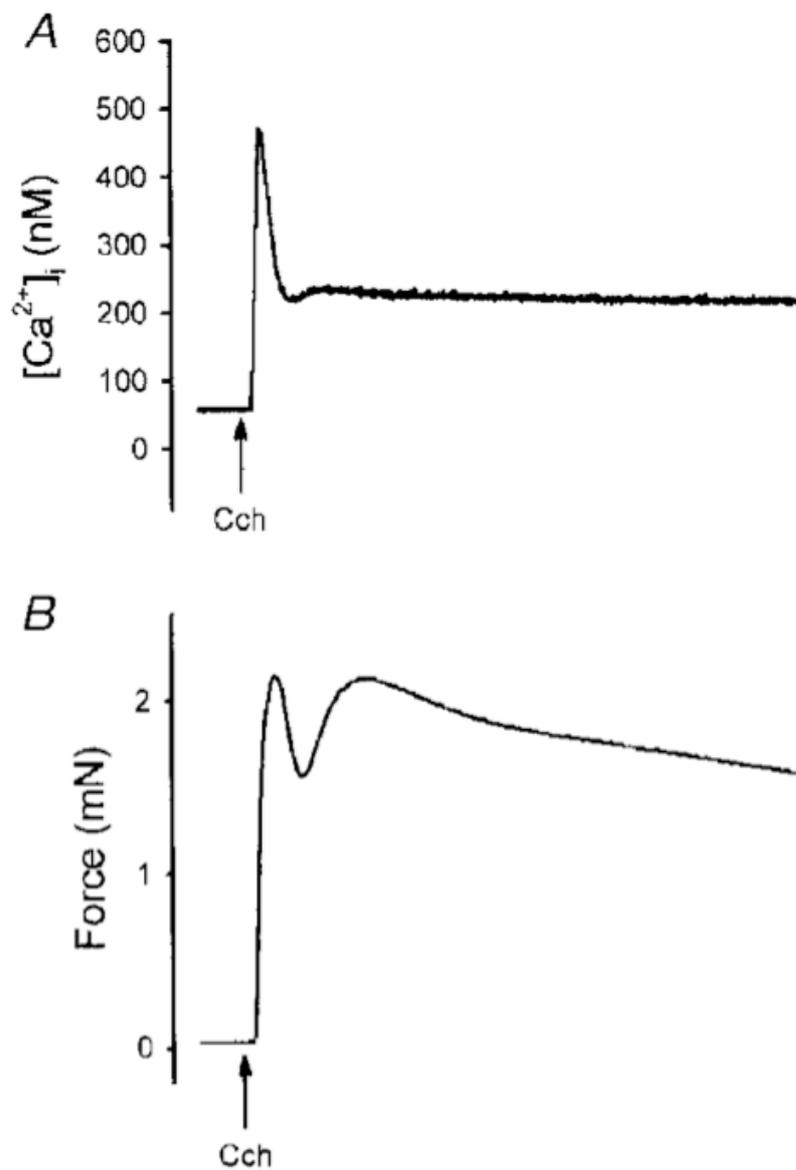


Figure 17 : Enregistrements simultanés de la contraction et de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire lors d'une stimulation au carbachol.

(d'après Sward et al. J of Physiol ; 2000²²⁷)

Mesures faites au niveau de l'iléon de cochon d'inde stimulé par du carbachol (Cch)

A : Concentration en Ca^{2+} intracellulaire.

B : Mesure de la tension exercée par le muscle.

L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire permet la formation du complexe Ca^{2+} /calmoduline et son association avec la MLCK entraînant l'activation de celle-ci et donc la contraction des CMLs.

⇒ Le Ca^{2+} intracellulaire apparaît donc comme un régulateur primordiale de la contraction. Il existe une corrélation entre l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et la phase ascendante de la contraction²²⁷ (Figure 17). Cependant, au niveau des CMLs, la baisse du taux de Ca^{2+} intracellulaire n'induit pas une relaxation immédiate. La contraction est maintenue malgré la diminution de la concentration en Ca^{2+} se stabilisant à 200 nm ce qui normalement est insuffisant pour induire une contraction maximale. Cette particularité est liée à la fonction des tissus musculaires lisses qui doivent être capables d'assurer des contractions musculaires prolongées. Une étude a montré que l'activation des récepteurs au thromboxane A2 induit une contraction plus élevée que celle induite par une dépolarisation (solution riche en potassium) en nécessitant une concentration en Ca^{2+} intracellulaire plus faible²²⁸. Cela implique donc l'existence d'une autre voie de signalisation indépendante du Ca^{2+} permettant la contraction en présence d'une faible quantité de Ca^{2+} . Cette voie consiste à une sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile.

III.5.2- Sensibilisation au calcium de l'appareil contractile

Ce phénomène est lui aussi induit par l'activation des RCPG et vient s'associer à l'augmentation de Ca^{2+} . Ainsi, pour une concentration calcique constante, la voie de sensibilisation au Ca^{2+} permet une augmentation de l'intensité de la contraction²²⁹. Ce mécanisme repose sur l'inhibition de la MLCP²³⁰ dont l'activité peut être contrôlée par différentes voies de signalisation (Figure 18) telle que la voie de la Rho-kinase activée par la petite protéine G RhoA.

Des études de Walsh²³¹ et de Jensen²³² ont montré que des activateurs de cPKC et de nPKC étaient capables de générer une contraction des CMLs avec une concentration constante de Ca^{2+} intracellulaire. Cette sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile implique également une inhibition de la MLCP. L'addition d'une forme constitutivement active de PKC sur des fibres musculaires lisses de veines portes de lapin perméabilisées à la β -escine permet la contraction des CMLs avec une augmentation du taux de MLC_{20} phosphorylée corrélée à une inhibition de l'activité de la MLCP²³³.

De plus, l'activation des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplé à la protéine Gq, entraîne la production de DAG et l'activation de la PKC. L'équipe de Nakano²³⁴ a montré que la PKC peut directement phosphoryler la MLCP au niveau de la Thr695 ce qui a pour conséquence de l'inactiver. La PKC peut inhiber la MLCP d'une autre manière plus indirecte en prenant pour

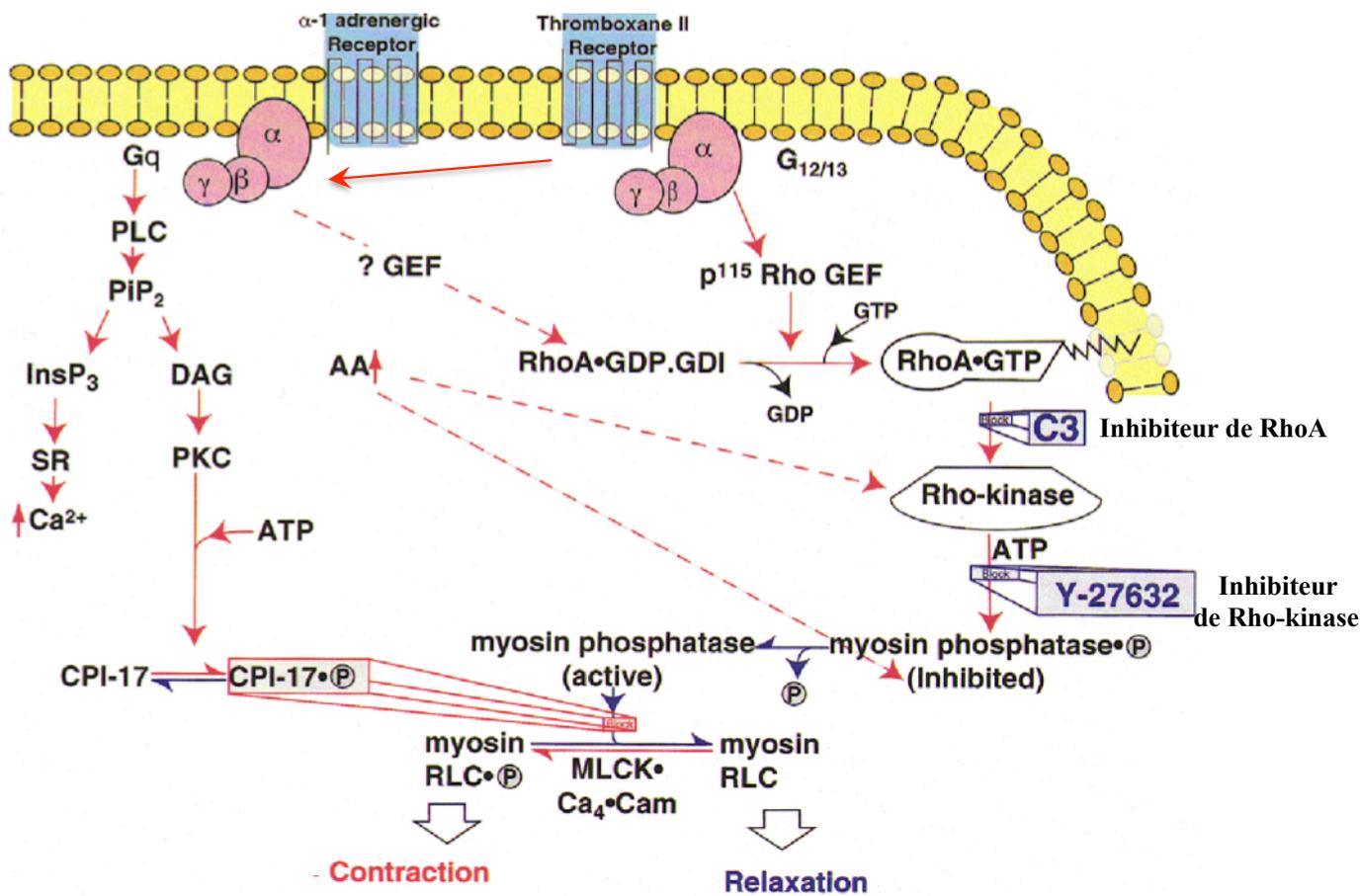


Figure 18 : Schéma simplifié des voies de signalisation intervenant dans la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile.
 (d'après Somlyo et al. *J. Physiol.*, 2000¹⁹⁴)

cible une protéine de 17 kDa, la CPI-17²³⁵. La phosphorylation du résidu Thr38 de cette protéine par la PKC entraîne son activation et sa fixation sur le sous-unité PP-1C de la MLCP. La CPI-17 diminue alors de 1000 fois l'activité phosphatase et l'interaction de la MLCP avec la myosine²³⁶. La cinétique de contraction induite par des activateurs de la PKC, tels que les esters de phorbol, est corrélée avec la cinétique de phosphorylation de la Thr38 de la CPI-17²³⁷. Récemment, il a été montré que suite à une stimulation par de la phényléphrine, la voie de la kinase Raf-1, activée par la PKC, induit une sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile en phosphorylant MYPT1²³⁸.

L'acide arachidonique (AA) participerait également de différentes manières au phénomène de sensibilisation au Ca^{2+} . Cet acide gras peut agir sur la phosphorylation de la CPI-17 en activant directement certaines PKC²³⁹. D'autre part, l'AA interagit avec MYPT et provoque la dissociation et l'inhibition de la MLCP. Il est aussi capable de stimuler directement l'activité de la rho-kinase sans l'intervention de RhoA²⁴⁰. La synthèse et le maintien du taux d'AA dans les CMLs implique l'activation de la phospholipase A2 indépendante du Ca^{2+} ²⁴¹. Cette voie ne semble pas être essentielle dans la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile mais elle permettrait le renforcement de la voie des PKCs ou de Rho/Rho-kinase.

Il a été décrit que l'expression de CPI-17 est beaucoup plus élevée dans le muscle lisse de type tonique que dans le muscle lisse phasique²⁴². Donc, en fonction du type de muscle, cette voie de signalisation est plus où moins présente dans la contraction des CMLs²⁴³. Ce qui peut expliquer en partie la capacité qu'un muscle tonique a pour maintenir la contraction après la diminution du Ca^{2+} intracellulaire, alors que le muscle phasique se relaxera.

Pour finir, comme nous avons pu le voir précédemment (paragraphe III.2.2.3a), le récepteur au TxA2 est couplé à la fois à une protéine G_q et aux protéines $G_{12/13}$, alors que le récepteur α_1 adrénergique n'est couplé qu'à la protéine G_q ¹²⁵. Donc dans le cas d'une contraction au TxA2, en plus des voies activées dans le cas de la phényléphrine, il existe une deuxième voie de sensibilisation de l'appareil contractile passant par la protéine $G_{12/13}$, qui induit l'activation de la Rho-kinase et donc l'inhibition de la MLCP. Ce qui explique qu'en pratique, on observe une contraction plus importante et plus stable lors d'une stimulation avec du thromboxane A2 qu'avec de la phényléphrine.

⇒ Les protéines de signalisation ont donc un rôle primordial dans le développement et la modulation de la contraction des cellules musculaires lisses. La diversité de ces protéines permet à ces cellules d'élaborer une réponse spécifique au stimulus. Selon le stimulus, le signal peut atteindre le noyau et engendrer une réponse génomique adéquate. Une des cibles de voies de signalisation, telles que celle de la MAPK p38, est le facteur de réponse au sérum (SRF)¹⁶⁸.

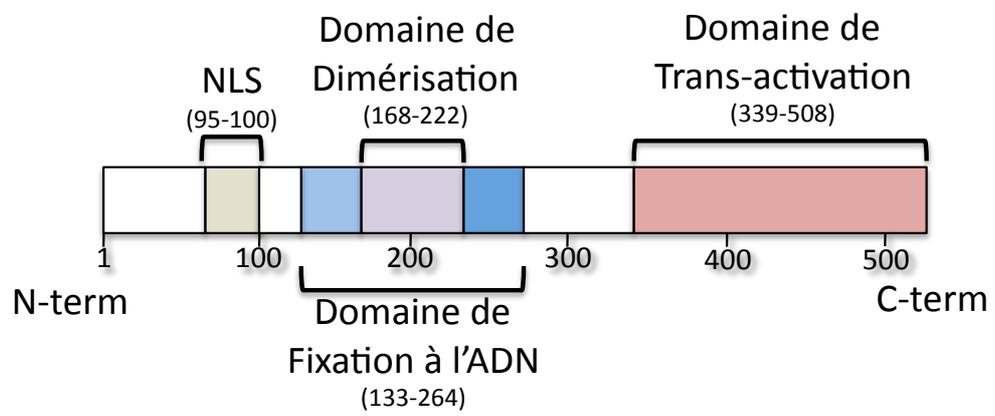


Figure 19 : Schéma de la séquence codant pour SRF.

IV- Le facteur de réponse au sérum (SRF)

IV.1- Présentation

SRF est une phosphoglycoprotéine nucléaire de 67kDa, caractérisée en 1987 par le Dr Treisman²⁴⁴. C'est un facteur de transcription capable d'activer des gènes impliqués dans la réponse de prolifération au sérum. SRF agit également sur l'expression de gènes spécifiques de la différenciation des cellules musculaires squelettiques, cardiaques et lisses. Il est important dans la régulation de la transcription génique au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires²⁴⁵.

Cette protéine ubiquitaire, et phylogénétiquement conservée, appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine MADS (Mcm 1 chez la levure, Adamous et Deficiens chez les plantes et SRF chez les animaux)²⁴⁶ incluant aussi les facteurs MEF-2. La partie C-terminale de ce motif MADS permet à SRF de s'homodimériser alors que la partie N-terminale permet sa fixation à l'ADN au niveau des boîtes CArG²⁴⁴. Le site de fixation de SRF à l'ADN est localisé entre les acides aminés 133 à 264 (Figure 19). Les résidus 168-222 englobent le domaine de dimérisation et, en dehors de ces régions, au niveau de la séquence 95-100, se situe un domaine NLS (Nuclear Localization Signal)²⁴⁷. Un domaine de transactivation dans la partie C-terminale (acides aminés 339-508) permet aux dimères de SRF de se fixer sur les sites CArG présents sur l'ADN, et d'y former des complexes multiprotéiques fonctionnels avec d'autres facteurs de transcription, des co-activateurs et des co-répresseurs.

L'expression de la majorité des gènes des CMLs est régulée par la présence de boîtes CArG dans leurs séquences régulatrices. La boîte CArG est une séquence de dix paires de bases (pb) de consensus [CC(A/T)6GG]. Elle est présente dans les régions promotrices des gènes spécifiques du muscle, comme par exemple l'actine, la caldesmone, la calponine, la sm22 et la dystrophine²⁴⁸, et dans la séquence SRE (Serum Response Element) de 23 pb, cible de SRF, en amont de gènes tels que *egr-1*, *junB*, le récepteur à l'interleukine-2 ou *c-fos*^{244,249}. La boîte CArG se révèle être un élément de régulation commun et essentiel dans l'expression génique au niveau des CMLs artérielles.

IV.2- Régulation de SRF

IV.2.1- Généralités

Dans les CMLs, l'activité de SRF est régulée à différents niveaux. Le domaine MADS est sujet à différents mécanismes de phosphorylation qui modifient l'affinité de SRF pour le site

CAR^G²⁵⁰. De plus, SRF présente lui même de nombreux sites de phosphorylation, et il est la cible de diverses kinases²⁵¹⁻²⁵³. Les CaMKinases II et IV phosphorylent SRF au niveau de la sérine 103. In vitro, ce résidu peut aussi être modifié par la voie p38 via la kinase SAPK2 (Stress-Activated Protein Kinase-2)¹⁶⁸. Certaines études montrent que l'activité du site de fixation à l'ADN augmente avec sa phosphorylation par la caséine kinase II²⁵⁴. Ces phosphorylations n'affectent pas la dimérisation de SRF et ne masquent pas le site de fixation à l'ADN, mais elles entraînent un changement de conformation de sa région de fixation à l'ADN²⁵⁵. Il a été montré très récemment que la phosphorylation de SRF par la PKA, au niveau du site T159, inhibe sa fixation sur l'ADN et, par conséquent, la transcription de gènes spécifiques des cellules musculaires lisses, montrant ainsi un autre mécanisme de contrôle du phénotype de ces cellules²⁵⁶.

La localisation subcellulaire de SRF entre le cytoplasme et le noyau est un élément déterminant de son activité. Des études sur des cultures de myocytes des voies aériennes montrent que l'expression de gènes spécifiques du muscle lisse est contrôlée par la localisation subcellulaire de SRF²⁵⁷ et que la voie RhoA/RhoKinase influence la localisation de SRF via son effet sur la polymérisation de l'actine²⁵⁸.

Des travaux ont également montré la génération de formes tronquées du domaine de transactivation en C-terminal de SRF par épissage alternatif. Ces formes de SRF peuvent fonctionner comme des transdominants négatifs en s'hétérodimérisant avec SRF, ou en entrant en compétition avec celui-ci pour la fixation sur les boîtes CAR^G²⁵⁹.

La présence de sites CAR^G en amont du promoteur de SRF permet son autorégulation²⁶⁰ ainsi que son interaction avec différents cofacteurs le régulant. Ces cofacteurs, qui varient selon le type cellulaire, selon l'état de différenciation mais aussi en fonction de la structure de chaque promoteur, régulent l'activité de SRF.

IV.2.2- Les cofacteurs

SRF interagit avec de nombreux autres facteurs de transcription qui diffèrent selon le promoteur et le contexte cellulaire. L'élément SRE (Serum Response Element), présent au niveau du promoteur du gène c-fos, possède à la fois une boîte CAR^G mais aussi un site GGAT à 2pb en 5' de la CAR^G. Ce site GGAT est reconnu par les facteurs Elk1, SAP-1a et Net/SAP2/erp de la famille des Ets. Ces facteurs ont ainsi la possibilité d'interagir avec le site MADS de SRF via leur domaine en boîte B formant alors un complexe dit tertiaire, en opposition au complexe binaire formé par la liaison de SRF à l'ADN²⁶¹. La variété des voies de signalisation conduisant à l'activation de ces cofacteurs constitue un niveau de diversité/complexité supplémentaire dans l'activation de SRF.

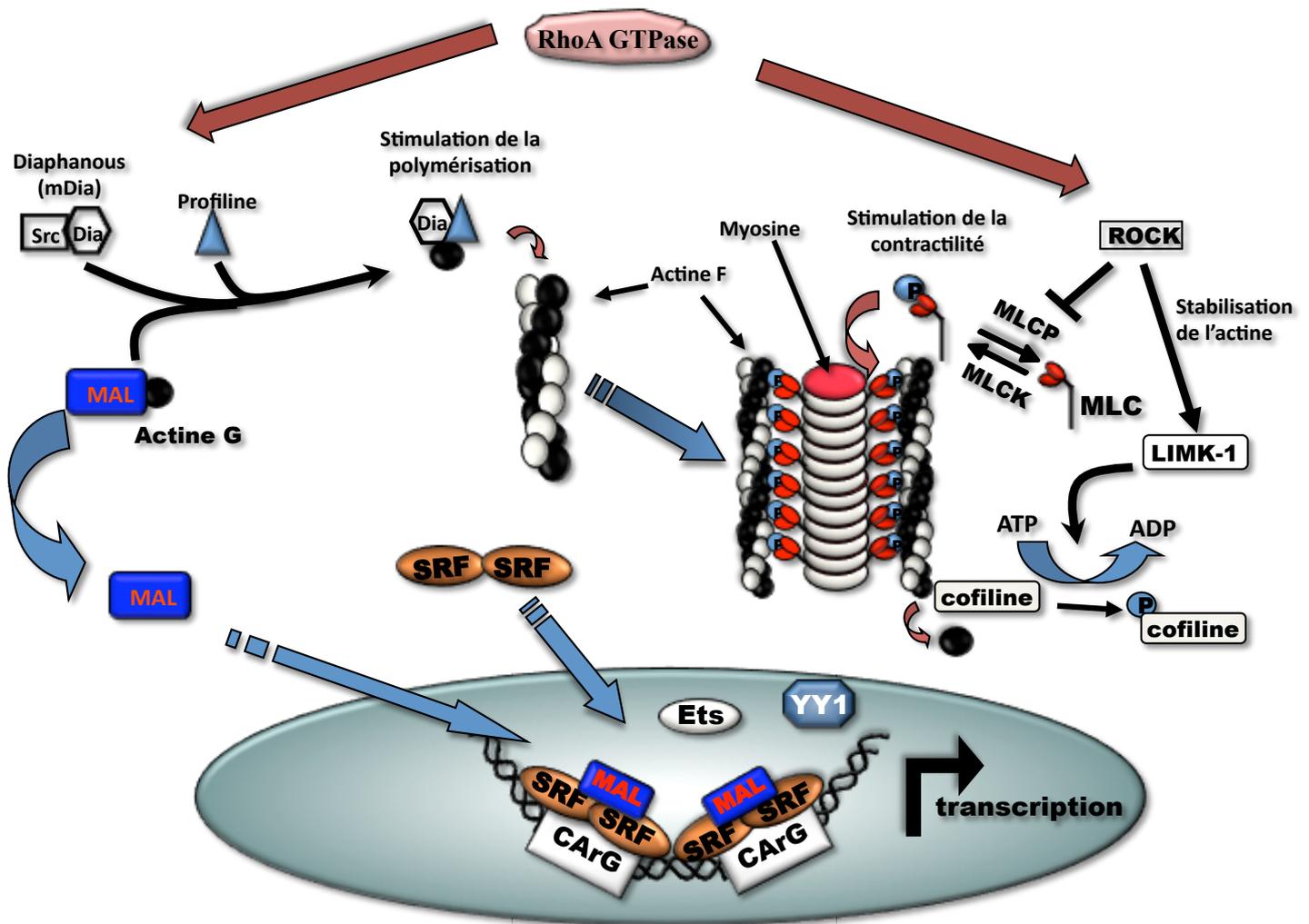


Figure 20 : Intervention de la voie RhoA et de la polymérisation dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de SRF.

L'activation de la voie RhoA stimule la polymérisation de l'actine. Ce mécanisme stimule la translocation de SRF et de son cofacteur MAL (MRTFA/B) dans le noyau. Une fois dans le noyau, SRF va aller se fixer sur les boîtes CArG et induire la transcription. Son activité transcriptionnelle est stimulée par la fixation de MAL qui engendre le décrochage d'éléments tels que Ets et YY1 qui inhibent la transcription.

Dans le cas de c-fos, l'activation de la voie des MAPKs par le sérum et les facteurs de croissance induit la phosphorylation des facteurs de transcription Ets, pouvant ainsi former les complexes ternaires avec SRF et induire l'expression des gènes en quelques minutes.

La fixation de SRF sur sa séquence d'ADN peut être le point de convergence de différentes voies de signalisation. SRF contrôle l'expression de gènes codants pour de nombreux éléments du cytosquelette^{262,263} et représente un lien entre le cytosquelette et la transcription génique. La polymérisation de l'actine stimule l'activité de SRF au niveau des cellules musculaires lisses en réduisant l'effet du facteur YY1 (Yin Yang 1), qui est en compétition avec SRF dans la fixation à l'ADN²⁶⁴. La polymérisation de l'actine contrôle la localisation d'YY1. Cependant cette régulation est importante car en absence de dépolymérisation de l'actine, YY1 n'est plus transloqué dans le noyau et donc ne régule plus SRF ce qui empêche le maintien d'une différenciation et d'une prolifération cellulaire normale. Cela peut contribuer au développement de l'hypertension pulmonaire²⁶⁵.

Il est établi que la voie de la protéine G monomérique RhoA joue un rôle déterminant dans l'activation transcriptionnelle des gènes de structure^{149,266}. En effet, la stimulation de la polymérisation de l'actine par RhoA, via des effecteurs tels que Diaphanous (mDia), Rho-Kinase et LIMK, stimule aussi l'activité transcriptionnelle de SRF au niveau de gènes tels que celui de l'actine β . Cela suggère que des mécanismes tels que la formation de fibres de stress ou bien l'activité migratoire, nécessitant la polymérisation de l'actine, renforce ainsi la synthèse d'ARN messenger de l'actine β . Ce mécanisme de rétrocontrôle positif fait intervenir un co-facteur de SRF, MAL (MRTFA/B) fixé à l'actine globulaire G. Lorsque la voie RhoA active la polymérisation et que l'actine G incorpore l'actine F, il y a un décrochage de ce co-facteur qui est alors internalisé dans le noyau où il interagit avec SRF (Figure 20). Un rôle direct de l'actine nucléaire est aussi envisagé²⁶⁷. Ce mécanisme décrit dans le cœur a été confirmé au niveau des CMLs et stimule l'expression des gènes du muscle lisse^{146,268}.

Au niveau du muscle lisse, outre MRTF A et B aussi appelé MKL1 et 2, c'est le facteur myocardine, appartenant à cette même famille (présent en grande quantité dans le cœur et les CMLVs) qui est décrit pour l'instant comme le plus puissant activateur de l'expression génique et comme un cofacteur essentiel de SRF²⁶⁹. La myocardine est constitutivement nucléaire car contrairement à MRTFA/B, elle n'est pas liée à l'actine G cytoplasmique. Le rôle de co-facteur de la myocardine est en partie régulé par la PKG. La PKG stimule l'expression de la myocardine favorisant ainsi le couplage myocardine/SRF et modulant la transcription des gènes des CMLs²⁷⁰.

IV.3- Implication de SRF dans des pathologies

IV.3.1- La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par le déclin progressif de la cognition et des processus de neurodégénérescence chronique, associés à la dysfonction neurovasculaire^{271,272}. Dans la maladie d'Alzheimer, il a été montré que l'angiopathie cérébrale contribue au déclin cognitif et à la démence par la réduction et la dérégulation des débits sanguins cérébraux. L'hypoperfusion artérielle et la dérégulation des flux sanguins peuvent précéder une atrophie cérébrale et une accumulation de β amyloïdes (neurotoxine d'alzheimer) chez des modèles animaux^{273,274} et chez l'humain^{275,276}. Les bases moléculaires et cellulaires de l'artériopathie d'Alzheimer sont peu connues. Cependant, il a été montré qu'au niveau de CMLVs issues d'artères cérébrales de patients malades, SRF et la myocardine présentent un niveau d'expression anormalement élevé. Cette surexpression au niveau de CMLVs entraîne une hypercontractilité et, par conséquent, une hypoperfusion cérébrale et cela indépendamment des peptides β amyloïdes²⁷⁷. Cela est accompagné d'une augmentation de protéines contractiles telles que la chaîne lourde de la myosine, l'actine et la calponine, qui peuvent aussi contribuer à l'hypercontractilité associée aux modifications d'expression des protéines de structure²⁷⁷. La surexpression de SRF et de la myocardine dans les CMLVs cérébrales renforce le phénotype d'hypercontractilité via la surexpression de gènes régulant l'homéostasie calcique, tels que la MLCK et l'ATPase calcique 2 du réticulum sarcoplasmique. De plus, l'activité élevée de SRF et de la myocardine diminue la clairance des β amyloïdes au niveau des tissus cérébraux, ce qui provoque leur accumulation et une hypoperfusion artérielle cérébrale²⁷⁸.

IV.3.2- Le vieillissement

Le niveau de phosphorylation de SRF varie en fonction de l'âge. Une étude a montré qu'il y a une diminution de la capacité de SRF à se fixer à l'ADN au niveau des fibroblastes sénescents, en comparaison avec les jeunes cellules²⁷⁹. Cela pourrait être dû à la présence d'une forme hyperphosphorylée de SRF dans les cellules âgées.

Le vieillissement est associé à une perte progressive de la masse musculaire ainsi qu'à une augmentation de l'adipose et de la fibrose. Au niveau moléculaire, le vieillissement est connu pour altérer l'expression d'une grande variété de gènes. Cependant, les effecteurs intervenants dans ce phénomène n'ont pas été élucidés. Néanmoins, une étude a montré qu'une régulation négative naturelle de SRF précède et contribue au vieillissement du muscle squelettique. Effectivement, la perte de SRF au niveau des muscles squelettiques de souris mutantes entraîne une accélération du processus de vieillissement musculaire²⁸⁰. Dans les muscles squelettiques de souris âgées, l'atrophie

du muscle observée dans le vieillissement peut être expliquée par une diminution de l'expression de SRF et de l'accumulation nucléaire du cofacteur MRTFA. Cela étant accompagné de la présence d'amas de RhoA et de RhoGDI au niveau cytoplasmique et membranaire²⁸¹.

IV.3.3- La différenciation cellulaire

SRF intervient dans les processus de transformation de cellules de différentes origines. Une étude comparant des tissus néoplasiques et des tissus normaux montre que le potentiel pathologique des CMLs est corrélé à une disparition de SM- γ -actin. Cette étude montre aussi une différence de fixation d'un complexe formé entre autres par SRF et MEF-2²⁸², associée à un changement de l'accessibilité de SRF durant la transformation néoplasique. D'autres travaux ont montré que des cellules épithéliales tumorales présentent une augmentation de la quantité et de l'activité de SRF. Cette augmentation est à la fois due à une augmentation d'expression de SRF lui-même, de la vinculine et de l'actine, ainsi que de tous les gènes dépendants de SRF. Ces changements dépendent de la voie RhoA²⁸³. La distamycine A, qui est utilisée comme anticancéreux, interfère dans la fixation de SRF en modifiant la conformation de l'ADN par sa fixation sur des sites riches en A/T²⁸⁴.

Dans le cas d'une hypoxie, l'activité de la PKG, qui régule l'expression de la myocardine, est diminuée et cela entraîne une diminution de l'expression de la myocardine et une augmentation de celle de Elk-1, qui est une protéine entrant en compétition avec la myocardine pour l'association avec SRF²⁷⁰. L'association de SRF avec Elk-1 phosphorylée entraîne l'expression de gènes de la croissance cellulaire^{285,286}. Ainsi dans un cas d'hypoxie, cette inhibition de la PKG entraîne un changement de phénotype des CMLs passant d'un état contractile à un état prolifératif²⁷⁰.

IV.3.4- Les dysfonctions musculaires

IV.3.4.1- Le muscle cardiaque

Beaucoup de gènes régulés par SRF varient durant le développement normal mais également durant l'hypertrophie du cœur. Cela suggère que SRF joue un rôle important dans le maintien de la structure et de la contractilité cardiaque. Une étude a montré que la surexpression de SRF au niveau du cœur de jeunes souris, en absence d'autres stimuli, provoque une hypertrophie cardiaque, une fibrose, une cardiomyopathie et une mort prématurée²⁸⁷.

De plus, chez des animaux, la surexpression au niveau cardiaque d'un mutant de SRF incapable de se fixer à l'ADN, ou de transactiver la transcription, provoque le développement d'une

cardiomyopathie dilatée précoce et sévère avec une fibrose. Ces animaux meurent prématurément au bout de 2 semaines²⁸⁸.

Un modèle d'inactivation en mosaïque de SRF chez la souris a montré que la juxtaposition de cardiomyocytes possédant le SRF sauvage et fonctionnel avec d'autres exprimant un mutant défectueux, provoque une hétérogénéité du myocarde délétaire. Chez ces animaux, les cardiomyocytes déficients en SRF s'affinent et s'allongent alors que ceux qui expriment SRF deviennent hypertrophiques. SRF intervient donc dans le remodelage structural et la fonction contractile des cardiomyocytes en réponse à leur environnement local. Cela suggère que SRF jouerait un rôle dans les pathologies caractérisées par des altérations locales de la fonction ventriculaire cardiaque²⁸⁹.

IV.3.4.2- Le muscle lisse

La présence d'une insertion au niveau du promoteur adjacent à la boîte CARG a été identifiée chez des rats SHR (rats spontanément hypertendus)²⁹⁰. Cela entraîne une augmentation de la fixation de SRF au niveau du promoteur du gène smMLCK stimulant l'activité des gènes dépendants de SRF. Il en résulte une augmentation de l'expression de la MLCK et de l'état de phosphorylation de la MLC à l'origine de l'hypertension. La surexpression d'un mutant dominant négatif chez des rats hypertendus bloque l'augmentation de la MLCK engendrée par l'hypertension. L'inhibition de la voie RhoA n'a aucun effet sur l'augmentation d'expression de la MLCK induite par SRF, alors que c'est le cas lors d'un blocage de la voie Ras. Cela montre donc que RhoA et Ras interviennent selon deux voies indépendantes²⁹⁰, aboutissant à l'augmentation de la phosphorylation de la MLC. La voie Ras stimule la phosphorylation de la myosine en ciblant la MLCK via SRF, alors que la voie RhoA bloque sa déphosphorylation en inhibant la MLCP¹³⁹.

Dans un modèle murin de Knock-out inductible, l'extinction spécifique de SRF au niveau des CMLs provoque le développement d'un désordre sévère ressemblant à la pseudo-obstruction intestinale chronique rencontrée chez l'homme. Cela illustre clairement le rôle important de SRF dans le maintien de la fonction contractile du muscle lisse viscéral chez l'adulte²⁹¹.

Le rôle de SRF n'a pas été étudié au niveau de la microcirculation. Or sa position en amont d'une protéine clé dans la contraction telle que RhoA, ainsi que son effet sur des protéines du cytosquelette ou de la contraction, font de ce facteur de transcription un bon candidat dans la régulation de la réactivité vasculaire.

⇒ La contractilité des différentes artères est liée à l'activation de différents récepteurs. Cependant, au niveau des artères de résistance, la réactivité vasculaire est aussi caractérisée par l'existence d'une réponse à des stimuli mécaniques tels que des variations de pression ou de flux. Cette propriété, appelée mécanotransduction au flux et à la pression, tient une place importante dans la microcirculation. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la réponse à une augmentation de pression qu'est le tonus myogénique.

V- Le Tonus Myogénique : une adaptation rapide à une variation de pression

V.1- La microcirculation et le flux sanguin : Généralités

Lorsque le cœur se contracte, il génère une énergie potentielle sous forme de pression sanguine dans les artères. Celle-ci s'exprime en millimètres de mercure (mmHg). Elle dépend des résistances périphériques à l'écoulement sanguin généré par la contraction cardiaque. La pression sanguine résulte du produit du débit cardiaque par les résistances périphériques. Le débit cardiaque varie peu, ce sont les résistances périphériques qui modulent le niveau de pression sanguine. Les résistances périphériques dépendent du tonus vasomoteurs des CMLs qui va modifier les dimensions artériolaires et donc, selon la loi de Poiseuille, réguler le niveau de pression sanguine. Les artères de conductance interviennent moins que les artères de résistance dans la régulation de la pression sanguine. Elles le font par le biais de la rigidité de leur paroi qui dépend, elle aussi, de la contraction des CMLs. Ainsi, la pression sanguine dépend essentiellement du tonus contractile des CMLs artérielles.

Les artères de petit diamètre (inférieur à 200 μ m), étant responsables d'une grande partie des résistances vasculaires périphériques, sont appelées artères de résistance. Ces artères possèdent un tonus vasoconstricteur permanent leur permettant de se contracter, de se dilater et donc de contrôler finement les flux sanguins locaux. Le tonus microvasculaire est contrôlé par le système nerveux, le système hormonal local et circulant, les besoins métaboliques des tissus environnants ainsi que par des facteurs mécaniques. Les principaux facteurs mécaniques influençant le tonus micro-vasculaire sont la pression et le flux. Lorsqu'une augmentation de pression est perçue par le vaisseau, celui-ci réagit sous la forme d'une contraction appelée le tonus myogénique (TM), alors qu'une augmentation du flux, entraînant une hausse des forces de cisaillement (shear stress), induira une vasodilatation plus communément appelée dilatation flux-dépendante (sujet que je ne développerai pas dans cette étude). Ces deux mécanismes permettent une régulation rapide et efficace des débits sanguins locaux.

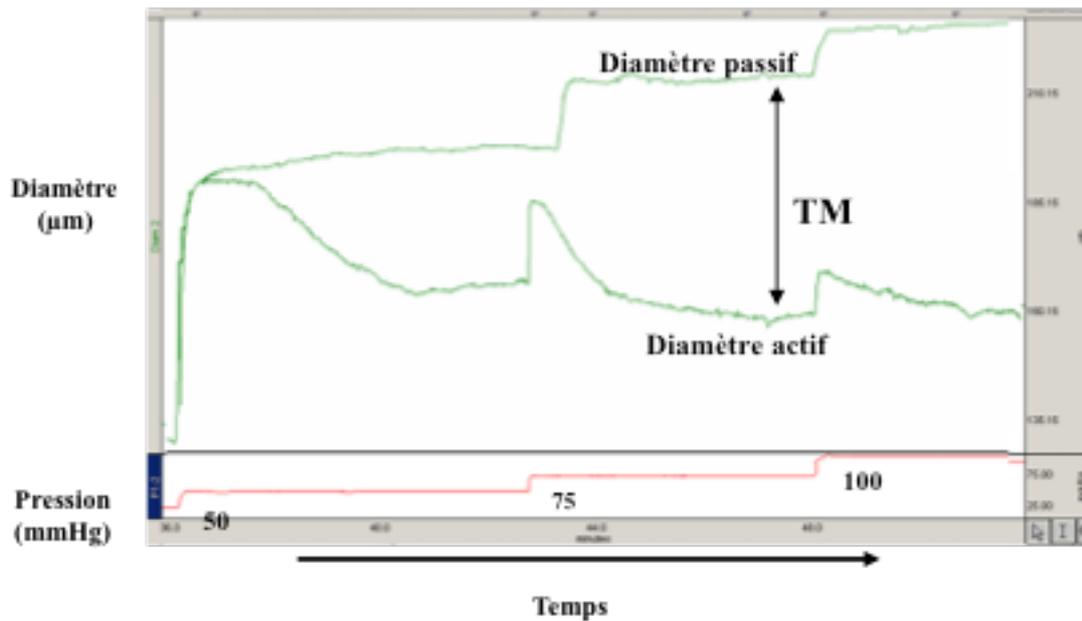


Figure 21A : Enregistrements typiques de la réponse d'un vaisseau mésentérique de résistance à une augmentation de pression.

Pour des pressions >50 mmHg, les variations de pression successives entraînent une baisse de diamètre artériel (flux nul). Par exemple, le passage d'une pression de 50 mmHg à 75 mmHg, diminue le diamètre de 12 micromètres. Pour finir on soumet le même vaisseau aux mêmes paliers de pression, mais en présence d'une solution physiologique sans calcium + EGTA + SNP + papavérine, le diamètre ainsi mesuré est le "diamètre passif". Le tonus myogénique (TM) du vaisseau est quantifié comme étant la différence entre le diamètre actif et le diamètre passif. Les 2 tracés ont été obtenus en séquence et superposés ensuite.

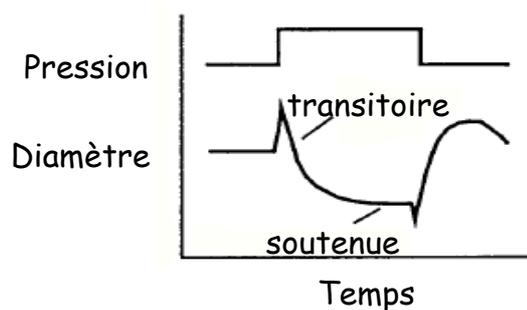


Figure 21B : Réponse myogénique d'artérioles. (selon Davis M.J. et Hill M.A.³⁰¹)

V.2- Le tonus myogénique : Définition

En 1902, W.M. Bayliss a mis en évidence pour la première fois l'existence d'une réponse vasculaire locale suite à une augmentation de la pression intraluminale, la réponse myogénique²⁹². En 1949, Folkow a montré que ce tonus vasculaire est un mécanisme non neuronal puisqu'il persiste au niveau des vaisseaux dénervés²⁹³. Les acteurs de cette réponse myogénique sont les CMLs, et cela indépendamment des influences neuronales, métaboliques, ou hormonales. Une relation inverse existe entre le diamètre des vaisseaux et l'intensité du TM. Plus les vaisseaux sont petits et plus le TM est élevé²⁹⁴, bien qu'il puisse y avoir une exception dans le cas des vaisseaux cérébraux²⁹⁵. Le développement d'un TM s'observe surtout dans des vaisseaux d'un diamètre inférieur à 300µm. In vitro, le TM peut être maintenu pendant plusieurs heures car les conditions de pression et de flux sont le plus souvent statiques, ce qui entraîne une désensibilisation. In vivo, en revanche, les variations de pression et de flux sont permanentes et les réponses myogéniques constamment stimulées.

Le TM se développe dans les secondes qui suivent l'augmentation de la pression intravasculaire (Figure 21A). La réponse myogénique se caractérise par une distension initiale, passive, suivie de deux phases de contraction, l'une transitoire et l'autre soutenue (Figure 21B). Ainsi dans le cas d'un changement de posture par exemple, où la pression artérielle varie, la réponse myogénique contribue au maintien de la pression hydrostatique au même titre que le tonus sympathique et le baroreflexe.

Au niveau tissulaire, les variations brusques de la pression artérielle entraînent des variations immédiates du débit sanguin. Or il existe un mécanisme d'autorégulation du débit sanguin permettant de maintenir un débit sanguin stable en dépit des importants changements de la pression artérielle. Cette régulation peut être métabolique et myogénique. Le TM permet ainsi une protection des capillaires contre les augmentations excessives de la pression sanguine. Autrement dit, si la pression dans les petites artères et artérioles s'élève de trop, ces vaisseaux permettront d'amortir cette augmentation de pression et empêcheront donc une transmission de la pression élevée aux capillaires. Cela permet d'éviter une éventuelle rupture de ces derniers car leur paroi, constituée exclusivement d'intima et dépourvue de cellules musculaires, ne leur permet pas de résister à des augmentations de pression.

V.3- Les coulisses du tonus myogénique

Le TM est une contraction active du muscle lisse présentant des points communs avec les réponses contractiles consécutives à l'activation de récepteur par leur agoniste, comme le sont les récepteurs α 1-adrénérgiques avec la phényléphrine. Le rôle inducteur de la pression sur le TM a été

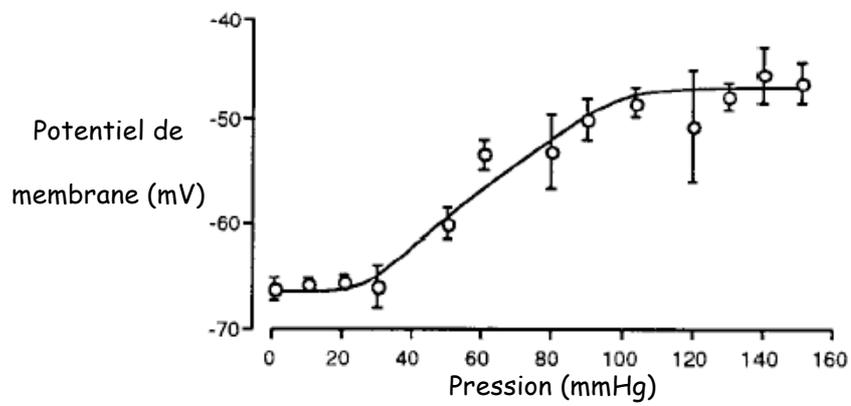


Figure 22 : Dépolarisation de muscles lisses d'artères cérébrales soumises à des paliers de pression. (d'après Davis et Hill³⁰¹).

mis en évidence en inhibant les mécanismes « non myogéniques » pouvant être activés par une voie récepteur-dépendante. Au niveau des artères de résistances, nombreuses sont les terminaisons nerveuses sympathiques, or l'inhibition de ces dernières par la tétrodotoxine n'abolit pas le TM. Il en est de même avec le blocage des récepteurs AT1 (à l'Angiotensine II), ETA (à l'endothéline-1), 5HT₂ (à la sérotonine)...Le résultat est comparable si on fait abstraction des éléments vasoconstricteurs endothéliaux en enlevant l'endothélium. Dans ce cas le TM persiste et il est même potentialisé. Au niveau d'un réseau vasculaire intact, l'interaction entre les mécanismes de régulation neurohumoraux et la réponse myogénique est un aspect souvent oublié. C'est le cas lors d'une stimulation adrénergique de certains lits vasculaires entraînant une augmentation de la vasoconstriction myogénique²⁹⁶. De plus, durant une réponse contractile à un agoniste, la réponse myogénique persiste pour faire face aux changements hémodynamiques induits par l'agoniste. Donc le changement général de la réponse vasculaire, et plus précisément l'effet net sur la résistance vasculaire, est un effet conjoint des composants neurohumoraux et myogéniques²⁹⁷.

Le TM est initié quand un stimulus mécanique, causé par le changement de la pression intraluminale, active la dépolarisation de la membrane des CMLVs, causant la mobilisation calcique et l'activation des protéines contractiles. Bien que ces événements semblent être complétés par différentes voies de signalisation, la nature spécifique de l'activation est mécanique.

V.3.1- Induction et régulation

V.3.1.1- Le potentiel membranaire: un élément déterminant

La dépolarisation membranaire joue un rôle important dans les réponses des muscles lisses à des variations de la tension pariétale ou de la pression. Des CMLs de petites artères ou d'artérioles, en absence de pression, ont un potentiel de repos compris entre -60 et -75 mV²⁹⁸, alors qu'à pression physiologique ce potentiel est compris entre -40 et -60 mV^{299,300}. L'augmentation de la pression artérielle est accompagnée d'une dépolarisation graduelle des CMLs³⁰¹, et ce phénomène est commun à différents muscles lisses, vasculaires ou non, soumis à une élévation de pression ou de tension^{299,302,303}. Cette dépolarisation est observable dans un intervalle de pression (de 30 à 110 mmHg) similaire à celui dans lequel le TM se développe²⁹⁹ (Figure 22).

V.3.1.2- Participation des canaux ioniques

a) Les canaux inducteurs du tonus myogénique (mécanosenseurs)

L'étirement de la paroi, provoqué par la pression, est lié à une entrée de Ca²⁺ dans le cytoplasme des cellules musculaires permettant la contraction. Il est admis que le stimulus

mécanique active soit directement les canaux membranaires, soit via des voies de signalisation induisant l'intervention de molécules modulant l'ouverture des canaux ioniques à l'origine de la dépolarisation membranaire. Généralement, une dépolarisation est engendrée par l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs, mais elle peut aussi être causée par la fermeture de canaux potassiques ou par l'ouverture de canaux chlore. Les approches électrophysiologiques ont permis de disséquer la manière dont la déformation membranaire peut entraîner l'activation des courants cationiques présumés à l'origine de la dépolarisation membranaire, et donc de l'activation des canaux dépendants du voltage^{304,305}.

▪ **Les canaux calciques dépendants du voltage**

Le TM peut être modulé par l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (CCVDs). La place de ces canaux varie en fonction du type vasculaire. Ils ont un rôle important au niveau des artères cérébrales³⁰⁶ mais un rôle partiel dans les artères coronaires. Bien que l'étirement puisse activer directement ces canaux, ce n'est pas suffisant pour engendrer une telle entrée de Ca^{2+} ³⁰⁷. Après le blocage de ces canaux calciques, l'élévation de la pression intraluminale provoque une dépolarisation membranaire normale mais aucune contraction myogénique^{303,308,309}. Ces études montrent que l'influx calcique engendré par ces canaux a une place importante dans le TM. Par contre, cet influx n'est pas responsable de la dépolarisation accompagnant la réponse myogénique. L'ensemble de ces résultats n'exclut pas une régulation potentielle en amont des CCVDs par d'autres types de canaux. Il est plus probable que l'entrée calcique via ces canaux soit régulée par la phosphorylation de canaux consécutive à l'étirement^{310,311}.

L'ensemble de ces études supporte le concept que l'ouverture des canaux dépendants du voltage est consécutive à d'autres événements initiés par la perception d'un étirement, et à la dépolarisation membranaire.

▪ **Les canaux activés par l'étirement (Stretch-activated channels)**

Les canaux mécanosensibles SACs (stretch-activated channels), comme leur nom l'indique, voient leur activité (ouverture) régulée par le niveau d'étirement de la membrane. Ces canaux sont présents dans de nombreux tissus dont les CMLs d'artères coronaires et mésentériques. L'activation de ces canaux cationiques non sélectifs, par une augmentation de l'étirement membranaire, engendre majoritairement des courants sodiques à l'origine de la dépolarisation membranaire^{305,312}. L'entrée de Ca^{2+} par ces canaux participe aussi à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et à la contraction³¹³. Le manque de moyens d'investigation du rôle des SACs dans le TM (car des inhibiteurs tels que le Gd^{3+} inhibent à la fois les SACs et les CCVDs), ainsi que les faibles

connaissances sur l'identité moléculaire et sur la régulation des SACs, rendent difficile l'appréciation du rôle de leur activation durant la réponse myogénique.

▪ **Les canaux TRP (Transient Receptor Potential)**

Bien que l'identité moléculaire du ou des canaux cationiques intervenant dans la dépolarisation induite par l'étirement ne soit pas connue, un intérêt particulier a été porté au rôle des membres de la famille des TRP.

Les canaux TRP (transient receptor potential) forment une famille comprenant plus de 50 canaux perméables aux cations, exprimés de la levure à l'homme. Chaque sous-unité TRP est constituée de six domaines transmembranaires avec un pore entre le cinquième et le sixième segment transmembranaire. Les TRP s'assemblent en homo- ou hétéro-tétramères pour former un canal engendrant une certaine complexité^{314,315}. A ce jour, chez les mammifères, cette famille est divisée en six groupes identifiés comme: Canonique (TRPC1-7), Vanilloïde (TRPV1-6), Mélastatine (TRPM1-8), Polycystine (TRPP1-3), Mucolipine (TRPML) et Ankyrine (TRPA)³¹⁴.

Il a été suggéré que les canaux TRP jouaient un rôle dans les processus cellulaires de la mécanotransduction en général^{316,317}. Cohérent avec l'élaboration de la réponse myogénique, les canaux TRP ont été caractérisés comme des canaux cationiques non sélectifs ou bien sélectifs pour le Ca^{2+} ³¹⁷.

Une étude de Welsh et al. proposait, par l'utilisation d'oligonucléotides antisens introduits dans les muscles lisses d'artéριοles cérébrales, que le canal TRPC6 jouait un rôle dans la contraction myogénique³¹⁸. La réduction de l'expression de TRPC6 affectait la dépolarisation et par conséquent entraînait une diminution de la réponse myogénique. Ce rôle de mécanosenseur de TRPC6 a été confirmé au niveau de cellules CHO et HEK-293³¹⁹. Suite à cela, TRPM4 a été décrit comme indispensable dans le TM³²⁰. Néanmoins, l'implication de tous les TRPs dans le TM n'a pas encore été décrite. Ces canaux pourraient interagir entre eux en s'activant ou se régulant mutuellement. Par exemple, l'entrée de Ca^{2+} par TRPC6 induirait l'activation ultérieure de TRPM4. TRPC6, et TRPM4 pourrait aussi s'associer en tant que sous-unité d'un canal. Cependant, bien qu'il existe des hétéromultimères au sein des différentes familles de TRP, il reste à démontrer que des associations peuvent exister entre ces familles. Enfin, une autre étude de Earley et al. sur des artères cérébrales a mis en avant l'augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} du TRPM4 par l'activation de la PKC, montrant ainsi l'existence de liens potentiels entre différents évènements intervenant dans le TM³²¹.

En ce qui concerne TRPC1, décrit comme un composant d'un canal cationique mécanosensible au niveau d'oocytes et de cellules CHO³²², cet élément est sujet à controverse. L'étude du phénotype et de la réponse myogénique d'artères cérébrales de souris Knock-out pour TRPC1 ne montre aucune modification de ces paramètres en l'absence de ce récepteur³²³. Ce

paradoxe du rôle des TRPs est aussi illustré avec un modèle de souris Knock-out pour TRPC6, présentant une augmentation de la réponse myogénique accompagnée d'une hausse de la pression artérielle systémique et des réponses contractiles aux agonistes³²⁴. Cependant ces résultats paradoxaux pourraient être expliqués par une régulation positive par d'autres TRPs. Effectivement, en absence de TRPC6, il y a une régulation positive de la protéine TRPC3³²⁴, bien que l'inactivation de 50% de TRPC3 par des oligonucléotides antisens n'induit pas d'inhibition du TM des artères cérébrales³²⁵.

Ces données, apparemment contradictoires, pourraient refléter une certaine redondance des rôles joués par les différents TRPs au niveau du muscle lisse vasculaire. Il a aussi été montré qu'en absence de TRPC6, d'autres canaux sensibles au DAG tels que TRPC3 et 7 se substituent à ce dernier³²⁶, illustrant encore une fois le rôle général des protéines TRPs dans la mécanotransduction.

▪ **Le canal sodique épithéliale (ENaC)**

Ce nouveau, et peut-être complémentaire canal cationique, pouvant intervenir dans la signalisation myogénique artériolaire, a été initialement décrit dans la mécanotransduction de la *C. Elegans*³²⁷ et dans la mécanotransduction en réponse aux forces de cisaillement sur l'oocyte³²⁸. Des études récentes illustrent un rôle important du canal ENaC β dans la réponse myogénique au niveau d'artères reinales interlobulaires^{329,330} et plus particulièrement dans la réponse médiée par l'autorégulation du flux sanguin rénal³³¹. Ce canal a aussi ce rôle au niveau d'artères cérébrales de rats³³². De manière intéressante, les canaux ENaC associent à la fois la matrice extracellulaire et le cytosquelette, et font le lien avec d'autres éléments pouvant intervenir dans la mécanotransduction tels que les intégrines. Les canaux ENaC pourrait former un complexe mécanosenseur³³³.

b) Les canaux régulateurs du tonus myogénique

▪ **Les canaux potassiques**

Les canaux potassiques présents au niveau du muscle lisse vasculaire sont d'importants régulateurs du tonus vasculaire. L'activation des canaux potassiques dans des conditions physiologiques résulte en des efflux de potassium entraînant une hyperpolarisation des CMLVs. Cette hyperpolarisation induit une fermeture des canaux calciques dépendants du voltage, une diminution du Ca^{2+} intracellulaire et la relaxation du muscle lisse. Différents types de canaux potassiques semblent intervenir dans la régulation du TM.

Les canaux potassiques dépendants du calcium (BKCa)

L'influx de Ca^{2+} engendré par les canaux mécanosensibles produit une inhibition des canaux calciques voltage dépendants et une activation des canaux potassiques³³⁴. Afin d'éviter une vasoconstriction excessive en réponse à la pression, il existe un mécanisme de feedback négatif pour limiter le TM. En effet, l'augmentation de Ca^{2+} induite par l'étirement membranaire active des canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} (BK_{Ca}). Il en résulte un courant sortant de K^+ qui engendre une hyperpolarisation limitant la durée de la dépolarisation³³⁵. Plus précisément, l'activité de ces canaux est indirectement liée aux pics de Ca^{2+} induits par la libération du Ca^{2+} sarcoplasmique via les récepteurs sensibles à la ryanodine. Ces pics de Ca^{2+} permettent une élévation locale du Ca^{2+} intracellulaire permettant l'activation des canaux BK_{Ca} ³³⁶. L'augmentation de la concentration calcique en absence de ces pics de Ca^{2+} ne suffit pas à activer les canaux BK_{Ca} de manière assez importante pour réguler le potentiel de membrane³³⁷. L'intervention de ces canaux varie en fonction du type vasculaire. Par exemple, ces canaux ont une place plus importante au niveau des artères cérébrales qu'au niveau des artères du muscle crémaster³³⁸.

Ce mécanisme est régulé à différents niveaux par la PKA et la PKG ainsi que par la PKC. Effectivement ces kinases stimulent (PKA/PKG) ou inhibent (PKC) ce processus en jouant sur la fréquence et l'amplitude des relargages calciques du réticulum sarcoplasmique ainsi que sur l'activité des canaux BK_{Ca} ³³⁹.

Les canaux potassiques dépendants du voltage (K_v)

Ces canaux ont été décrits comme intervenant dans un mécanisme de feed-back limitant ainsi la réactivité myogénique. Ces canaux dépendants du voltage sont activés au potentiel de membrane atteint pendant le TM (-55 à -30 mV) permettant la repolarisation des cellules excitables³⁴⁰. L'inhibition de ces canaux provoque une augmentation de la vasoconstriction de petites artères pourvues d'une activité myogénique^{303,341}.

Les canaux TREK-1 (TWIK-related K^+)

La fonction dilatatrice des canaux potassiques au niveau des CMLVs a été attribuée presque exclusivement à des canaux formés d'un seul pore. Cependant, au niveau des CMLVs, un autre type de canaux potassiques existe, les canaux TREK-1. Ces canaux font partie de la famille des canaux potassiques à deux pores ($\text{K}_{2\text{P}}$). Leur expression varie en fonction du type d'artères. Une étude montre qu'ils sont présents dans les artères mésentériques de rats mais pas dans les artères pulmonaires³⁴². Ils ont aussi un rôle important au niveau des microvaisseaux cutanés³⁴³ et dans la circulation cérébrale^{344,345}. Ces canaux sont activés par des stimuli mécaniques et chimiques comme

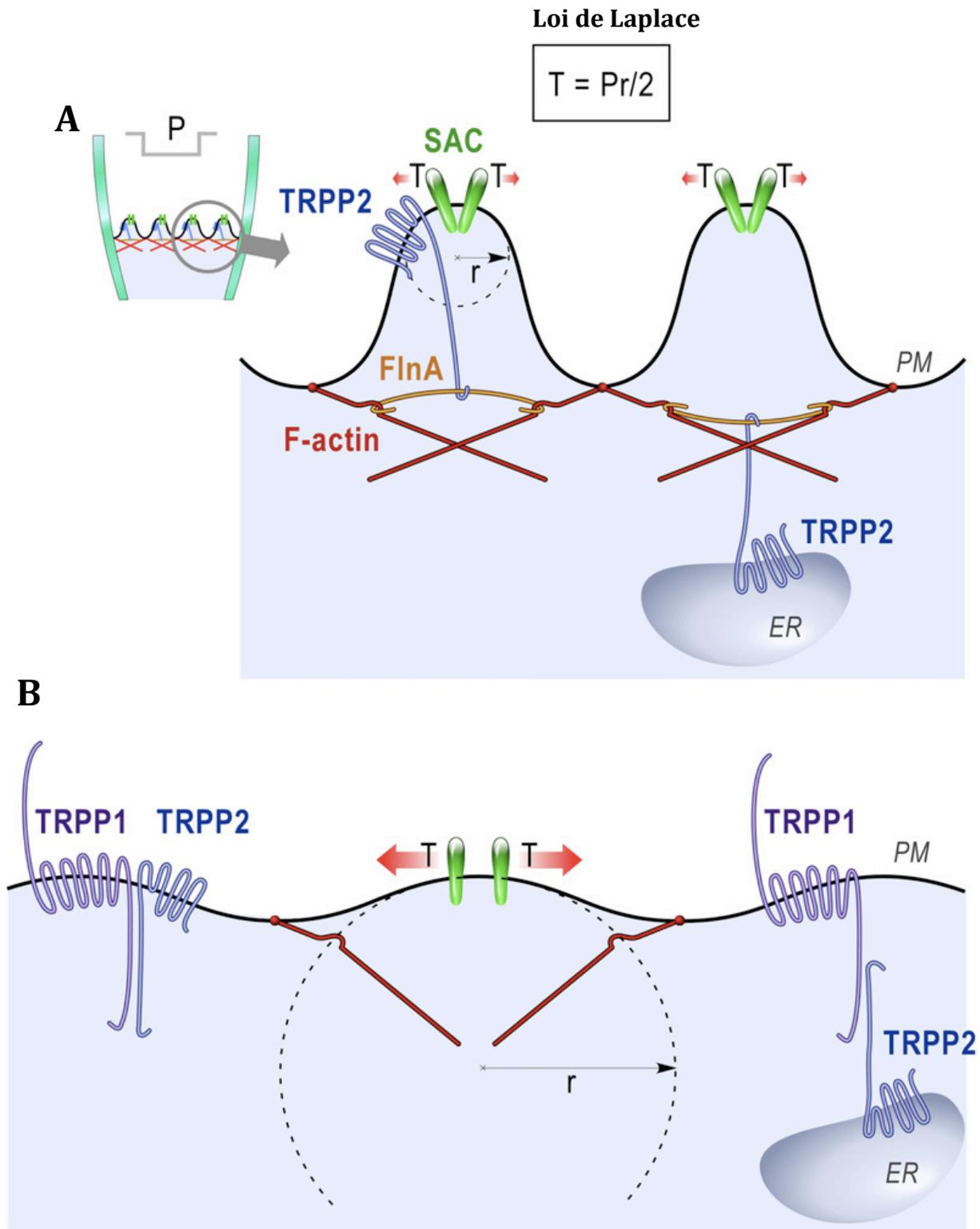


Figure 23 : Effet du complexe Actine/Filamine/TRPP2 sur la tension de surface et sur l'activité des canaux mécanosensibles. (d'après Sharif-Naeini et al. Cell. 2009³⁵⁰)

(A) Le complexe Actine(F-actin)/Filamine (FlnA)/TRPP2 impose une certaine courbure à la membrane plasmique. Selon la loi de Laplace $T=Pr/2$, pour une pression donnée, plus le rayon de courbure (r) est petit plus la tension de surface à laquelle les canaux sont soumis est faible. Cela permet de protéger les canaux d'une force excessive. (B) Dans le cas d'une altération du complexe Actine/Filamine A/TRPP2 par différents moyens, le rayon de courbure augmente entraînant une augmentation de la tension de surface à laquelle sont soumis les canaux. Ainsi pour une même pression, il y a une activation plus élevée des canaux mécanosensibles.

l'acide arachidonique. Cependant, une absence de TREK-1 n'influence pas la réponse myogénique d'artères basilaires suggérant donc que ce canal participerait davantage à une régulation de la vasoconstriction.

▪ Les canaux chlore

Après avoir été impliqués dans la dépolarisation membranaire induite par un agoniste³⁴⁶, ces canaux ont également été proposés pour expliquer celle induite par l'étirement pariétal des CMLVs. Les canaux chlore pourraient être impliqués dans la dépolarisation des muscles lisses vasculaires, avec la production d'un courant chlore sortant calcium-dépendant³⁴⁷. Le potentiel d'équilibre pour le chlore dans les cellules musculaires se situe entre -47 et -10 mV, avec une variation reflétant l'activité ou l'expression de différents systèmes de transport du chlore dans différents vaisseaux. Aujourd'hui, le manque d'inhibiteurs spécifiques ne permet pas d'aboutir à des conclusions définitives sur le rôle des canaux chlore sur la réponse myogénique. En revanche, il est clairement établi que le chlore ne joue pas un rôle initiateur de la réponse myogénique³⁴⁷.

V.3.1.3- Le cytosquelette

L'activité des canaux mécanosensibles est intimement liée à la tension membranaire. Comme nous avons pu en parler précédemment, la chape cellulaire composée par les différents éléments du cytosquelette influence l'état de tension de la membrane plasmique⁷⁹. Cela laisse supposer que de nombreux éléments du cytosquelette joueraient un rôle dans la mécanotransduction. Des études ont montré que des éléments du cytosquelette tels que la vimentine³⁴⁸ et la dystrophine³⁴⁹ interviennent dans la mécanotransduction médiée par le flux mais pas dans le TM.

Une étude récente à laquelle j'ai participé montre l'intervention de la filamine A dans l'état d'activation des canaux mécanosensibles³⁵⁰. Cette protéine, via son interaction avec la polycystine 2 (TRPP2), inhibe l'activité des canaux mécanosensibles. Cette polycystine est ancrée à la membrane plasmique ou à la membrane du réticulum endoplasmique. Ainsi, son interaction avec le cytosquelette d'actine via la filamine A entraîne une tension de surface faible influençant l'activité des canaux mécanosensibles (Figure 23). Dans le cas d'une inhibition de ce complexe Actine/filamine A/TRPP2 par différents moyens, la membrane plasmique se déforme, ce qui conduit à une augmentation de la tension de surface facilitant l'ouverture des canaux mécanosensibles.

En ce qui concerne les filaments d'actine, leur polymérisation est stimulée et leur architecture est modifiée dans les CMLVs suite à une augmentation de la pression transmurale,

contrairement à ce qui est observé lors d'une activation α -adrénergique³⁵¹. La dépolymérisation des filaments d'actine engendre une diminution du TM³⁵².

Les microtubules interviennent eux aussi dans la régulation du TM. Contrairement à l'actine, leur dépolymérisation stimule le TM en induisant une sensibilisation au Ca^{2+} via la voie de la Rho-kinase³⁵³.

V.3.1.4- Les intégrines

Comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe III.2.2.1), les intégrines sont, par leur localisation et leurs interactions, des éléments importants dans la transmission de signaux à travers la membrane cellulaire. Leur lien avec la matrice extracellulaire et les protéines de signalisation intracellulaire font d'elles de bonnes candidates en tant que mécanosenseurs. Des études ont montré que la fixation de peptides RGD (arginine-glycine-aspartate) au niveau de l'intégrine musculaire $\alpha_v\beta_3$ entraîne une inhibition du TM³⁵⁴ via le blocage des courants calciques de types L. Alors que l'activation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ potentialise les courants calciques³⁵⁵, d'autres études ont démontré que les intégrines transduisent un signal provenant des forces mécaniques à travers la membrane cellulaire, pouvant engendrer des variations de pH ou de Ca^{2+} intracellulaire³⁵⁶.

Des résultats obtenus sur des artères isolées étayent parfaitement cette vision des intégrines comme des mécanosenseurs de la pression. Effectivement, le blocage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ a pour effet d'abolir la vasoconstriction induit par une augmentation de pression³⁵⁷. Il a été démontré que l'activation de ces intégrines, entre autres, entraîne la phosphorylation des canaux calciques dépendants du voltage, ainsi que des canaux BK_{Ca} et l'activation de canaux ioniques^{305,358} (Figure 24).

Ces études suggèrent donc que les intégrines restent un des principaux candidats pour faire partie de l'appareil sensoriel, lié à l'activité myogénique dans les vaisseaux. Cependant on ne sait pas si d'autres récepteurs mécanosensoriels interviendraient de manière similaire ou selon des voies parallèles complémentaires.

V.3.1.5- Autre mécanosenseurs

a) Les jonctions gap

Les connaissances sur les mécanosenseurs présents au niveau des CMLs artérielles sont encore loin d'être complètes. Cependant, d'autres acteurs ont déjà été identifiés comme c'est le cas des *gap junction*. Une inhibition de ces structures permettant la communication intercellulaire provoque une diminution du TM^{359,360}. Ces éléments joueraient un rôle plus important dans le cas

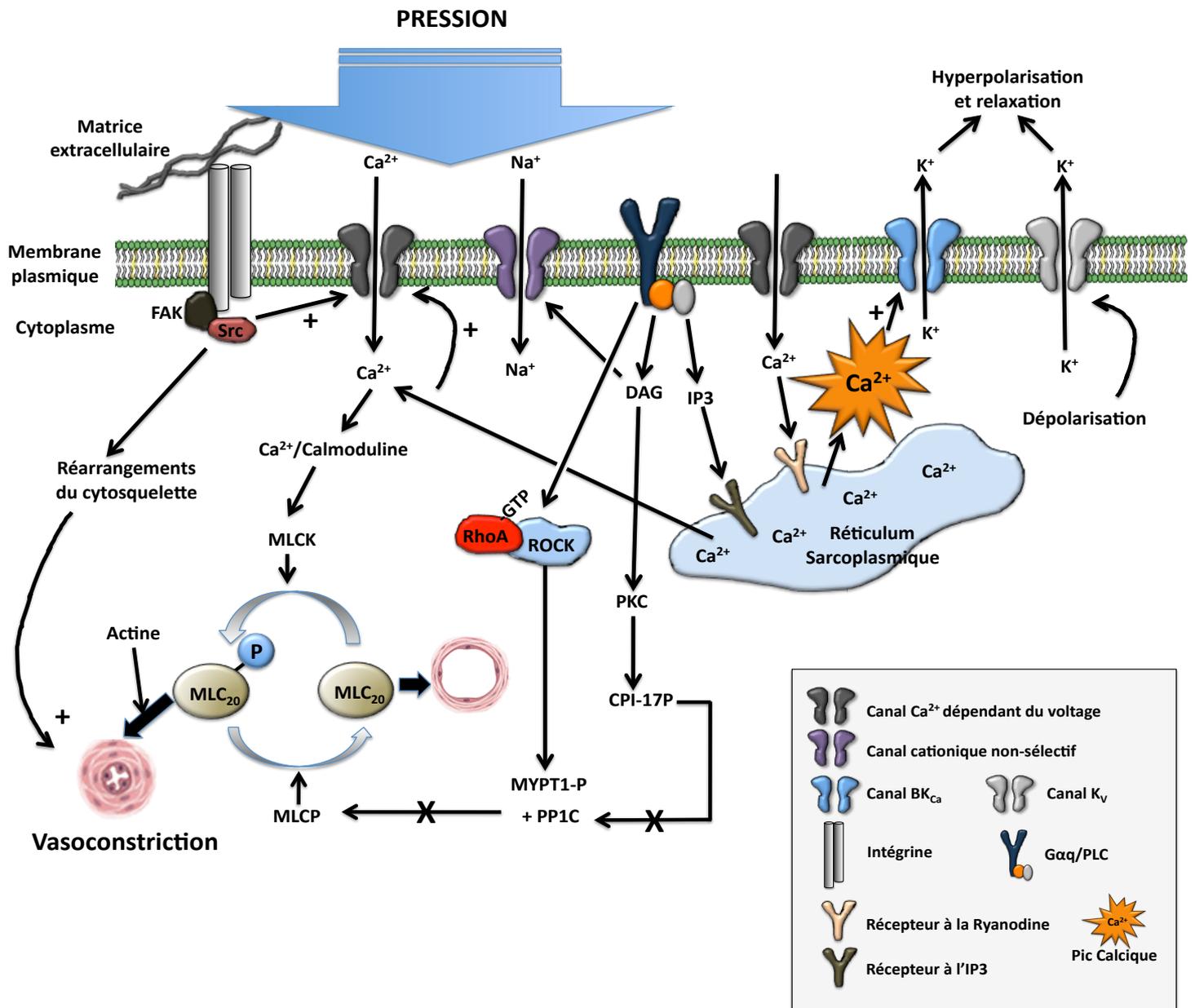


Figure 24 : Schéma simplifié des différentes voies de signalisation intervenant dans le développement du tonus myogénique.

des artères plus larges, constituées de plusieurs couches musculaires et nécessitant donc des mécanismes permettant la transmission de la force entre les cellules.

b) Les métalloprotéinases

Outre le lien que les cellules ont avec la matrice extracellulaire grâce aux intégrines, d'autres protéines peuvent être prises en considération dans les interactions entre les CMLs et leur environnement. C'est le cas des métalloprotéinases (MMP), présentes dans la matrice extracellulaire, qui ont la capacité de modifier cet environnement lors d'une augmentation de pression entraînant la libération d'HB-EGF (Heparin-Binding EGF), ce qui provoque la transactivation d'EGFR (EGF receptor). L'inhibition ou l'absence de MMP2/9 entraîne une diminution du TM au niveau d'artères mésentériques^{361,362}.

V.3.2- Le tonus myogénique : des seconds messagers spécifiques.

Beaucoup de voies de signalisation, comparables à celles intervenant lors de l'activation d'un récepteur membranaire, peuvent être sollicitées lors d'une augmentation de pression intraluminale, telles que l'activation des protéines G (trimériques ou monomériques), le relargage du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique³⁶³, l'activation des protéines kinases comme la PKC, et la génération d'éléments vasoactifs comme les produits issus du métabolisme de l'acide arachidonique³⁶⁴ et les espèces réactives de l'oxygène³⁶⁵. Ces points communs rendent difficile l'identification de facteurs spécifiques de la réponse myogénique. Cependant, il a été montré qu'au niveau des petites artères, le TM est amorcé en un laps de temps très court d'environ 250ms^{366,367}. Cette rapidité nécessite l'existence d'un mécanisme supplémentaire directement lié à la membrane, et qui est activé avant même la dépolarisation induisant l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. Cette modulation du TM par des seconds messagers a été mise en évidence par l'existence de facteurs générés lors d'une augmentation de pression, qui pourraient donc être d'importants médiateurs du TM. Parmi eux, il y aurait des médiateurs lipidiques tels que l'acide 20-HETE (20-Hydroxyeicosatetraenoic) qui inhibe les canaux BK_{Ca} et favorise la dépolarisation ; le DAG qui va activer différentes PKC et stimuler directement les canaux TRPC3 et G ³⁶⁸ ; et l'IP3 qui induit le relargage du Ca^{2+} sarcoplasmique (Figure 24). Lors d'une augmentation de pression, la sphingosine, dérivant de la sphingomyéline membranaire, est phosphorylée par sa kinase (Sphingosine kinase). Ainsi, suite à une dépolarisation, la sphingosine-1-phosphate en résultant va stimuler le relargage calcique du réticulum sarcoplasmique et la voie de sensibilisation calcique médiée par RhoA³⁶⁹.

De plus, il a été montré que sous l'effet d'une augmentation de la pression intraluminale, l'activité des protéines G_q/G_{11} est modifiée, et cela indépendamment de leur liaison avec les

récepteurs membranaires, induisant ainsi l'activation de protéines telles que la PLC β et le canal TRPC6, provoquant alors la dépolarisation membranaire³²⁶. Cela est confirmé par des études montrant l'activation des protéines G par un stimulus mécanique³⁷⁰, et la modulation des canaux ioniques qui en découle s'effectuant en quelques millisecondes³⁷¹. Il reste à démontrer que de tels messagers sont à l'origine de la réactivité myogénique, et à savoir comment leur production est liée à l'augmentation de pression. L'identification des seconds messagers intervenant spécifiquement dans le TM, parmi ceux participant à la contraction en général, reste difficile. De plus, le lien entre l'induction de leur production et l'augmentation de pression reste à élucider.

V.3.2.1- La voie RhoA/RhoKinase dans le tonus myogénique

La voie RhoA/Rho-kinase, comme on a pu le voir précédemment, tient une place importante dans la contraction des CMLs. Il n'est donc pas surprenant que cette voie intervienne dans le contrôle du tonus vasculaire de nombreux vaisseaux sanguins dont l'artère pulmonaire, l'artère mésentérique et la veine porte. L'intervention de la petite protéine G RhoA dans le TM via son effecteur principal Rho-kinase est clairement établit (Figure 24). De nombreuses études ont mis en évidence que l'inhibition de cette kinase entraîne une diminution du TM^{372,373}.

V.3.2.2- Autres protéines kinases dans le tonus myogénique

En plus de la contribution de la MLCK et de Rho-kinase, d'autres protéines kinases sont impliquées dans le TM.

a) Les PKC

Des études sur des artères cérébrales et des artères du muscle crémaster ont montré une inhibition dose-dépendante du TM par la staurosporine (inhibiteur de PKC). Cela est confirmé par l'utilisation d'indolactame V (activateur de PKC) qui entraîne une augmentation de la contraction des vaisseaux à la pression^{374,375}. Comme dans le cas des réponses aux agents contractants, cette kinase intervient en augmentant la sensibilité au Ca²⁺ de l'appareil contractile en activant la CPI-17³⁷⁶(Figure 24).

Les PKCs peuvent influencer, par inhibition ou activation, les canaux calciques voltage-dépendants et modifier la concentration calcique, et ainsi moduler le TM. La PKC peut inhiber l'activité des canaux potassiques voltage dépendants, potentialisant indirectement la contraction myogénique.

b) Les MAPKinases p38 et ERK1/2

La phosphorylation des protéines sur les tyrosines est aussi une voie de signalisation impliquée dans la mécanotransduction. Ces cascades de phosphorylations peuvent être stimulées par l'étirement. Cela a été démontré dans les cellules endothéliales³⁷⁷ et les myocytes cardiaques³⁷⁸. Contrairement à ce qui a été décrit dans les contractions récepteur-dépendantes, les MAPKs comme p38 et ERK1/2 tiennent une place moins importante dans le cas du TM. Une étude de Bolla a montré que la MAPKinase p38 intervient de façon importante dans la contraction induite par un analogue stable du TxA2 qu'est le U46619¹⁷², alors qu'il a été montré que cette MAPKinase tient une place moins importante dans le TM³⁷³. De plus une étude sur la veine faciale de lapin a montré que la voie ERK1/2, activée par l'étirement, n'intervient pas dans le TM³⁷⁹. Leur intervention au niveau du TM correspondrait plus à une modulation ou à une facilitation de cette réponse myogénique plutôt qu'à un élément primordial³⁸⁰

Le rôle exact de ces différentes voies dans le TM reste difficile à comprendre : les cibles phosphorylées par ces kinases ne sont pas bien connues, et dans le cas de protéine telles que la PKC, la diversité de ses isoformes n'aide pas.

V.3.3- Au regard du calcium, le tonus myogénique : une contraction parmi tant d'autres.

Comme dans le cas des réponses récepteur-dépendantes, le Ca^{2+} joue un rôle pivot dans la contraction des muscles lisses induite par la pression. La nécessité d'un influx calcique intracellulaire dans le développement du TM a été montrée initialement par Laher et al, dans la veine faciale de lapin³⁸¹. Comparable à la contraction récepteur-dépendante, les influx calciques proviennent du milieu extracellulaire et des différents compartiments cellulaires. En revanche, bien que le Ca^{2+} soit nécessaire pour le développement du TM, l'augmentation du Ca^{2+} nécessaire à la contraction est beaucoup plus faible que celui nécessaire à une contraction dépendant d'un agoniste et de son récepteur³⁸². L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire ou les influx calciques engendrés par l'étirement sont abolis si on enlève le Ca^{2+} extracellulaire. Ils sont légèrement sensibles aux inhibiteurs des canaux dépendants du voltage et sont significativement atténués par des bloqueurs des canaux mécanosensibles³⁸³.

De plus, une étude sur des CMLs isolées de vessie suggère que l'étirement induit la libération du Ca^{2+} des stocks intracellulaires d'une manière indépendante des récepteurs à l'IP3 et abolie par la ryanodine³⁸⁴(Figure 24).

V.3.4- La sensibilité calcique, dans la contraction myogénique.

Comme nous l'avons approfondi précédemment (paragraphe III.5.2), la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile via l'inhibition de la phosphatase de la chaîne légère de myosine, par la Rho-kinase, la PKC et l'AA, a une place importante dans la contraction vasculaire. Le Dr Boels a montré que l'augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} des protéines contractiles dans les vaisseaux de résistance était plus importante que dans les vaisseaux de conductance³⁸⁵. Des études ont montré que le développement du tonus basal et de la réponse myogénique est associé à la production de la PKC^{374,375}, et des métabolites de l'acide arachidonique semblent également être impliqués³⁸⁶. Le Dr VanBavel et al. ont montré que la sensibilité au Ca^{2+} est 5 fois plus élevée au cours du TM que lors d'une contraction induite par du potassium, et deux fois plus élevée que dans le cas d'une stimulation α 1-adrénergique³⁸⁷. Rho-kinase a été décrite comme intervenant dans ce mécanisme, pour la première fois, en utilisant un inhibiteur de Rho-kinase (Y27632) sur des artères mésentériques de rats³⁸⁸. De plus, la mise au point d'une technique de mesure, plus sensible, de l'état de phosphorylation des protéines a permis d'apporter de nombreuses informations sur la sensibilité au Ca^{2+} durant le TM^{389,390}. Ainsi, la phosphorylation du site T855 de MYPT1 par Rho-kinase a pu être observée lors d'une augmentation de pression (10 à 60 mmHg) au niveau d'artères cérébrales et cela sans phosphorylation ni du site T697 ni de la CPI-17³⁹¹.

Cependant, les éléments en amont de ces voies de phosphorylation restent encore inconnus. Il est fort probable que, lors d'une augmentation de pression, des protéines G spécifiques puissent intervenir dans l'activation de Rho-kinase et que des isoformes particuliers de la PKC phosphorylent la CPI-17, si bien-sûr cette dernière intervient dans le TM.

V.4- Le Tonus Myogénique dans les pathologies

Dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, la régulation du TM se voit modifiée entraînant ainsi une hyper ou une hypocontractilité en réponse à la pression. Par exemple, durant des chocs hémorragiques, une augmentation de l'expression des canaux BK_{Ca} et une hypersensibilité de ces canaux aux pics calciques provoquent une augmentation des influx potassiques, conduisant à une vasodilatation et une hypotension³⁹². Alors que, dans le cas d'hémorragies sous-arachnoïdiennes, la diminution des flux sanguins cérébraux est induite par une augmentation du TM. Cette modification résulte d'une diminution de l'ouverture des canaux K_{Ca} sous l'effet d'une augmentation de la production de 20-HETE³⁶⁴, ainsi qu'à une sur-stimulation de Rho-kinase induisant une augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile³⁹³. Dans des pathologies telles que le diabète³⁹⁴ et l'hypertension³⁹⁵, les artères cérébrales possèdent un TM plus élevé. Une élévation du TM est aussi visible lors d'une perte d'estrogènes chez des rates

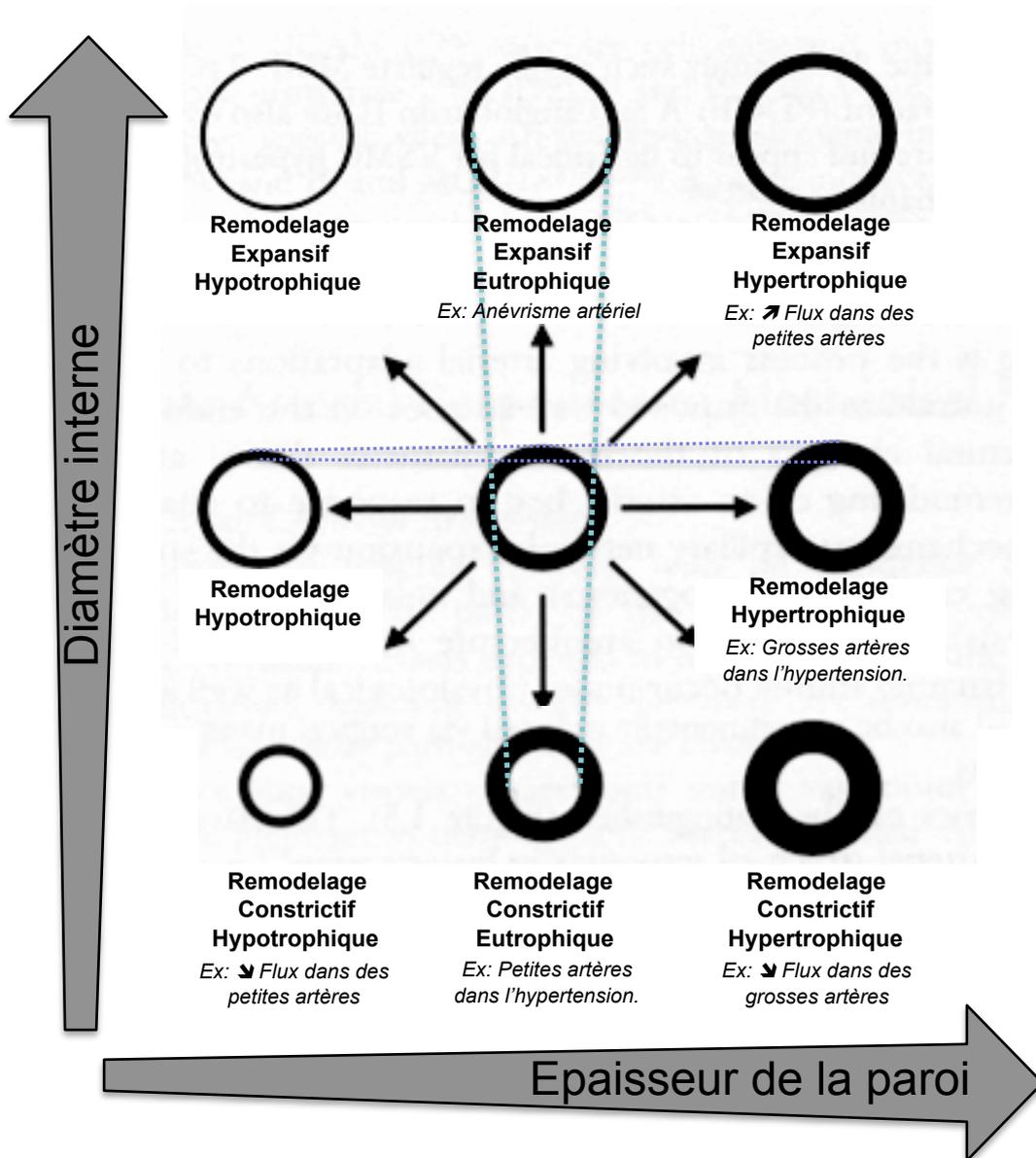


Figure 25 : Schéma simplifié du remodelage artériel en réponse à des modifications chroniques de pression ou de flux. (d'après Mulvany et al. Hypertension ; 1996⁴³⁰).

ovariectomisées³⁹⁶. Dans une pathologie telle que l'hypoxie pulmonaire, le TM est aussi plus élevé que la normale suite à une augmentation de la sensibilité de l'appareil contractile engendrée par une suractivation de Rho-kinase³⁹⁷.

⇒ Le TM apparaît donc (avec la dilatation en réponse au flux) comme un élément primordial dans l'adaptation des artères de résistance à une variation des paramètres hémodynamiques (flux et pression). Il permet le maintien d'une perfusion fine des différents organes et tissus du corps. Cependant, lorsque ces paramètres hémodynamiques sont modifiés de façon chronique, et que les capacités vasoactives des petits vaisseaux sont impuissantes à rétablir un équilibre, un autre mécanisme est mis en place : le remodelage vasculaire.

VI- Le remodelage vasculaire: une adaptation à long terme à des variations hémodynamiques.

VI.1- Généralités

Le remodelage vasculaire est un processus présent durant la croissance et le développement des organes. Les cellules artérielles se différencient et s'associent pour former des vaisseaux de longueur, de diamètre, de structure et de composition précis en relation avec leur localisation et leur fonction. A l'âge adulte, le remodelage vasculaire correspond à toute modification durable de la taille et de la composition des vaisseaux leur permettant de s'adapter et/ou d'être réparés. Le remodelage physiologique est un mécanisme adaptatif sujet à un contrôle très précis répondant aux différents changements, à long terme, des conditions hémodynamiques. Cela implique la production de médiateurs qui influencent la structure et la fonction du vaisseau. Selon le calibre des artères, le type, l'intensité et la durée de la contrainte exercée, le remodelage artériel qui en résulte est différent.

L'adaptation structurale du vaisseau se traduit par une modification du diamètre interne et/ou de l'épaisseur de paroi (Figure 25). Une diminution ou une augmentation du diamètre artériel reflète un remodelage respectivement dit constrictif ou expansif. Selon l'épaisseur de la paroi, le remodelage est défini comme hypotrophique (diminution), eutrophique (maintien) ou hypertrophique (augmentation).

Selon le paramètre hémodynamique l'engendrant, le remodelage vasculaire a été classé en deux parties : le remodelage pression-dépendant et le remodelage débit-dépendant.

VI.2- Le remodelage dépendant de la pression

Les artères répondent à une augmentation chronique de pression sanguine par un remodelage permettant de supporter le changement de tension à long terme. Au niveau des cellules vasculaires, de nombreux récepteurs sont stimulés par des stimuli mécaniques engendrant diverses voies de signalisation, comme la cascade de MAPKinases et la voie TGF- α /NF- κ B. Cette dernière voie semble jouer un rôle important dans le processus de transformation, induit par une pression élevée, comme l'activation de nombreuses protéases extracellulaires responsables de la réorganisation de la matrice extracellulaire.

Ce remodelage est différent en fonction du type d'artère concerné. Dans le cas des artères de conductance, une augmentation de pression induit une hypertrophie pariétale, alors qu'au niveau des artérioles elle induit un rétrécissement luminal. La vitesse de mise en place du remodelage varie en fonction du vaisseau. Les gros troncs possédant peu de tonus vasomoteur, leur capacité à répondre rapidement à une augmentation de pression est donc limitée à leurs propriétés de rigidité. En revanche, les artères de résistance et artérioles recourent en premier lieu à la réponse myogénique afin de normaliser le stress circonférentiel. Si le stimulus est maintenu et que tout ça ne suffit pas, le remodelage vasculaire s'amorce. Cette différence de propriété des vaisseaux explique que le remodelage survient plus précocement dans les artères de conductance que dans les petites artères.

VI.3- Le remodelage dépendant du débit

Les vaisseaux sanguins réagissent à des variations de débit par du remodelage et/ou de la croissance, leur permettant ainsi de maintenir un shear stress constant³⁹⁸. Le remodelage artériel débit- ou flux-dépendant est impliqué dans les processus physiologiques, incluant la croissance des vaisseaux sanguins durant le développement³⁹⁹, l'exercice physique⁴⁰⁰ et la grossesse⁴⁰¹.

Deux mécanismes différents interviennent dans ce type de remodelage : l'angiogénèse et l'artériogénèse. L'angiogénèse est un mécanisme d'expansion du réseau vasculaire via le développement de nouveaux capillaires sur la base de capillaires préexistants. L'artériogénèse consiste en l'élargissement et la mise en fonction d'artérioles collatérales déjà existantes. Ce mécanisme est principalement déclenché par une augmentation du débit sanguin alors que le principal élément déclencheur de l'angiogénèse est l'ischémie. Les facteurs de croissance intervenant dans ces deux remodelages débit-dépendants stimulant la prolifération et la migration cellulaires sont différents dans les 2 mécanismes. Dans l'angiogénèse, c'est le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) qui intervient en stimulant la prolifération des cellules endothéliales,

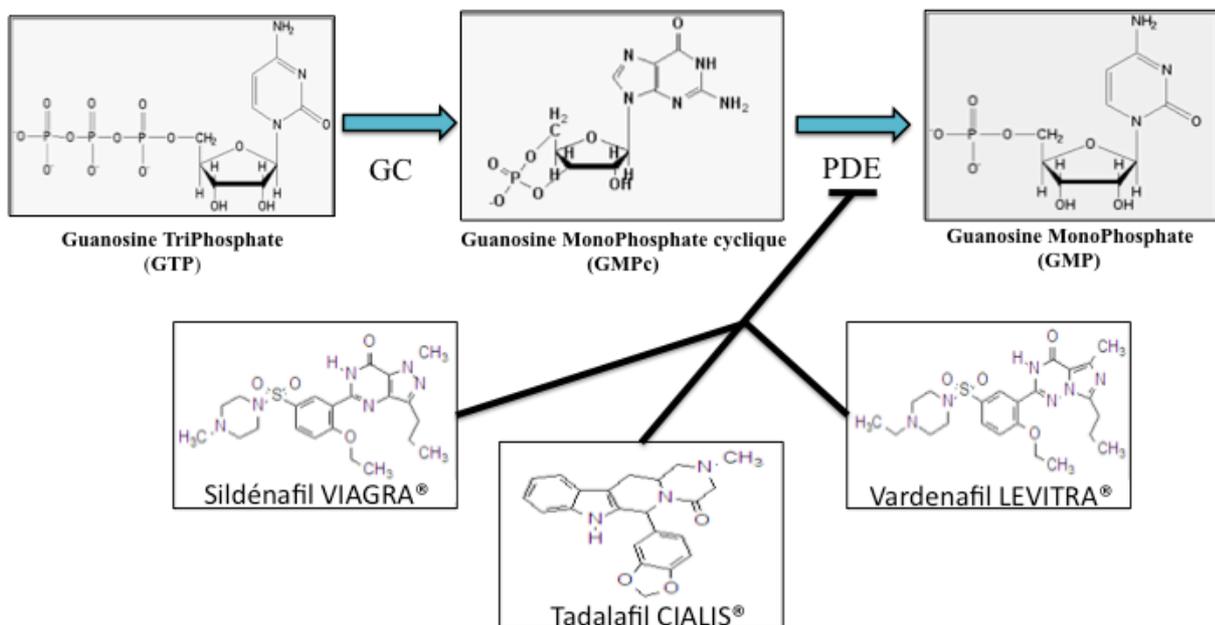


Figure 26 : Structure des différents inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5.

alors que dans l'artériogénèse il y a également une stimulation des CMLs par le bFGF, le PlGF et le PDGF⁴⁰².

⇒ Cette capacité d'adaptation vasculaire tente à maintenir une perfusion normale des organes lors de la modification du flux ou de la pression. Une perte de régulation de ce processus adaptatif résulte du développement des principales maladies cardiovasculaires, telles que l'hypertension artérielle, le diabète, les maladies ischémiques et les tumeurs^{403,404}. Le remodelage vasculaire est une cause importante du développement de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP).

VII- Le Sildénafil dans la réactivité vasculaire

VII.1- Généralités

Le Sildénafil (citrate de sildénafil) est une molécule dont le développement a commencé en 1986 et brevetée par les laboratoires Pfizer en 1996. Il a été classé dans la catégorie des anti-hypertenseurs et des vasodilatateurs périphériques, du fait de sa capacité à inhiber des enzymes intervenant dans la contraction des CMLs des artères et des veines de tout le corps (essentiellement au niveau des corps caverneux) : les phosphodiésterases de type 5 (PDE5). Il est clairement décrit qu'une libération de monoxyde d'azote (NO) au niveau vasculaire provoque la relaxation des CMLVs. Le NO a la propriété d'activer la guanylate cyclase (GC) induisant alors l'hydrolyse du GTP (Guanosine TriPhosphate) en GMPc (Guanosine Monophosphate cyclique) et l'activation de ces cibles provoquant une vasodilatation. L'effet du GMPc est régulé par sa concentration et donc par sa dégradation par les phosphodiésterases (PDEs). Le sildénafil n'influe que sur la PDE5 et n'a pas d'effet sur la production de NO. Le but premier du sildénafil devait être le traitement d'une forme de maladie cardiaque qu'est l'angine de poitrine. Or, lors des études cliniques de phase I, les chercheurs ont remarqué que l'effet sur l'angine de poitrine n'était pas celui espéré. En revanche, un des effets secondaires observés était que le sildénafil provoquait une érection⁴⁰⁵. Il a donc été commercialisé comme médicament dans le traitement de l'impuissance sexuelle (dysfonction érectile) sous le nom de Viagra® et sous le nom de Revatio® dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Il a l'avantage d'être administré oralement, d'être bien toléré, d'avoir peu d'interactions avec d'autres médicaments et surtout de ne pas nécessiter une surveillance élevée. Il devenait donc une alternative intéressante dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire.

D'autres inhibiteurs de la PDE5 existent tels que le vardenafil (Levitra®) et le tadalafil (Cialis®). Comme vous pouvez le voir (Figure 26), ces inhibiteurs possèdent une structure commune en double anneau contenant un nitrogène hétérocycle. Cette structure mime la base purine

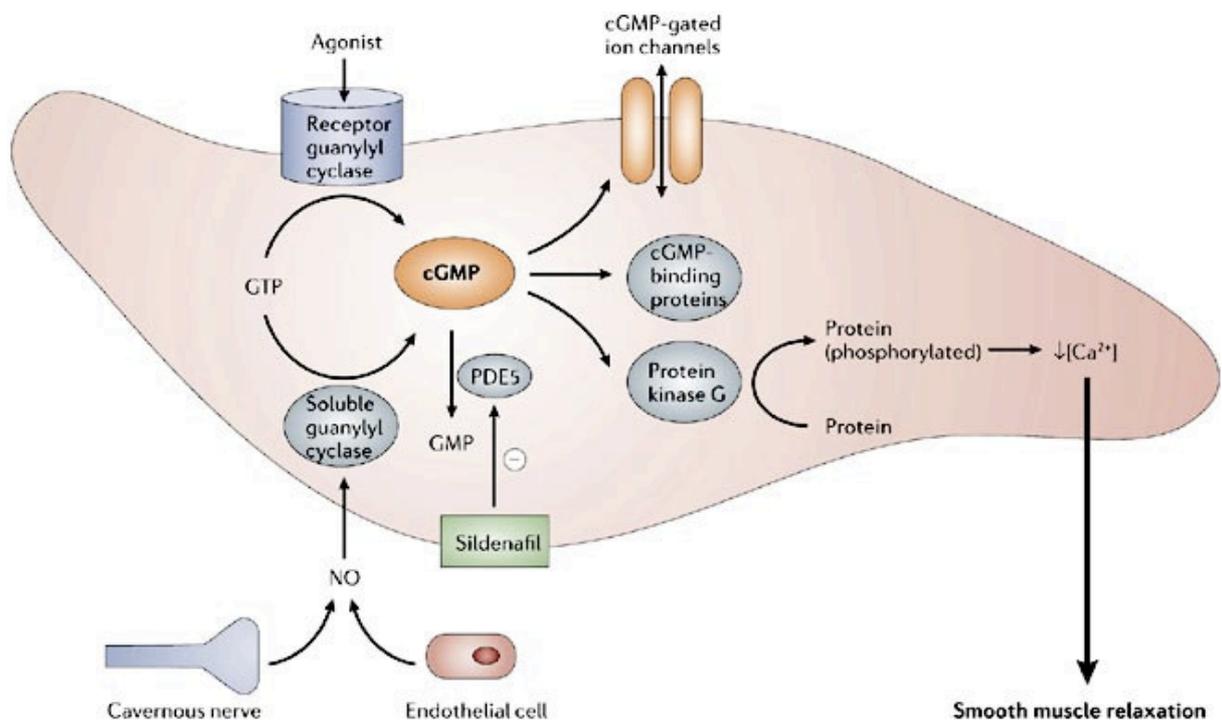


Figure 27 : Mécanisme d'action du sildénafil.

(d'après Ghofrani et al. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006⁴³¹).

du GMPc et leur permet ainsi d'interagir avec le même cycle catalytique de la PDE5 que le nucléotide cyclique. Cette compétition entre l'inhibiteur et le GMPc entraîne une diminution de la dégradation du GMPc par la PDE5. Il en découle une augmentation de la concentration en GMPc et donc de ses effets (Figure 27). Cet effet inhibiteur est réversible et disparaît lorsque la concentration du médicament, ou de son métabolite actif, s'abaisse au dessous du seuil d'activité.

VII.2- Les phosphodiésterases (PDE)

VII.2.1- Généralités

La famille des PDEs est constituée de onze membres (PDE1-11) de localisation tissulaire, de mécanismes de régulation et de sensibilité aux inhibiteurs différents. Ces PDEs ont été à de nombreuses fois décrites comme ayant un rôle important dans la transduction du signal intracellulaire, et comme étant impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que : l'inflammation, la vasodilatation, l'agrégation et l'adhésion plaquettaire, la vision, l'angiogenèse, l'érection et bien d'autres. Au niveau de l'extrémité C-terminale de ces onze PDEs se situe un domaine catalytique d'environ 270 acides aminés. La région N-terminale des PDEs est impliquée dans la fonction de régulation de ces enzymes. Cette région, spécifique à chaque famille, contient les sites de liaison au complexe Ca^{2+} /calmoduline et de liaison au GMPc et à l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) ainsi que des sites phosphorylables. Pour finir cette région intervient dans la localisation membranaire de la PDE.

VII.2.2- Structure

La PDE5 est un homodimère composé d'une enzyme cytosolique formée de deux sous-unités identiques de 99kDa. Chaque sous-unité est une protéine chimère formée d'un domaine catalytique, en C-terminale, liant un métal, et d'un domaine régulateur à l'extrémité N-terminale. La PDE5 est une enzyme zinc-dépendante. La PDE5 a été décrite comme présentant trois isoformes (PDE5A1 à A3) au niveau des tissus humains et animaux avec une prédominance de l'isoforme A2. Les isoformes diffèrent dans leur partie N-terminale, ce qui correspond à des régions différentes en 5' de l'ARNm. PDE5A1 et A2 sont largement distribuées alors que PDE5A3 est limitée au muscle lisse du pénis, l'urètre, la prostate, la vessie et l'aorte. Les iPDE5 se lient exclusivement au domaine catalytique et non au domaine régulateur.

VII.2.3- Rôle

La fonction des phosphodiésterases^{406,407} est d'hydrolyser les liaisons phosphodiésters (liaisons riches en énergie) reliant entre eux des atomes de phosphore constituant le groupement

phosphate. Ainsi, elles inactivent l'AMPc et le GMPc. Cependant, la sélectivité pour l'un ou l'autre de ces deux substrats varie selon l'enzyme. La PDE5 agit préférentiellement sur le GMPc alors que les PDE1,2,3,4,7 et 8 hydrolysent principalement l'AMPc. La PDE6, présente dans la rétine, agit préférentiellement comme substrat le GMPc. Les PDE10 et les PDE11, quant à elles, agissent sur les deux : l'AMPc et le GMPc.

VII.3- La Guanosine Monophosphate cyclique (GMPc)

Le GMP cyclique, découvert en 1971 par Hardman, résulte de l'hydrolyse du GTP par la guanylate cyclase soluble (GC)^{408,409}. Il existe deux types de GC, l'une particulaire, stimulée par les peptides natriurétiques⁴¹⁰, et l'autre cytoplasmique, contenant un groupement prosthétique hème. Cette forme soluble est activée par le NO⁴¹¹ et le monoxyde de carbone (CO)⁴¹². Il est ensuite dégradé en GMP 5' par des PDEs. La concentration intracellulaire, et par extension les effets biologiques du GMPc, sont définis par l'équilibre entre sa synthèse et sa dégradation.

Le GMP cyclique est un second messager du NO, qui agit en tant qu'antagoniste de l'AMPc sur l'activité des protéines kinases, il joue un rôle similaire mais pas identique à celui de l'AMPc⁴¹³. Le GMPc agit sur plusieurs cibles intracellulaires. Alors que la principale cible de l'AMPc est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), le GMPc possède différentes cibles intracellulaires. Ce nucléotide cyclique active notamment la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG), la PKA, des canaux ioniques CNG et HCN, les PDE2, 5, 6, 10 et 11 et inhibe la PDE3^{414,415}. Son rôle est particulièrement important dans la relaxation et le tonus du muscle lisse vasculaire⁴¹⁶, la régulation des flux aqueux intestinaux, et dans la signalisation rétinienne.

VII.4- La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG)

La protéine kinase G est une Ser/Thr kinase, homologue de la protéine kinase A, mais activée par le GMPc. Elle est située dans la fraction soluble du cytoplasme. Deux isoformes de la PKG sont présents chez les mammifères : la PKG de type I et celle de type II. La PKG de type I est formée de deux sous-unités identiques de 78 kDa chacune⁴¹⁷, comprenant chacune un site catalytique et deux sites de fixation du GMPc. La PKG de type II est constituée d'un monomère de 86 kDa ; elle est localisée jusqu'à présent uniquement au niveau des cellules épithéliales intestinales⁴¹⁸, du cerveau et des cartilages. La PKG de type I existe sous forme soluble dans de nombreux types cellulaires, notamment dans la CMLVs, l'intestin, les plaquettes sanguines, le cervelet et les corps caverneux. Elle provoque un relâchement des fibres musculaires lisses (hypotension, ralentissement du transit intestinal, ...) et inhibe l'aggrégation plaquettaire.

L'augmentation du taux de GMPc dans la CML est donc associée à une activation de la PKG

qui va phosphoryler différentes protéines^{419,420}. Dans ces cellules, la phosphorylation des protéines cibles de la PKG telles que le phospholamban, provoque une perte d'affinité de celui-ci pour les canaux SERCA qu'il inhibe à l'état déphosphorylé⁴²¹. Ainsi, il y a activation du repompage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique entraînant alors une diminution du Ca^{2+} libre intracellulaire, induisant ainsi une relaxation⁴¹⁷. La relaxation des CMLs sous l'effet d'agents induisant l'augmentation intracellulaire du GMPc est, au moins en partie, régulée par la PKG.

L'effet relaxant de cette kinase est associé à sa capacité à phosphoryler la petite protéine G RhoA au niveau de la sérine 188. Cette phosphorylation entraîne une inhibition de la translocation de RhoA à la membrane, l'empêchant ainsi d'activer ses effecteurs participant à la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile et à l'organisation du cytosquelette d'actine^{132,133}.

OBJECTIF

Le Tonus Myogénique (TM) est un mécanisme aussi complexe qu'il est important dans la régulation des débits sanguins locaux. Son induction fait intervenir différents éléments activant un grand nombre de voies de signalisation encore mal connues. La place du TM dans le développement de certaines pathologies telles que l'hypertension, le diabète ou les myopathies fait de lui une cible intéressante pour d'éventuels traitements. Cependant, cibler un tel mécanisme nécessite une identification précise de protagonistes moléculaires et de leur rôle au cours du développement de cette contraction.

Cette thèse avait pour objectif principal d'approfondir nos connaissances sur les différents intervenants impliqués dans le développement du TM. Comme nous l'avons présenté précédemment, les voies de signalisation et les mécanosenseurs intervenant dans le TM sont divers. Un élément tel que Rho-kinase tient un rôle important dans la réactivité vasculaire et plus particulièrement dans le TM via son rôle dans la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile. Nous nous sommes donc particulièrement intéressé à des éléments pouvant moduler ou être modulés par cette voie.

C'est dans cette optique que nous avons dans un premier travail étudié l'activation de RhoA et son interaction avec la cavéoline-1 dans le développement du TM. En effet, connaissant la nécessité d'une translocation de RhoA à la membrane cellulaire pour son activation ainsi que le rôle des cavéoles dans le contrôle de l'activité des enzymes membranaires, il était important de déterminer une éventuelle interaction entre ces deux protagonistes ; tous deux impliqués dans le TM.

Notre deuxième travail a porté sur l'implication de Notch3 dans la régulation du TM. Sachant que l'absence de ce récepteur engendre une altération de la structure et du cytosquelette des CMLs spécifiquement au niveau des artères de résistance, il était pertinent pour nous d'étudier quelles conséquences une telle absence aurait sur la réactivité vasculaire.

La troisième partie a consisté en l'analyse de SRF dans la réactivité vasculaire des artères de résistance. La place de SRF en aval de la voie RhoA/Rho-kinase ainsi que son rôle dans la régulation de l'expression de protéines du cytosquelette et de protéines contractiles faisait de lui un bon candidat dans la régulation de la réactivité microvasculaire.

A travers notre dernière étude, d'un intérêt plus clinique, nous avons voulu mettre en évidence l'influence qu'avait un traitement chronique avec un inhibiteur de la PDE5 tel que le Sildénafil, inhibant l'activité de RhoA, ainsi que son arrêt, sur le TM.

RESULTATS

ARTICLE 1

RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries.

Cardiovascular Research 73 (2007) 190–197

Caroline Dubroca^a, Xavier Loyer^a, Kevin Retailleau^{d,e}, Gervaise Loirand^b, Pierre Pacaud^b, Olivier Feron^c, Jean-Luc Balligand^c, Bernard I. Lévy^a, Christophe Heymes^a, Daniel Henrion^{d,e}

^a Centre de Recherche Cardiovasculaire Lariboisière, INSERM U689, Paris, France

^b Institut du Thorax, INSERM Unit 533, Nantes, France

^c Unit of Pharmacology and Therapeutics UCL-FATH5349, Brussels, Belgium

^d CNRS UMR 6214, Angers, France

^e INSERM U771, Angers, France

Résumé :

L'importance de la Rho-kinase dans le développement du tonus myogénique (TM) était un fait établi uniquement par l'utilisation *in vitro* de bloqueurs pharmacologiques de sélectivité variable. Cependant l'induction de cette voie, et plus particulièrement la translocation de RhoA à la membrane pour son activation lors d'une augmentation de pression, restait à démontrer, et surtout constituerait une preuve plus formelle de son implication. La description des cavéoles, et plus précisément de la cavéoline-1, comme un élément important dans la fonction vasculaire, nous a amenés à réfléchir à l'existence et la nécessité d'un lien entre la pression, l'activation de RhoA et la cavéoline-1.

Cette étude a été faite sur des artères mésentériques de rats canulées entre deux micropipettes dans un artériographe et soumises à des paliers de pression croissants (25, 75, 150 mmHg). L'utilisation d'inhibiteur de RhoA (TAT-C3) et de la Rho-kinase (Y27632) réduit respectivement le TM de 90,5% et 91,8% à 150 mmHg. La destruction des cavéoles avec de la méthyl- β -cyclodextrine inhibe de 66% le TM à 150 mmHg. Cette étude a été complétée par l'utilisation d'un modèle de souris déficientes en Cav-1. Ces souris présentent une contraction en réponse à une pression de 150 mmHg de 9.1 ± 3.7 μm alors qu'elle est de 32.3 ± 2.8 μm chez les souris contrôles. Pour finir, la colocalisation par microscopie confocale, ainsi que la co-immunoprécipitation de Cav-1 et de RhoA à ces différentes pressions, montrent que la localisation de RhoA à la membrane et son association avec Cav-1 augmente avec le développement du TM à 150 mmHg. Cet effet est inhibé par le TAT-C3 et l'Y27632.

En conclusion, l'activation de RhoA est une étape importante dans le développement du TM nécessitant la translocation de cette protéine à la membrane où elle interagit avec Cav-1 au niveau des cavéoles. Ce complexe permet l'activation de Rho-kinase et la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile intervenant dans la contraction.

RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries

Caroline Dubroca^a, Xavier Loyer^a, Kevin Retaillieu^{d,e}, Gervaise Loirand^b, Pierre Pacaud^b, Olivier Feron^c, Jean-Luc Balligand^c, Bernard I. Lévy^a, Christophe Heymes^a, Daniel Henrion^{d,e,*}

^a Centre de Recherche Cardiovasculaire Lariboisière, INSERM U689, Paris, France

^b Institut du Thorax, INSERM Unit 533, Nantes, France

^c Unit of Pharmacology and Therapeutics UCL-FATH5349, Brussels, Belgium

^d CNRS UMR 6214, Angers, France

^e INSERM U771, Angers, France

Received 29 March 2006; received in revised form 5 October 2006; accepted 25 October 2006

Available online 10 November 2006

Time for primary review 37 days

Abstract

Objective: Myogenic tone, which has a major role in the regulation of local blood flow, refers to the ability of vascular smooth muscle to adapt its contractility to changes in transmural pressure. Although Rho-kinase is involved in myogenic tone, the pathway involved remains unclear, especially concerning translocation to the plasma membrane and activation of RhoA. As caveolae have a key role in the signal transduction of membrane-bound proteins, we tested the hypothesis that RhoA might be activated by pressure and that its activation might involve caveolin-1, which has been shown to be involved in vascular functions.

Methods: Myogenic tone was studied in isolated rat mesenteric resistance arteries (118±15 µm internal diameter with a pressure of 75 mmHg) submitted to pressure steps (25, 75, and 150 mmHg). Pharmacological blockade of caveolae or RhoA–Rho-kinase pathway was assessed by confocal microscopy in pressurized arteries to analyze protein co-localization and by co-immunoprecipitation in order to confirm protein interactions. Caveolin-1-deficient mice were used to confirm the role of the protein in myogenic tone.

Results: Pressure-induced myogenic tone was significantly reduced by RhoA inactivation with TAT-C3 (90.5% inhibition at 150 mmHg) and by the Rho-kinase inhibitor Y27632 (91.8% inhibition at 150 mmHg). In arteries pressurized at 150 mmHg, RhoA was localized to the plasma membrane (localization by confocal microscopy and increased quantity of RhoA in the membrane fraction after protein extraction). Thus, translocation of RhoA to the plasma membrane was associated with pressure-induced tone. In addition, caveolae disruption with methyl-β-cyclodextrin reduced myogenic tone by 66% at 150 mmHg. Further, myogenic tone was significantly reduced to 24% of control in caveolin-1-deficient mice (active tone was 32.3±2.8 µm and 9.1±3.7 µm in +/+ and -/- mice, respectively, n=5 per group), suggesting a key role of caveolin-1 in myogenic tone. Finally, RhoA and caveolin-1 co-immunoprecipitation and co-localization significantly increased when myogenic tone developed at 150 mmHg (co-localization showed 26±13% merging at 25 mmHg versus 97±21% at 150 mmHg, n=5). Co-immunoprecipitation was prevented by TAT-C3 and by methyl β-cyclodextrin.

Conclusion: RhoA activation is critical for the development of myogenic tone in resistance arteries. This activation induced translocation of RhoA to the plasma membrane within caveolae, where the interaction of RhoA with caveolin-1 leads selectively to the activation of a Rho-kinase-dependent force development.

© 2006 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V.

Keywords: Mechanotransduction; Contractile function; Vasoconstriction; Blood pressure; Caveolae

* Corresponding author. Department of Integrated Neurovascular Biology, UMR CNRS 6214–INSERM 771, Faculté de Médecine, 49045 Angers, France. Tel.: +33 2 41 73 58 45; fax: +33 2 41 73 58 95.

E-mail address: daniel.henrion@univ-angers.fr (D. Henrion).

1. Introduction

Myogenic tone (MT) refers to the ability of resistance arteries vascular smooth muscle to alter its state of contractility in response to changes of transmural pressure; vessels constrict in response to an increase in intravascular pressure and dilate as a result of decreased pressure [1,2]. Myogenic tone is modified in most metabolic and cardiovascular disorders although changes in myogenic tone do not affect similarly all vascular beds. The mechanisms involved in myogenic tone are not yet fully understood, mainly because of the heterogeneity of the blood vessels developing myogenic tone but also because of the size of resistance arteries; myogenic being usually absent or very low in arteries with internal diameter higher than 200 μm [1].

Myogenic tone requires membrane depolarization, opening of voltage-operated calcium channels [3–5] and Ca^{2+} sensitization of the contractile apparatus contributes to MT [6–8]. Rho-kinase inhibition attenuates MT through a reduction in the contractile apparatus sensitivity to calcium [8–13]. Similarly, we have shown the role of Rho-kinase in MT in rabbit facial veins [14]. Like other members of the Ras superfamily, RhoA regulates intracellular signalling pathways by cycling between active, GTP-bound and inactive, GDP-bound states. The hallmark of the Rho family is their dual subcellular localization into membrane-associated and soluble forms [15]. This reflects the presence of an inactive cytosolic pool of the proteins bound to the Rho-dissociation inhibitor (Rho-GDI) and of an active pool located to the plasma membrane [16]. The mechanisms governing the association of Rho proteins to membranes and the activation of their effector molecules remain largely unknown in a number of processes including contraction in vascular smooth muscle.

Caveolae are abundant in vascular cells and content caveolin [17,18]. They are important platforms for signal transduction [1,17,19–21]. Several studies have suggested, in cultured endothelial and smooth muscle cells, that RhoA might be linked to caveolae-enriched membrane domains, through interaction with caveolin-1 [22]. Indeed, caveolins interact with a variety of signal-transducing molecules and regulate their activity [19,23]. A short N-terminal cytoplasmic region of caveolin-1 called “scaffolding domain” is critical for these regulatory interactions. In caveolin-1 deficient mice calcium sparks frequency in cerebral arteries smooth muscle cells is decreased, suggesting a lower MT in these arteries. [24].

Thus, we hypothesized that pressure-induced MT, in resistance arteries, might involve RhoA activation through interaction with caveolae-associated proteins such as caveolin-1. This interaction with proteins contained in caveolae might have a key role in the activation of Rho-kinase and then in the calcium sensitization of the contractile apparatus needed for the development of myogenic tone.

2. Experimental procedures

2.1. Isolated mesenteric resistance arteries

Mesenteric resistance arteries from 12-week-old Wistar rats were isolated and cannulated at both ends in a video monitored perfusion system [25] (LSI, Burlington, VT) as previously described [26,27]. Briefly, arteries were bathed in a physiological salt solution. After stabilization (30 min) at 75 mmHg, internal diameter changes were measured when intraluminal pressure was increased from 25 to 150 mmHg. Pressure was then set at 75 mmHg, prior to a second series of pressure steps, arteries were exposed or not to TAT-C3 exoenzyme (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 hours, Y27632 (10 μM) for 30 min or methyl β -cyclodextrin (m β cd, 10 mM) for 2 hours. At the end of each experiment arteries were bathed in a Ca^{2+} -free physiological salt solution containing EGTA (2 mM) plus sodium nitropruside (10 μM) and pressure steps were repeated in order to determine the arteries passive diameter [26,27]. MT was quantified as the difference between active and passive diameter [26,27]. Third order arteries were used for the study of MT (118 internal diameter with a pressure of 75 mmHg). The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

In a separate series of experiments mesenteric arteries (second order) were isolated from mice lacking the gene encoding for caveolin-1 (gift from Pr. Balligand (Unit of Pharmacology and Therapeutics UCL-FATH5349, Brussels, Belgium). They were submitted to the protocol described above for the measurement of MT.

The procedure followed in the care and euthanasia of the study animals was in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals (authorization no. 00577).

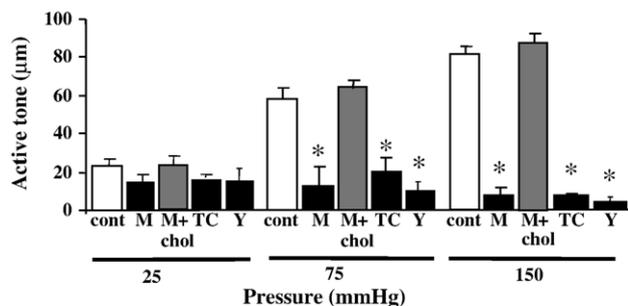


Fig. 1. Effect of caveolae and RhoA–Rho-kinase alteration on myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. Effect of methyl β -cyclodextrin (M, 10 mM), cholesterol-saturated methyl β -cyclodextrin (M+chol), TAT-C3 (TC, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or Y27632 (Y, 10 μM) on MT in third order mesenteric resistance arteries submitted to an intraluminal pressure of 25, 75 and 150 mmHg. Data is expressed as difference between passive and active diameter induced by pressure (active tone). Mean \pm sem is presented ($n=5$ per group). * $P<0.05$, versus control.

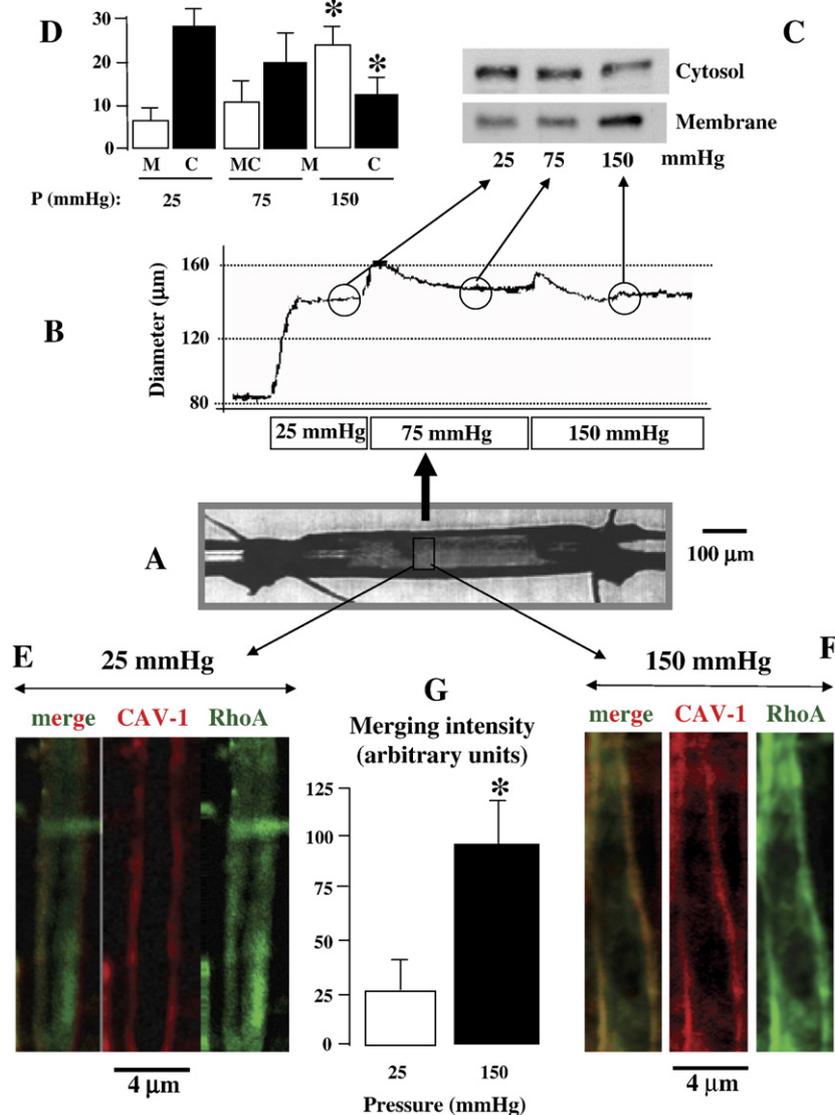


Fig. 2. Translocation of RhoA from the cytosol to the plasma membrane and colocalization with caveolin-1 (CAV-1) in mesenteric resistance arteries developing MT. Panel A shows an isolated artery cannulated between two glass pipettes and pressurized to 25, 75 or 150 mmHg. The internal diameter measured under different pressure levels is shown as a typical recording in panel B. Translocation of RhoA from the cytosolic fraction to plasma membrane was measured in segments of mesenteric resistance arteries under an intraluminal pressure of 25, 75 or 150 mmHg. Blots in panel C are representative of 4 experiments (15 pressurized arteries per experiment, $n=4$ rats). Panel D: quantification of the blots. * $P < 0.05$, versus control (25 mmHg). In the same conditions, arteries pressurized at 25 (panel E) or 150 mmHg (panel F) were fixed and analyzed with confocal microscopy. CAV-1 and RhoA were colocalized using 2 different fluorescence intensities. Merging was quantified in the 2 conditions of pressure ($n=5$ arteries per condition, isolated from 5 rats, panel G). * $P < 0.05$, 150 versus 25 mmHg.

2.2. Western blotting and immunoprecipitation experiments

Tissue extraction was performed as previously described [28,29]: arterial segments were pressurized as described above and after stabilization under a pressure of 25, 75 or 150 mmHg arterial segments were quickly frozen. Arteries (5 per group) were then pulverized in liquid nitrogen. The powders were resuspended in lysis buffer [500 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 20% sodium dodecyl sulfate, 100 mmol/L sodium orthovanadate, and protease inhibitors (Boehringer Mannheim)].

In a separated series of experiments, a minimum of 15 small resistance arteries were used per group in order to

provide sufficient protein for reliable separation of cytosolic and particulate fractions. Frozen vascular segments were pulverized in liquid nitrogen. The powders were resuspended in ice-cold homogenization buffer of the following composition [3% chaps, 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris pH 7.4, 1 mmol/L DTT and protease inhibitors (Boehringer Mannheim)] and centrifuged at $100\,000 \times g$ for 45 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ (ultracentrifuge; Beckman). The supernatant was collected and is referred to as the cytosolic fraction. Pellets were resuspended, and the membrane proteins were extracted by incubation in 20% sodium dodecyl sulfate lysis buffer (described upper). The extract was centrifuged at $12\,000 \times g$

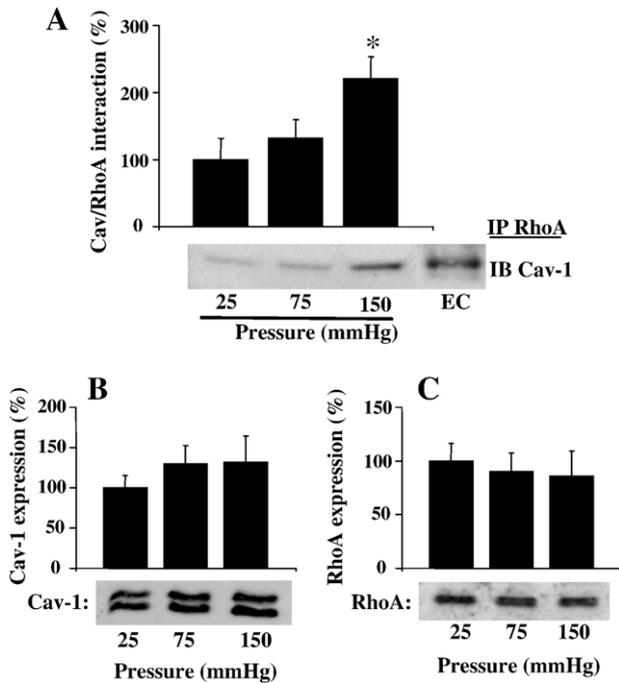


Fig. 3. Panel A: Immunoblot showing association between RhoA and caveolin-1 (Cav-1) at 25, 75 and 150 mmHg. Mesenteric arteries lysates were immunoprecipitated with anti-RhoA monoclonal antibody. Immunoprecipitates (IP) were immunoblotted (IB) for Cav-1 ($n=5$ rats per group, 15–20 pressurized arteries isolated per rat). Lysates of endothelial cells (EC) were used as a positive control for Cav-1 expression. Results, expressed as % of control (25 mmHg), reflect densitometric analysis. Mean \pm sem is presented. * $P<0.05$, 2-factor ANOVA, versus control (25 mmHg). Panel B and C: Western blot showing Cav-1 and RhoA expression in lysates of arteries submitted to 25, 75 and 150 mmHg ($n=4$ rats per group and 15–20 segments of artery were pressurized per rat). Results, expressed as % of control (25 mmHg), reflect densitometric analysis. Mean \pm sem is presented. * $P<0.05$, 2-factor ANOVA, versus control (25 mmHg).

for 10 min at 15 °C. The supernatant was collected as the membrane fraction.

For Western-blot analysis, primary antibodies against RhoA (polyclonal, Santa Cruz) or Cav-1 (monoclonal,

Transduction laboratories) were used. Staining with Ponceau red or reprobing membranes with monoclonal anti- β -actin antibody were used to normalize for loading variations.

For coimmunoprecipitation experiments and in order to obtain undenaturated total caveolin to study protein–protein interaction, nOctylglucoside lysis buffer [30] was employed. Arteries lysates (75 μ g, 15–20 arteries) were incubated overnight at 4 °C with mAb RhoA at a final concentration of 5 μ g/mL in immunoprecipitation (IP) buffer [30]. Anti-mouse IgG-conjugated Agarose was added for 3 hours at 4 °C. After washes with IP buffer, the immunoprecipitates were separated by electrophoresis and immunoblotted with pAb Cav-1 α (Santa Cruz).

2.3. Immunohistochemistry and confocal microscopy

RhoA, actin and caveolin-1 were ascertained and localized by immunohistochemistry sampled after pressurization (25 or 150 mmHg) using an arteriograph as described above. After stabilization, arterial segments were fixed in a 4% buffered formaldehyde solution as previously described [27]. Sections of arteries (7 μ m thick) were incubated with primary RhoA goat antibodies (Santa Cruz, 1:200) and primary caveolin-1 rabbit antibodies (Santa Cruz, 1:100). Sections were then incubated with by the fluorescent (FITC-bound) anti-goat secondary antibody (1:200) and with fluorescent (texas-red-bound) anti-rabbit secondary antibody (1:200). Fluorescence was visualized and quantified using confocal microscopy as previously described [27]. In negative control experiments the primary antibodies were omitted.

2.4. Drugs

Y27632 was purchased from Calbiochem (La Jolla, USA); TAT-C3 exoenzyme was a kind gift of Pierre Pacaud (U533, Nantes, France); all other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, USA).

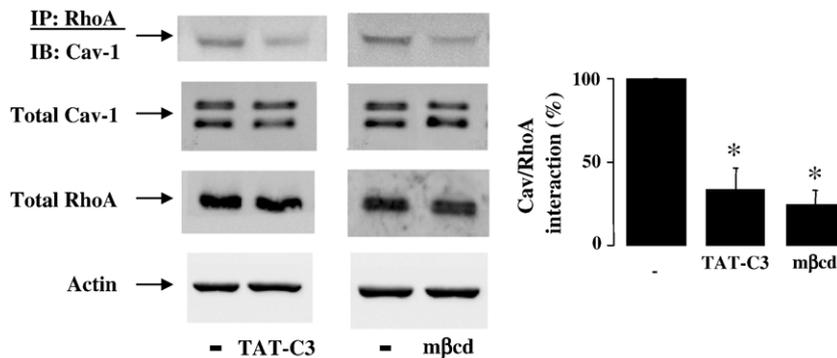


Fig. 4. Immunoblots showing association (co-immunoprecipitation) between RhoA and caveolin-1 (Cav-1) at 150 mmHg in presence or in absence (–) of mβcd or TAT-C3. Immunoprecipitates (IP) were immunoblotted (IB) for Cav-1 ($n=5$ rats per group, 15–20 pressurized arteries isolated per rat). Co-immunoprecipitation, representing Cav-1–RhoA interaction was quantified and is presented as a bargraph (right panel). * $P<0.05$, mβcd or TAT-C3 versus control (–). Total expression of Caveolin-1 (Total Cav-1), RhoA (Total RhoA) and actin was also measured in resistance arteries submitted to a pressure of 150 mmHg in presence or in absence of mβcd or TAT-C3 ($n=3$ per group, one representative blot is shown for each condition).

2.5. Statistical analysis

Results are expressed as mean±SEM. Differences between means were evaluated by 1-way ANOVA or two-tailed Student's paired *t*-test. *P* values <0.05 were considered to be significant.

3. Results

3.1. RhoA–Rho-kinase pathway is involved in the development of myogenic tone

Third order mesenteric resistance arteries (118±15 µm internal diameter with a pressure of 75 mmHg) developed MT in response to pressure (Figs. 1 and 2). Their treatment with the RhoA inhibitor, TAT-C3, or the Rho-kinase inhibitor, Y27632 strongly reduced MT at 75 and 150 mmHg (Fig. 1). At 150 mmHg, TAT-C3 and Y27632 inhibited MT by 95 and 92%, respectively.

3.2. Pressure-induced myogenic tone requires RhoA translocation

Fig. 2 shows an isolated mesenteric resistance artery (A) and a typical recording illustrating the effect of pressure on internal diameter (B). Panel C shows the expression of RhoA in the cytosolic and membrane fractions after extraction of the proteins in pressurized arteries. Quantification of the repartition of RhoA between the cytosolic and membrane fractions is shown in the bargraph (panel D). In the same conditions of pressure confocal microscopy was performed in order to visualize RhoA in the cytosol and at the level of the membrane (Fig. 2E and F). RhoA density was higher at the level of the plasma membrane when pressure was 150 mmHg than under a pressure of 25 mmHg (Fig. 2E and F).

3.3. Role of RhoA–Cav-1 complexes in pressure-induced myogenic tone

In order to investigate the hypothesis that pressure-induced MT might involve caveolae we demonstrated that methyl β-cyclodextrin (mβcd), a caveolar structure disruptor, significantly decreased MT by 80% at 75 mmHg and by 94% at 150 mmHg (Fig. 1). In the reverse experiments (treatment of mesenteric arteries with cholesterol in addition of mβcd), MT was preserved (Fig. 1).

Confocal microscopy (Fig. 2E–G) showed an increased colocalization of RhoA with caveolin-1 at the level of the plasma membrane when pressure was 150 mmHg than under a pressure of 25 mmHg with a merging of 25±12 (arbitrary units) at 25 mmHg versus a merging of 93±17% at 150 mmHg (*n*=5, Fig. 2G).

Immunoprecipitation experiments demonstrated that pressure-induced MT was associated with a significant increase in the amount Cav-1–RhoA complexes (221 at 150 mmHg and 132% at 75 mmHg, as compared 25 mmHg, 100%, Fig. 3A).

Total RhoA and Cav-1 protein expression was not significantly affected in the different conditions of pressure (Fig. 3B and C).

3.4. TAT-C3 and cholesterol depletion prevents RhoA–Cav-1 interaction

Both RhoA and Cav-1 protein expression were similar in arteries submitted or not to TAT-C3 exoenzyme treatment, which inactivates RhoA by ADP ribosylation. However, TAT-C3 incubation induced a marked and significant

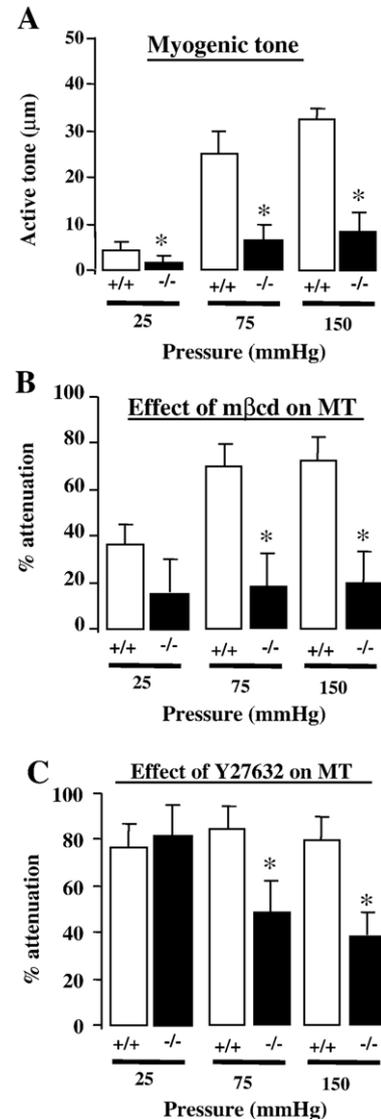


Fig. 5. Myogenic tone in mesenteric resistance arteries isolated from mice lacking the gene encoding for caveolin-1. Panel A: Myogenic tone was determined in third order mesenteric resistance arteries submitted to an intraluminal pressure of 25, 75 and 150 mmHg. Arteries were isolated from caveolin-1 deficient mice (–/–) and their littermate control (+/+). The effect of methyl β-cyclodextrin (10 mM, panel B) and Y27632 (10 µM, panel C) on MT in third order mesenteric resistance arteries submitted to an intraluminal pressure of 25, 75 and 150 mmHg was determined in –/– and +/+ mice. Data is expressed as difference between passive and active diameter. Mean±sem is presented (*n*=5 per group). **P*<0.05, –/– versus +/+ mice.

decrease in the physical association between these two proteins at 150 mmHg, as compared to control condition (Fig. 4).

Although protein expression for both RhoA and Cav-1 was unchanged whatever the experimental conditions, m β cd treatment also significantly reduced pressure-induced increase in RhoA and Cav-1 co-immunoprecipitation (Fig. 4).

3.5. Myogenic tone in mice lacking caveolin-1

Second order mesenteric resistance arteries (106 \pm 8 μ m internal diameter with a pressure of 75 mmHg) developed MT in response to pressure in +/+ mice whereas in -/- mice MT remained low (Fig. 5A). Indeed, MT in -/- mice represented 24% of MT in +/+ mice (calculated from the data shown in Fig. 5A at 150 mmHg for MT: active tone was 32.3 \pm 2.8 μ m and 9.1 \pm 3.7 μ m in +/+ and -/- mice, respectively).

In mice mesenteric arteries treated with the m β cd MT at 75 and 150 mmHg was significantly reduced (Fig. 5B). The inhibitory effect of m β cd was significantly less important in -/- than in +/+ mice (Fig. 5B).

Similarly, the treatment of mice mesenteric arteries with the Rho-kinase inhibitor, Y27632 strongly reduced MT at 75 and 150 mmHg (Fig. 5C). The inhibitory effect of Y27632 was significantly less important in -/- than in +/+ mice (Fig. 5C).

4. Discussion

The present study demonstrates that pressure-induced myogenic tone involves the activation of RhoA through its translocation to the plasma membrane and its association to caveolin-1. Indeed, activation of RhoA through its association with caveolin-1 represents a new step in the understanding of MT.

We found that methyl β -cyclodextrin (m β cd) reduced significantly MT. This effect was due to cholesterol extraction from the plasma membrane, because cholesterol-saturated m β cd did not modify MT. This finding is consistent with previous works demonstrating that cholesterol depletion impaired contraction induced by agonists such as 5-hydroxytryptamine, vasopressin, and endothelin in the rat tail artery [31,32]. We also found that MT was strongly attenuated in caveolin-1 deficient mice. This is in agreement with a previous study showing, in cerebral arteries isolated from caveolin-1 deficient mice, that calcium sparks frequency (important for the development of MT) is decreased. [24]. Indeed, a large body of evidence suggests that cholesterol depletion affects signaling mechanisms located in caveolae including calcium sparks [31,33,34]. The possibility remains that the reduction in MT is linked, at least in part, to alter membrane fluidity and particularly liquid-ordered state normally present in either rafts or caveolae. Indeed, removal of cholesterol from the plasma membrane could increase wall stiffness and alter mechanical forces acting on resident proteins. However, it has been shown that cholesterol depletion only minimally affects myofilaments and force transmission [33].

We also found that both RhoA inactivation (TAT-C3) and Rho-kinase inhibition (Y27632) inhibited MT. This is consistent with previous studies showing that Y27632 attenuates MT due to reduction in calcium sensitivity of the contractile apparatus [8,13,14]. Rho-kinase inhibition strongly inhibits MT in the rabbit facial vein [13] and in the rat mesenteric artery [8], whereas Y27632 partly reduces MT in the rat-tail artery [14]. The use of TAT-C3 further supports the importance of this pathway in MT. The C3 enzyme selectively catalyzes the ADP-ribosylation, and consequent inactivation, of RhoA. Thus, this experiment provides an earlier event in the cascade between pressure and contraction (MT).

A main finding of the present study is that MT was associated with the translocation of RhoA from the cytosol to the plasma membrane and with its association to caveolin-1. Although several studies have demonstrated, in cultured endothelial and smooth muscle cells, the association of RhoA with caveolae-enriched membrane domains [22,23], the potential involvement of such an interaction in mediating Rho activation and a contraction, was not addressed. Our results demonstrated that 1) RhoA and caveolin-1 interact in response to pressure; 2) m β cd attenuated MT and prevented the interaction between RhoA and caveolin-1, 3) caveolin-1 deficiency strongly impaired MT and 4) TAT-C3, inhibited MT, the translocation of RhoA to the membrane and its association with caveolin-1. Thus, our results suggest that the translocation of RhoA within caveolae is necessary for the transduction of pressure into MT. This is consistent with previous studies showing that peptide blocking caveolin-1 scaffolding domain (CSD) inhibits agonist-induced RhoA translocation [23] and reduces the contractility of the ferret aorta [35].

Although caveolin-1 is generally described as a negative regulator of molecules functions [20,36–38], our study suggested that caveolin-1 may regulate in a positive manner RhoA activation. To confirm this hypothesis, we evaluated the link between RhoA activation and its association with caveolin-1 using the RhoA inhibitor TAT-C3. Treatment of mesenteric resistance arteries with TAT-C3 inhibited both MT and the formation of a complex between caveolin-1 and RhoA. Hence, the present study strongly suggests that translocation of RhoA to caveolae and that its association with caveolin-1 may facilitate the subsequent activation of Rho-kinase. This is supported by recent studies demonstrating that the sites of monoglycosylation and ADP ribosylation of RhoA, which inhibit calcium sensitization and/or RhoA translocation, are both contained within the putative caveolin-binding motif of RhoA [23,39].

As described in review articles [1,40], the rise in pressure initiating myogenic tone in resistance arteries is thought to activate rapid cell architecture distension and the opening of stretch-activated cationic channels. This is followed by membrane depolarization and opening of voltage-gated Ca²⁺ channels [3]. In addition, other pathways are activated leading to sensitization of the contractile apparatus to calcium and cytoskeletal rearrangements [41]. This process most certainly involves integrins as recently shown [42].

Indeed, integrins are an important link between the extracellular and intracellular environments allowing transmission of inside-out and outside-in signals. Our study further supports the hypothesis that activation of integrins and focal-adhesion kinase in caveolin-1 rich domains may then participate in the Rho-kinase dependent sensitization of the contractile apparatus to calcium [7–9]. Nevertheless, the sequence is still lacking several components. We can speculate that after stimulation by pressure, integrins and focal-adhesion kinase activate tyrosine kinases. Indeed, several kinases have been shown to be involved in the development of myogenic tone [12]: PKC (6), PLC [43] and the p38-MAP kinase [14]. These kinases, in addition to the initial rise in intracellular calcium concentration [44], might play a role in the activation of RhoA as shown in contraction induced by agonists such as angiotensin II [45]. RhoA activation is associated with its translocation to the plasma membrane [45] and, as shown in the present study, linked to caveolin-1 in order to subsequently activate the Rho-kinase pathway. Finally, the integrin-dependent activation of kinases is certainly followed by the activation of Rho guanine exchange factors or Rho GEFs [46]. The Rho GEFs constitute a large family comprising ~70 members in humans, that activate Rho proteins by promoting the release of GDP and then facilitating the binding of GTP [47]. Although RhoA GEFs are involved in angiotensin II-dependent stimulation of RhoA in vascular smooth muscle cells (46), little is known regarding GEFs expression and activity in arteries. Thus, future experiments will have to determine the identity of GEF (s) involved in pressure-induced RhoA activation leading to myogenic tone in resistance arteries.

In summary, we demonstrated that MT required translocation of RhoA in caveolae and its activation mediated by the association of RhoA with caveolin-1. Our study provides important mechanical basis by which caveolin-1 can regulate the integration of extracellular contractile stimuli and the downstream intracellular effectors in smooth muscle. The mechanism described provides new target for investigating the role of MT in cardiovascular diseases. Indeed, MT is a key element in the control of resistance arteries tone, mainly through its interaction with other vasoactive systems; the sympathetic system being the most important one.

Acknowledgments

Caroline Dubroca was supported by a grant from the French Foundation for Medical Research (Fondation pour la Recherche Médicale: FRM, Paris, France).

This work was supported in part by a grant from the French Association against Myopathies (AFM, Paris, France).

References

- [1] Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries: role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98:913–21.
- [2] Prewitt RL, Rice DC, Dobrian AD. Adaptation of resistance arteries to increases in pressure. *Microcirculation* 2002;9:295–304.
- [3] Wesselman JP, VanBavel E, Pfaffendorf M, Spaan JA. Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res* 1996;33:32–41.
- [4] Wesselman JP, Schubert R, VanBavel ED, Nilsson H, Mulvany MJ. KCa-channel blockade prevents sustained pressure-induced depolarization in rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol* 1997;272:H2241–9.
- [5] Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992;256:532–5.
- [6] Laher I, Bevan JA. Protein kinase C activation selectively augments a stretch-induced, calcium-dependent tone in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;242:566–72.
- [7] VanBavel E, Wesselman JP, Spaan JA. Myogenic activation and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Circ Res* 1998;82:210–20.
- [8] VanBavel E, van der Meulen ET, Spaan JA. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Exp Physiol* 2001;86:585–9.
- [9] Gong MC, Iizuka K, Nixon G, Browne JP, Hall A, Eccleston JF, et al. Role of guanine nucleotide-binding proteins—ras-family or trimeric proteins or both—in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1340–5.
- [10] Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Somlyo AP. Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* 1997;272:10704–9.
- [11] Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 1992;267:8719–22.
- [12] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990–4.
- [13] Schubert R, Kalentchuk VU, Krien U. Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2288–95.
- [14] Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension* 2005;45:974–9.
- [15] Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* 1992;119:617–27.
- [16] Regazzi R, Kikuchi A, Takai Y, Wollheim CB. The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. *J Biol Chem* 1992;267:17512–9.
- [17] Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:31–9.
- [18] Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 2001;106:403–11.
- [19] Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998;273:5419–22.
- [20] Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999;19:7289–304.
- [21] Anderson RG, Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 2002;296:1821–5.
- [22] Taggart MJ, Leavis P, Feron O, Morgan KG. Inhibition of PKCalpha and rhoA translocation in differentiated smooth muscle by a caveolin scaffolding domain peptide. *Exp Cell Res* 2000;258:72–81.
- [23] Shaul PW, Anderson RG. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 1998;275:L843–51.
- [24] Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001;293:2449–52.
- [25] Halpern W, Osol G, Coy GS. Mechanical behavior of pressurized in vitro prearteriolar vessels determined with a video system. *Ann Biomed Eng* 1984;12:463–79.

- [26] Henrion D, Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, et al. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest* 1997;100:2909–14.
- [27] Loufrani L, Matrougui K, Gorny D, Duriez M, Blanc I, Levy BI, et al. Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation* 2001;103:864–70.
- [28] Loufrani L, Lehoux S, Tedgui A, Levy BI, Henrion D. Stretch induces mitogen-activated protein kinase activation and myogenic tone through 2 distinct pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2878–83.
- [29] Matrougui K, Eskildsen-Helmond YE, Fiebeler A, Henrion D, Levy BI, Tedgui A, et al. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2000;36:617–21.
- [30] Ratajczak P, Damy T, Heymes C, Oliviero P, Marotte F, Robidel E, et al. Caveolin-1 and -3 dissociations from caveolae to cytosol in the heart during aging and after myocardial infarction in rat. *Cardiovasc Res* 2003;57:358–69.
- [31] Bergdahl A, Gomez MF, Dreja K, Xu SZ, Adner M, Beech DJ, et al. Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca²⁺ entry dependent on TRPC1. *Circ Res* 2003;93:839–47.
- [32] Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Trandum-Jensen J, Hellstrand P, Sward K. Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1267–72.
- [33] Zeidan A, Broman J, Hellstrand P, Sward K. Cholesterol dependence of vascular ERK1/2 activation and growth in response to stretch: role of endothelin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1528–34.
- [34] Kawabe J, Okumura S, Lee MC, Sadoshima J, Ishikawa Y. Translocation of caveolin regulates stretch-induced ERK activity in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1845–52.
- [35] Je HD, Gallant C, Leavis PC, Morgan KG. Caveolin-1 regulates contractility in differentiated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H91–8.
- [36] Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, et al. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* 1995;270:15693–701.
- [37] Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galph α subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271:29182–90.
- [38] Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997;272:25907–12.
- [39] Taggart MJ. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci* 2001;16:61–5.
- [40] Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 1999;79:387–423.
- [41] Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J* 2002;16:72–6.
- [42] Martinez-Lemus LA, Crow T, Davis MJ, Meininger GA. α 5 β 1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol* 2005;289:H322–9.
- [43] Osol G, Laher I, Kelley M. Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries. *Am J Physiol* 1993;265:H415–20.
- [44] Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325–58.
- [45] Pacaud P, Sauzeau V, Loirand G. Rho proteins and vascular diseases. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98:249–54.
- [46] Ying Z, Jin L, Palmer T, Webb RC. Angiotensin II up-regulates the leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF), a regulator of G protein signaling domain-containing RhoGEF, in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2006;69:932–40.
- [47] Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:167–80.

ARTICLE 2

Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Dec;28(12):2216-24.

E.J. Belin de Chantemèle^{1,2,3}, K. Retailleau^{1,2,3}, F. Pinaud⁴, E. Vessières^{1,2,3}, A Bocquet^{1,2,3}, A.L. Guihot^{1,2,3}, B. Lemaire^{5,6}, V. Domenga^{5,6}, C. Baufreton⁴, L. Loufrani^{1,2,3}, A. Joutel^{5,6,7}, and D. Henrion^{1,2,3,4}

¹INSERM U771, Angers, F-49045, France

²CNRS UMR 6214, Angers, F-49045, France

³Université d'Angers, Angers, F-49045, France

⁴CHU d'Angers, Angers, F-49045, France

⁵INSERM, U740, Paris, F-75010, France

⁶Université Paris 7 - Denis Diderot, Faculté de Médecine
Site Lariboisière, Paris, F-75010, France

⁷AP-HP, Groupe hospitalier LARIBOISIERE-FERNAND-WIDAL
Groupement hospitalier-universitaire Nord,
Laboratoire de Génétique, Paris, F-75010, France

Résumé :

La structure des artères de résistance, et plus particulièrement l'intégrité de leur média, est sous la dépendance de Notch3. Chez l'homme, la mutation de ce récepteur se traduit par le développement de la maladie CADASIL. Les travaux de l'équipe du Dr Joutel ont permis de déterminer que l'une des conséquences de cette maladie est une dégénérescence progressive de la structure des petites artères cérébrales provoquant des accidents ischémiques cérébraux, une paralysie pseudobulbaire et de multiples infarctus sous-corticaux. Chez la souris, la délétion de Notch3 affecte spécifiquement la structure des artères cérébrales et caudales. Cette inhibition de la maturation post-natale induit une malformation des cellules musculaires lisses vasculaires et une désorganisation de la média. Les artères de conductance, exprimant également Notch3, ne sont pas affectées par la délétion de ce récepteur.

Notre étude avait pour objectif d'analyser le rôle de Notch3 dans le contrôle de la réactivité d'artères de résistance et de conductance. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les altérations structurales des artères de résistance auraient un impact sur leur réactivité, et principalement sur leur réponse aux forces de pression et de flux.

Nous nous sommes donc intéressés à la réactivité pharmacologique ainsi qu'à la mécanosensibilité d'une artère de conductance (carotide) et d'artères de résistance (caudales et cérébrales) d'un modèle de souris Knock-out pour Notch3. Le montage de ces artères en artériographie nous a permis d'observer une réduction du TM ainsi qu'une augmentation de la dilatation flux-dépendante au niveau des artères de résistance uniquement. Le diamètre passif, la compliance, ainsi que la réactivité pharmacologique contractile (KCl, Phényléphrine, Angiotensine II, Thromboxane A2) et dilatatrice (Acétylcholine et Nitroprussiate de sodium) des artères de résistance ou de conductance, ne furent pas affectés par la délétion de Notch3. Une diminution de l'effet inhibiteur du Y27632 (inhibiteur de la Rho-Kinase) sur le TM, ainsi qu'une diminution de l'activité de RhoA et de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, ont été mesurées sur des artères caudales de souris Notch3 KO pressurisées. Cela a permis de déterminer que cette modification de la mécanosensibilité était engendrée par une réduction de l'activité de la voie de signalisation RhoA/Rho-Kinase au niveau des artères de résistance.

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous ont donc permis d'identifier Notch3 comme un nouvel effecteur de la voie de signalisation du TM par la modulation de la voie RhoA/Rho-kinase au niveau des artères de résistance (caudales et cérébrales uniquement).

Notch3 Is a Major Regulator of Vascular Tone in Cerebral and Tail Resistance Arteries

E.J. Belin de Chantemèle, K. Retailliau, F. Pinaud, E. Vessières, A. Bocquet, A.L. Guihot, B. Lemaire, V. Domenga, C. Baufreton, L. Loufrani, A. Joutel, D. Henrion

Objective—Notch3, a member of the evolutionary conserved Notch receptor family, is primarily expressed in vascular smooth muscle cells. Genetic studies in human and mice revealed a critical role for Notch3 in the structural integrity of distal resistance arteries by regulating arterial differentiation and postnatal maturation.

Methods and Results—We investigated the role of Notch3 in vascular tone in small resistance vessels (tail and cerebral arteries) and large (carotid) arteries isolated from *Notch3*-deficient mice using arteriography. Passive diameter and compliance were unaltered in mutant arteries. Similarly, contractions to phenylephrine, KCl, angiotensin II, and thromboxane A2 as well as dilation to acetylcholine or sodium nitroprusside were unaffected. However, *Notch3* deficiency induced a dramatic reduction in pressure-induced myogenic tone associated with a higher flow (shear stress)-mediated dilation in tail and cerebral resistance arteries only. Furthermore, RhoA activity and myosin light chain phosphorylation, measured in pressurized tail arteries, were significantly reduced in *Notch3*KO mice. Additionally, myogenic tone inhibition by the Rho kinase inhibitor Y27632 was attenuated in mutant tail arteries.

Conclusions—Notch3 plays an important role in the control of vascular mechano-transduction, by modulating the RhoA/Rho kinase pathway, with opposite effects on myogenic tone and flow-mediated dilation in the resistance circulation. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:2216-2224.)

Key Words: resistance arteries ■ myogenic tone ■ Notch receptors ■ flow-mediated dilation
■ local blood flow regulation

Arteries are specified into different calibers and types of vessels to perform different functions. Schematically, the major arteries of the trunk are elastic arteries of large diameter and low resistance. Elastic conduit arteries absorb the hemodynamic stress of cardiac systole and release this energy in the form of sustained blood pressure during diastole. Conversely, distal arteries are muscular arteries of small diameter and high resistance that are critically involved in local regulation of blood flow. Resistance arteries possess a constant basal tone which is tightly regulated by two mechanical stimuli, ie, flow and pressure; basal tone provides the background tone on which other vasoactive systems may act synergistically.¹⁻³ Flow produces shear stress and triggers dilation, which depends in part on the production of nitric oxide and vasodilator agents, by the endothelial cells.^{1,4,5} Mechano-transduction of shear stress involves the extracellular matrix and cell structure proteins.⁶⁻⁸ Pressure-induced (myogenic) contraction is an inherent property of smooth muscle cells. However the robustness and nature of the response vary significantly with vascular bed and vessel

caliber.^{1,2} The cellular structures and signaling pathways involved in the mechano-transduction of pressure into constriction have not been completely elucidated. Signaling mechanisms require calcium entry as well as calcium-sensitization of the contractile apparatus. Several lines of investigation implicate actin polymerization in myogenic tone.⁹ Furthermore, the RhoA–Rho kinase signaling pathway is a key regulator of the calcium sensitivity and dynamic remodeling of the actin cytoskeleton,¹⁰ and we have recently shown that RhoA activation is essential for the development of myogenic tone.^{11,12}

The Notch signaling pathway is an evolutionarily conserved intercellular signaling mechanism that plays a central role during vascular development and physiology in vertebrates.¹³ The Notch family receptors comprise 4 highly conserved members in human and rodents (Notch1 to Notch4). Among these, Notch3 is primarily expressed in vascular smooth muscle cells,¹⁴ and, recent genetic studies in human and mice have highlighted an important role for this receptor in the development and homeostasis of distal arter-

Original received December 15, 2007; final version accepted September 10, 2008.

From INSERM U771 (E.J.B.d.C., K.R., E.V., A.B., A.L.G., L.L., D.H.), Angers; CNRS UMR 6214 (E.J.B.d.C., K.R., E.V., A.B., A.L.G., L.L., D.H.), Angers; Université d'Angers (E.J.B.d.C., K.R., E.V., A.B., A.L.G., L.L., D.H.), Angers; CHU d'Angers (F.P., C.B., D.H.), Angers; INSERM U740 (B.L., V.D., A.J.), Paris; Université Paris 7 - Denis Diderot (B.L., V.D., A.J.), Faculté de Médecine, Site Lariboisière, Paris; and AP-HP, Groupe hospitalier LARIBOISIERE-FERNAND-WIDAL (A.J.), Groupement hospitalier-universitaire Nord, Laboratoire de Génétique, Paris, France.

Correspondence to Daniel Henrion, PharmD, PhD, INSERM U 771, CNRS UMR 6214, Faculté de Médecine, 49045 Angers, France. E-mail daniel.henrion@univ-angers.fr

© 2008 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.171751

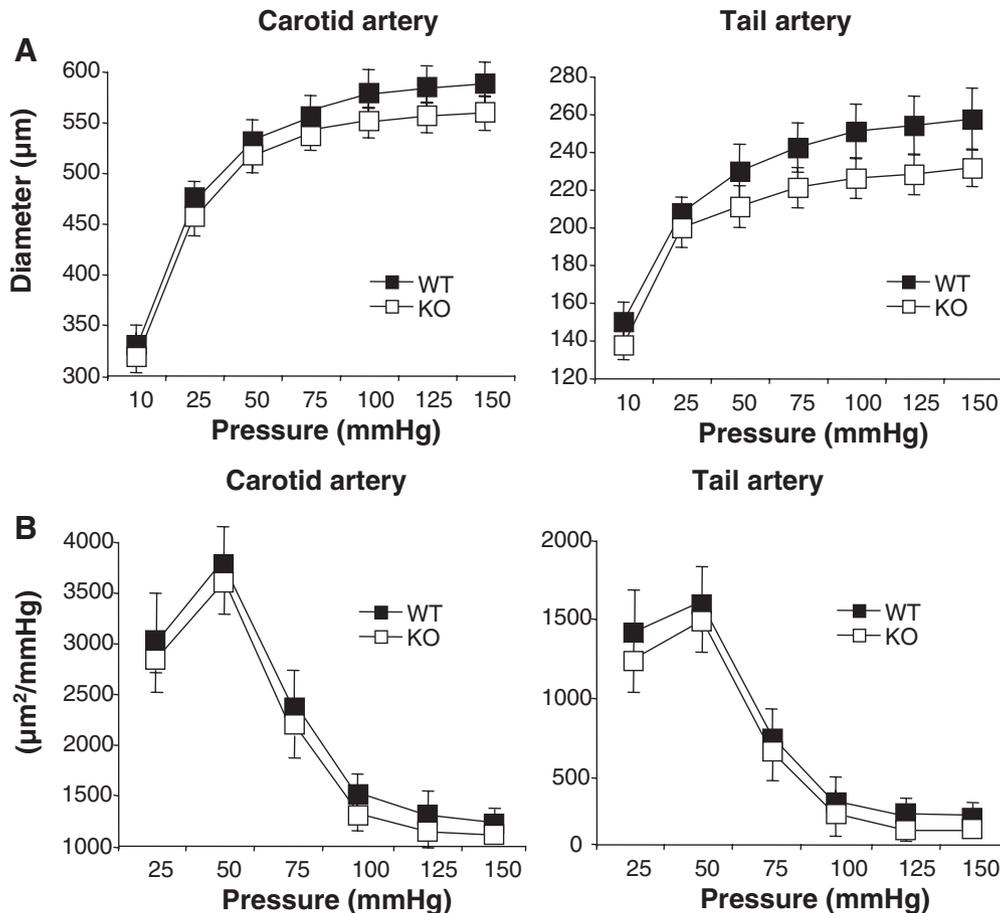


Figure 1. Passive diameter (A) and cross-sectional compliances (B) of carotid and tail caudal arteries from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice (mean ± SEM, n=12 WT and 9 KO; NS, KO vs WT).

ies.¹⁵ In human, mutations of *NOTCH3* cause CADASIL, an autosomal dominant vascular dementia. Neurological symptoms arise because of a slowly progressive small-artery disease, characterized by progressive degeneration of smooth muscle cells of small brain arteries.¹⁶ In the mouse, targeted deletion of the *Notch3* gene does not affect viability nor fertility, but results in structural defects of distal arteries, particularly in the brain and the tail. Specifically, in the absence of *Notch3*, smooth muscle cells of distal arteries exhibit an abnormal shape and cytoskeleton because of an impaired arterial differentiation and postnatal maturation. It is noteworthy that major elastic arteries of the trunk appeared preserved at least at the histological level.^{17,18}

In this study we investigated the role of Notch3 in the function of small (resistance) and large (compliance) arteries. We examined the mechanical properties and vascular reactivity to vasoactive agents or mechanical stimuli of arteries from wild-type and *Notch3*-null mice. We assessed the tail caudal artery and the middle cerebral artery, as distal resistance vessels, and the common carotid artery, a compliance elastic artery with minimum role in arterial resistance. Consistent with our prior observation that elastic artery did not exhibit structural alteration, we found that the mechanical properties and vascular reactivity of mutant carotid arteries were preserved. Importantly, we found that in the tail caudal and middle cerebral arteries, absence of *Notch3* selectively

impaired the response to pressure and flow. Furthermore, RhoA activity and myosin light chain phosphorylation were reduced in pressurized mutant tail arteries, and myogenic tone inhibition elicited by the Rho kinase inhibitor Y-27632 was significantly attenuated in mutant tail arteries. Together these data support a specific role for Notch3 in the mechano-transduction of pressure and flow in the distal resistance arteries through a RhoA/Rho kinase pathway.

Materials and Methods

Notch3^{-/-} mice (KO) and their wild-type littermates (WT) were obtained by crossing *Notch3* heterozygous mice. Adult male mice (n=25 per group) were anesthetized for blood pressure measurement¹⁹ and then killed by CO₂ inhalation. Common carotid, mesenteric, middle cerebral, and tail caudal arteries were collected. Histology was performed as previously described.¹⁷

Pharmacological study was performed on 2-mm-long arterial segments mounted on a wire-myograph.²⁰ Contraction to Phenylephrine (PE), thromboxane A₂ mimetic (U46619)²¹ angiotensin II (AngII), and calcium was tested.²² Concentration-dependent relaxation in response to Acetylcholine (ACh) was performed with or without NO synthase blockade (L-NAME), or cyclooxygenase blockade (indomethacin).²³

Pressure (myogenic) and flow-dependent tone was determined in isolated arteries cannulated in a video monitored perfusion system.²⁴

For Western blotting arterial segments were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen (LN₂). Samples were analyzed for eNOS, p-eNOS, caveolin-1, αV-integrin and β3-integrin, RhoA, P38, pP38, P42, pP42, P44, pP44, FAK, pFAK, MLC, and pMLC. Preliminary

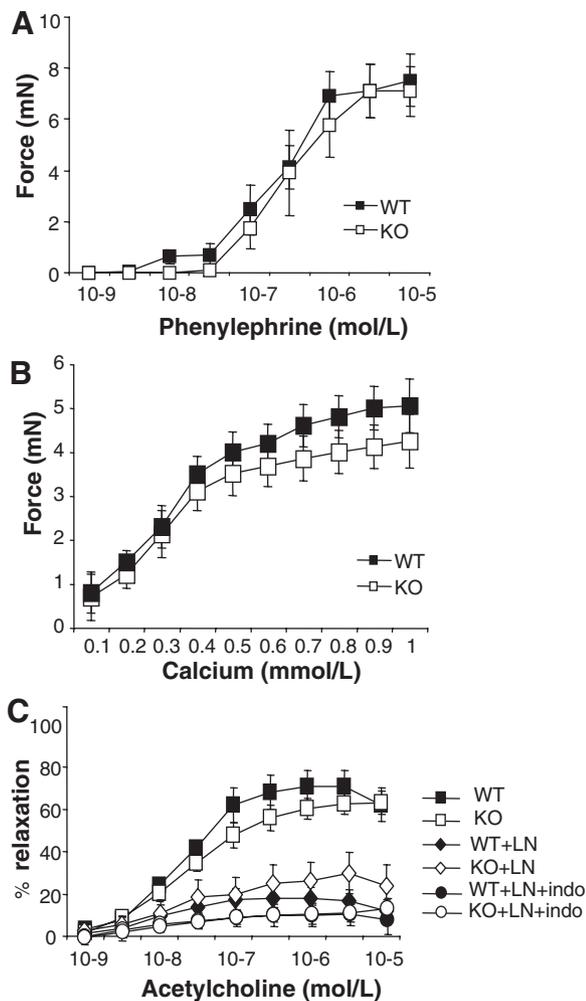


Figure 2. Contraction induced by phenylephrine (A) and calcium (B) and vasodilation induced by acetylcholine (C) in the presence of L-NAME (LN) or L-NAME plus indomethacin (LN+INDO) in tail arteries from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice (mean±SEM, n=12 WT and 9 KO). NS, KO vs WT.

immunoblot analysis showed that comparable results were obtained using freshly isolated arteries as compared to pressurized (75 mm Hg) arterial segments (supplemental Figure I, available online at <http://atvb.ahajournals.org>). RhoA activation was assessed as previously described²⁵ using a Rho-GTP pull-down assay kit.

Statistical Analysis

Results were expressed as means±SE. Significance of the differences between groups was determined by analysis of variance (ANOVA for consecutive measurements for pressure-diameter curves) or 1-way ANOVA followed by Bonferroni or paired *t* test. probability values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Structural and Mechanical Properties of KO Arteries

High-resolution optic microscopy showed structural defects of the mutant caudal artery and middle cerebral artery with thinning and disorganization of the tunica media as previously reported.¹⁷ By contrast, carotid artery of *Notch3*-null mice appeared indistinguishable from the one of WT mice (supplemental Figure II). To determine the effect of absence

Table. Pharmacological Profile of *Notch3*-Deficient (KO) and Wild-Type (WT) Mice Arteries

	Tail Artery		Carotid Artery		Units
	WT	KO	WT	KO	
Phenylephrine					
Emax	7.6±1.0	7.2±0.9	3.2±0.4	3.6±0.4	mN
EC50	323±78	358±65	45±8	37±7	nmol/L
Angiotensin II					
Emax	2.5±0.3	2.4±0.4	1.8±0.3	1.6±0.4	mN
EC50	3.8±0.7	5.1±0.8	39±6	35±6	nmol/L
U 46619					
Emax	6.3±1.0	5.6±0.8	4.8±0.3	5.2±0.5	mN
EC50	52±11	64±15	79±15	86±17	nmol/L
SNP					
I _{max}	98±2	96±3	98±3	95±4	% dilation
IC50	32±7	34±6	25±6	19±5	nmol/L

Contraction to phenylephrine, serotonin (5HT), angiotensin II, and U46619 as well as dilation to sodium nitroprusside (SNP) were obtained in tail and carotid arteries. EC₅₀ and IC₅₀ represent the concentration necessary to reach 50% of the maximal effect; E_{max} and I_{max} give the maximal effect of the drug (n=12 per group). NS, KO vs WT.

of *Notch3* on the passive properties of the vascular wall, arteries were submitted to stepwise increase in intraluminal pressure. Passive arterial diameter (Figure 1A; supplemental Figure VI) and arterial cross sectional compliance (Figure 1B and data not shown) were not significantly different in KO and WT mice.

KCl and Receptor-Dependent Contractions

The contraction induced by KCl (80 mmol/L) was not significantly affected by the absence of *Notch3* in carotid, tail caudal, and middle cerebral arteries (supplemental Figures III and VI). PE, Ang II, and U46619 produced a concentration-dependent contraction in carotid and tail caudal arteries. Importantly, contractile responses to these agonists were not significantly different between WT and KO mice (Figure 2A, and Table; supplemental Figures III and VI). Moreover, the Ca²⁺ dose-response curves in WT and mutant arteries were comparable (Figure 2B). Endothelium-dependent and -independent dilation.

Absence of *Notch3* did not significantly affect ACh-induced dilation in carotid, tail, and middle cerebral arteries (Figure 2C; supplemental Figures IV and VI). Inhibition of NO synthase by L-NAME decreased ACh-induced dilation in carotid and tail caudal arteries with the same potency in WT and KO mice in tail (Figure 2C) and carotid arteries (data not shown). Indomethacin did not significantly reduce ACh-induced dilation when added after L-NAME in WT and KO tail (Figure 2C) and carotid arteries (data not shown). Endothelium-independent relaxation (SNP) was similar in KO and WT mice (Table and data not shown).

Vascular Mechano-Transduction of Flow (Shear Stress) and Pressure

Myogenic tone was significantly decreased by 68% and 75% (measured from the decrease in diameter induced by a pressure of 75 mm Hg) in tail and cerebral arteries, respec-

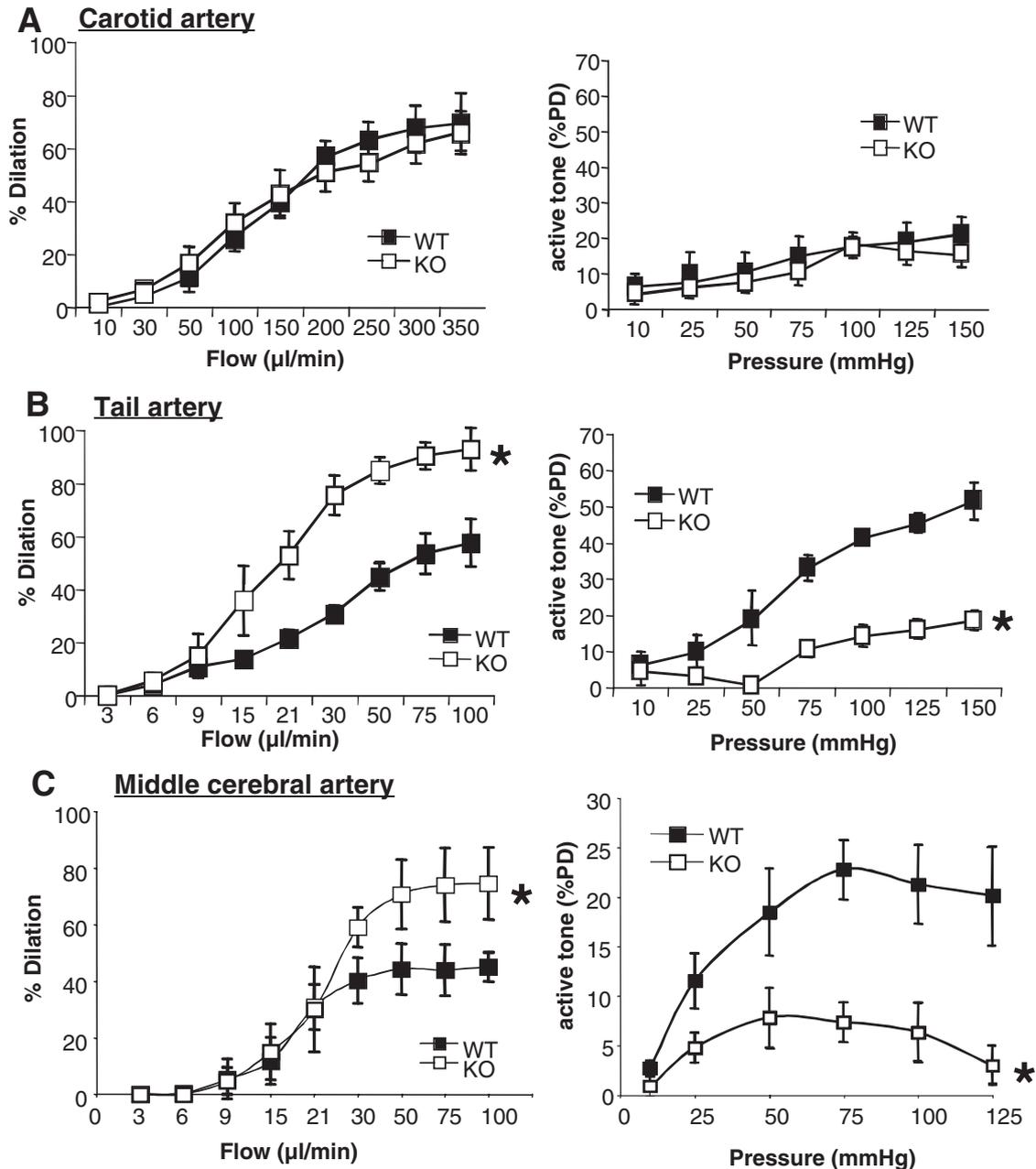


Figure 3. Response of carotid (A), tail (B), and middle cerebral arteries (C) from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) to stepwise increase in intraluminal pressure (Myogenic tone, right panel) or in intraluminal flow (flow-mediated dilation, left panel) (mean \pm SEM, n=12 WT and 9 KO). * $P < 0.01$, KO vs WT.

tively, from KO mice compared to WT animals. By contrast, pressure-induced contraction was not significantly different in KO and WT mice in carotid arteries (Figure 3, right panel).

Flow mediated dilation (FMD) was significantly higher in mutant tail and cerebral arteries (43% and 30% increase in FMD for a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) as compared with WT arteries. FMD of WT and mutant carotid arteries were comparable (Figure 3, left panel). The precontraction level before FMD was similar in WT and KO mice (supplemental Figure V).

Biochemical Analysis

To investigate the mechanisms by which absence of *Notch3* affects mechanotransduction, we assessed the expression

level and activation (phosphorylation) of proteins possibly involved in myogenic tone (pP38, P38, pP42, P42, pP44, P44, MLC, pMLC),^{2,9,11} in FMD (peNOs, eNOs, Cav-1)¹ or in both (FAKs, pFAKs, αV -integrin and β3 -integrin)^{1,2} in tail arteries. No difference in protein expression level between WT and mutant mice was found at the exception of pMLC, which was significantly decreased in mutant arteries (Figure 4).

To further analyze the mechanism involved in the decrease in myogenic tone, we examined the expression level and activity of RhoA. As shown in Figure 5 (A and B), *Notch3*-null mice exhibited a significant 46% reduction of RhoA activity, whereas RhoA protein level was unaltered as compared with wild-type mice.

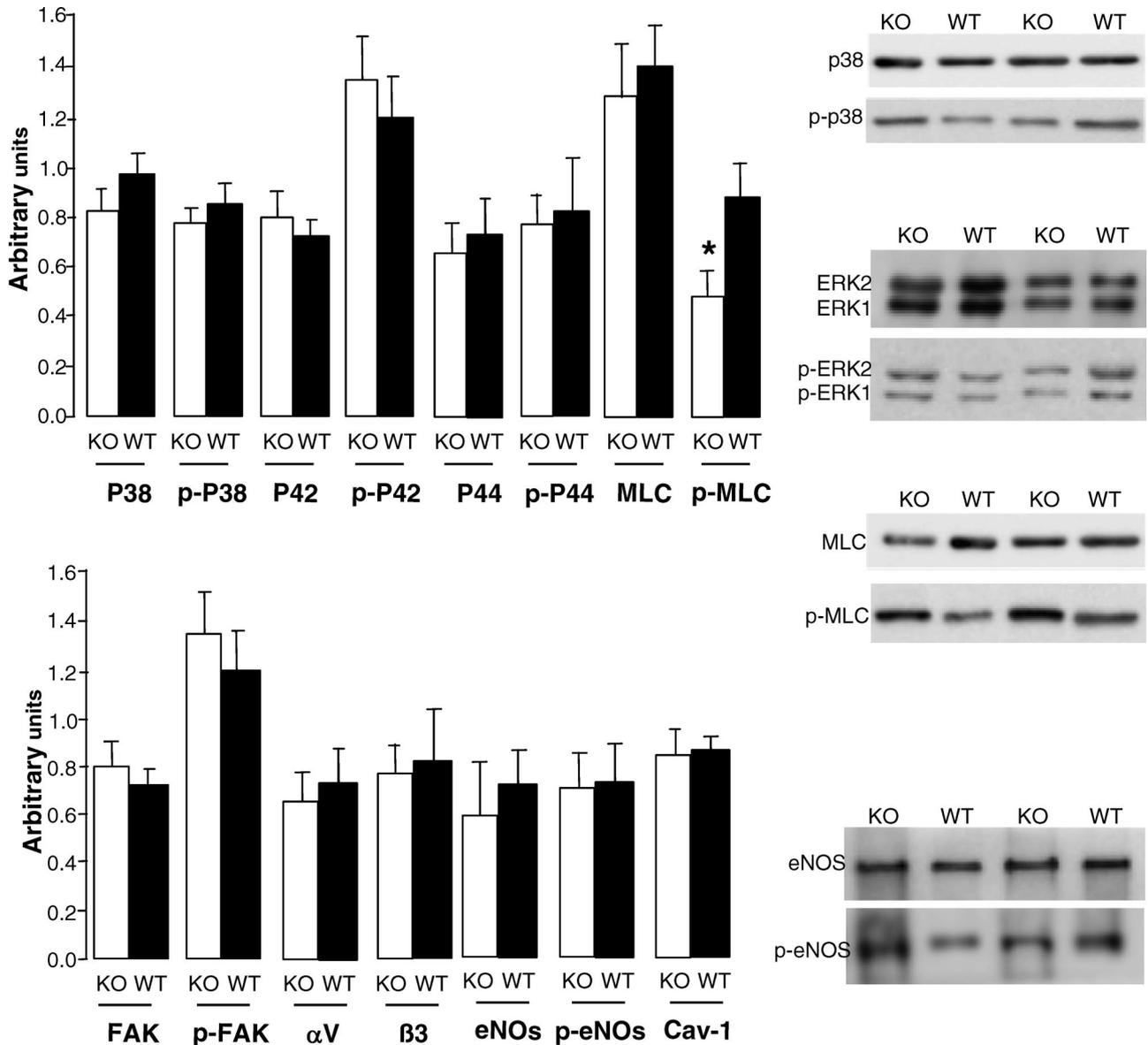


Figure 4. Expression level of the MAP kinase P38, P42, P44, FAK, alphaV integrin (α V), beta 3 integrin (β 3), myosin light chains (MLC), eNOS, and caveolin-1 (cav-1) in tail caudal arteries from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice. The level of phosphorylated proteins was determined as well (p-P38, p-P42, p-P44, p-FAK, p-MLC, and p-eNOS). Shown on the right are representative immunoblots (mean \pm SEM, n=6 per group). **P*<0.05, KO vs WT.

Effect of Rho-Kinase Inhibition

To confirm the involvement of the RhoA/Rho kinase pathway in the mechano-transduction defect observed in *Notch3*-null mice, we measured the relaxation induced by stepwise increase in the concentration of the Rho kinase inhibitor Y-27632. Myogenic tone was concentration-dependently inhibited by Y-27632. In control mice, complete inhibition was achieved with 10 μ mol/L Y-27632 whereas in *Notch3* deficient mice inhibition reaches only a maximum of 49% at the same dose (Figure 5C). We further assessed the relaxation induced by the Rho kinase inhibitor in tail arterial segments precontracted with KCl (60 mmol/L), PE (0.3 μ mol/L), or calcium (0.5 mmol/L). Remarkably, dose-response curves were not significantly different between WT and KO arterial segments (Figure 5D and 5E).

Discussion

Notch3, a Key Regulator of Vascular Tone in Small Arteries

Recently, we demonstrated that Notch3 is critically required for the structural integrity of small distal arteries whereas it appears dispensable for the structural integrity of large conductance arteries.¹⁷ In this study, we provide the first insight into how *Notch3* influences function of the arterial system. Consistent with the notion that Notch3 is dispensable for structural integrity of elastic arteries, we found that the mechanical properties and pharmacological profiles of carotid arteries were unaffected in mice completely lacking *Notch3*. Importantly, we found a significant decrease in myogenic tone and an enhanced flow-mediated dilation in isolated cerebral and tail caudal arteries. These alterations are

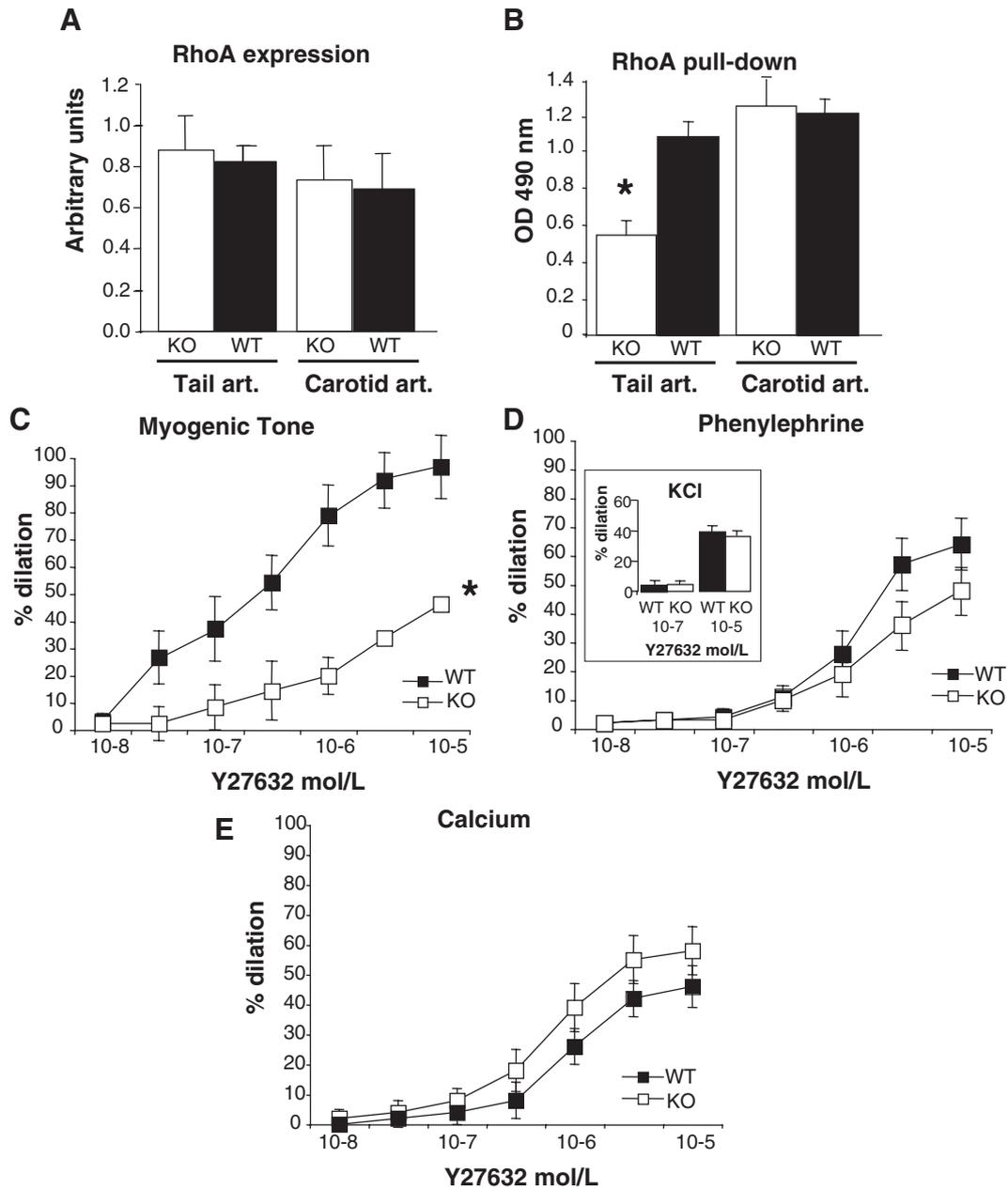


Figure 5. Quantification of RhoA expression level by Western blot (A) and RhoA activity by pull-down assay (B) in tail and carotid arteries. The inhibitory effect of the Rho-kinase inhibitor Y27632 (0.01 to 10 $\mu\text{mol/L}$) was assessed on myogenic tone (C), phenylephrine- (D), KCl (inset in D) as well as on calcium-induced constriction (E) in the tail caudal artery (mean \pm SEM, n=6 per group). * $P < 0.01$, KO vs WT.

unlikely to arise from a global dysfunction of vascular cells because both contraction and relaxation to pharmacological agents were unaffected. Hence, the results indicate that *Notch3* deficiency selectively impairs the function of small arteries and suggest a specific role for *Notch3* in the transduction of tensile and shear stress. We reported previously that in the absence of *Notch3* smooth muscle cells of distal arteries lack molecular markers of arterial smooth muscle cells and exhibit histological features of venous cells.¹⁷ Myogenic tone is an inherent property of arterial smooth muscle cells. Thus the present findings indicate that in the absence of *Notch3* smooth muscle cells of distal arteries lack an arterial phenotype also at the functional level and further

support the concept that *Notch3* is a key regulator of the arterial phenotype of smooth muscle cells.

The ability of small resistance arteries to develop myogenic tone is an important determinant of regional blood flow autoregulation as well as blood pressure.^{26,27} Our prior observation of strongly compromised autoregulation of cerebral blood flow in *Notch3*-null mice is consistent with the present finding of an impaired myogenic response in these mice. However, it is remarkable that basal blood pressure is normal in *Notch3*-null mice (supplemental Results).¹⁷ Although activation of cardiac or neurohumoral compensatory mechanisms in *Notch3*-null mice might solve this paradox, structural and functional analysis of additional resistance

arteries from *Notch3*^{-/-} mice suggests an alternative explanation. Specifically, high-resolution optic microscopy and electron microscopy of mesenteric arteries failed to detect structural defect of smooth muscle cells, although *Notch3* is strongly expressed in these cells (supplemental Figure II). Moreover, vasoreactivity to pharmacological agents and mechanical stimuli was similar in mutant and wild-type mesenteric arteries (supplemental Figure Figure VII). Given the importance of large peripheral vascular beds such as the mesenteric bed in the control of arterial blood pressure a localized vascular change in reactivity is unlikely to cause a significant change in systemic blood pressure. In addition, myogenic tone is mostly involved in the short-term control of local blood flow, whereas hormonal vasoactive systems such as the sympathetic and renin-angiotensin systems have a major role in controlling systemic blood pressure.^{1,28} Thus these later findings suggest that Notch3 is critically required for vascular tone in some vascular beds including at least the brain and the tail arteries, although being dispensable in others including the mesenteric bed.

How Does Notch3 Influence Myogenic Tone?

In resistance arteries, increase in intraluminal pressure induces a rapid cell architecture distension leading to the activation of stretch-dependent ion channels and voltage-operated Ca²⁺ channels²⁹ and ultimately of calmodulin and myosin light chain Kinase.³⁰ We^{11,12} and others³¹⁻³³ have demonstrated the key role played by the RhoA/Rho Kinase pathway in myogenic tone. Moreover, recent studies from our group¹² and others³⁴ support the hypothesis that activation of integrins and focal-adhesion kinase in caveolin-1 rich domains may participate in the Rho-kinase dependent sensitization of the contractile apparatus to calcium. In the present work, we provide evidence that Notch3 is an upstream modulator of the RhoA/Rho kinase pathway. First, we show that RhoA activity is significantly decreased in the tail arteries lacking *Notch3*. Second, Rho kinase inhibition with Y-27632, in its range of selectivity, was minimally efficient in pressurized mutant tail arteries indicating that the RhoA/Rho kinase activity was reduced in response to pressure (myogenic tone) in the absence of *Notch3*. Third, myosin light chain phosphorylation was significantly reduced in mutant pressurized arteries. The observation that expression levels of integrins, focal adhesion kinase (FAK), ERK1/2, and MAP kinase P38 were not affected by the absence of *Notch3* suggest that Notch3 activity is unrelated or lies downstream to these kinases. The RhoA/Rho kinase pathway has been widely shown to play a key role in the sensitization of the contractile apparatus in response to many vasoconstrictors such as angiotensin II, phenylephrine, or thromboxane A₂.¹⁰ However, our data here suggest that only the Rho kinase pathway activated in response to blood pressure elevation is modulated by Notch3. This supports the concept that Notch3 is a key receptor in the signaling pathway translating pressure to contraction (myogenic tone). As previously mentioned, mutant tail arteries exhibit disorganized and disjunctional smooth muscle cells.¹⁷ Using specific inhibitors of gap junction, several studies^{31,35} reported the key

role played by cell adhesion in the process of myogenic tone but not agonist-induced vasoconstriction. Assembly of focal adhesion contacts as well as formation of actin filaments bundles (stress fibers) has been reported to be dependent on RhoA activation.³⁶ Indeed, RhoA participates in the formation of distinct patterns of actin organization and assembly of integrin complexes. It has been reported that, in epithelial cells, RhoA induces the establishment and maintenance of E-Cadherin mediated cell-cell adhesion. Furthermore inactivation of RhoA results in the dislocation of E-cadherin and its complex members from the adherent junction leading to loss of cell-cell adhesion.³⁷ The reduced RhoA activity observed in the *Notch3*-null mice is thus certainly linked to the impaired myogenic tone and to the structural dysfunction observed in vascular smooth muscle cells. Nevertheless further studies are necessary to clarify the exact relationship between Notch3 and RhoA activation.

How Does Notch3 Activity Influence Flow-Mediated Dilation?

In the present study we also demonstrated that *Notch3*-null mice exhibited an increased FMD. In endothelial cells, transduction of shear stress into dilation involves integrin-matrix interactions³⁸ at focal adhesions.³⁹ FAK activation leads to the phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) that triggers eNOS activation via the PI3K-Akt pathway.⁴⁰ Because Notch3 deficiency did not affect calcium-dependent eNOS activation (ACh), or the effects of eNOS blockade (L-NAME) on ACh-induced dilation, our results rather reflect an increase in shear stress transduction than an enhanced endothelial function.

Several reports show that the preexisting myogenic tone regulates the vascular response to shear stress.^{41,42} According to the latter authors, the higher the intraluminal pressure, the higher the myogenic tone and the less negative the resting membrane potential. It would be expected that the open probability time of endothelial potassium channels involved in the FMD would be decreased, whereas the open probability time of voltage-activated calcium channels associated with constriction in vascular smooth muscle would be increased.²⁹ We expect the opposite to be true, ie, an enhanced FMD in arteries with an attenuated myogenic tone. Nevertheless, the change in myogenic tone could not directly influence the measurement of FMD because of the similar degree of precontraction applied to arteries from WT and KO mice. It is most likely that the reduced basal tone occurring in vivo influences the sensitivity of the flow-sensing process, although the mechanism involved remains to be determined. Increased FMD in the absence of *Notch3* would thus rather reflect an increased vascular smooth muscle cell capability to dilate in response to shear than an increase endothelium capability to induce dilation. We previously showed that transgenic mice expressing a mutant Notch3 protein, with the R90C mutation (*TgNotchR90C*), whose expression was specifically targeted in arterial smooth muscle exhibited an increase in myogenic tone associated with a decrease in FMD without endothelial dysfunction.¹¹ The lack of endothelial dysfunction in these latter mice is one more argument in favor of a regulation of FMD by the preexisting myogenic tone. At

the present time interpretation of the finding that *TgNotchR90C* and *Notch3 KO* mice exhibit opposite vascular dysfunction remains unclear since both in vitro and in vivo analyses showed that the R90C mutation did not impair canonical Notch3 activity.^{43,44}

In summary, the present study provides, to the best of our knowledge, the first evidence that Notch3 controls, through the RhoA/ROK signaling pathway, vascular reactivity to the mechanical factors, pressure, and flow. Moreover, *Notch3*-null mice, because of their highly specific defects, provide an invaluable experimental model to dissect the pathways specifically involved in the modulation of myogenic tone. Finally, our work highlights Notch3 as a novel pathway for therapeutic targeting in vascular diseases where changes in myogenic responses and vascular autoregulation are thought to play a role.

Sources of Funding

This work was supported by the ANR (Agence Nationale de la Recherche) - Maladies Rares (Paris, France) and by the NIH (National Neurological Disorders and Stroke Institute grant R01 NS 054122). DH and AJ were supported by an "INTERFACE" grant (contrat d'interface INSERM-CHU d'Angers, DH and INSERM-AP-HP, AJ). E.J. Belin de Chantemèle was a recipient of a postdoctoral fellowship from the CNES.

Disclosures

None.

References

- Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98:913–921.
- Hill MA, Davis MJ, Meininger GA, Potocnik SJ, Murphy TV. Arteriolar myogenic signalling mechanisms: Implications for local vascular function. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;34:67–79.
- Dowell FJ, Henrion D, Benessiano J, Poitevin P, Levy B. Chronic infusion of low-dose angiotensin II potentiates the adrenergic response in vivo. *J Hypertens*. 1996;14:177–182.
- Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest*. 2001;107:23–25.
- Qiu HY, Henrion D, Levy BI. Alterations in flow-dependent vasomotor tone in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1994;24:474–479.
- Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, Maclour J, Samuel JL, Levy BI, Michel JB. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br J Pharmacol*. 1997;121:83–90.
- Loufrani L, Matrougui K, Gorny D, Duriez M, Blanc I, Levy BI, Henrion D. Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation*. 2001;103:864–870.
- Loufrani L, Levy BI, Henrion D. Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res*. 2002;91:1183–1189.
- Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *Faseb J*. 2002;16:72–76.
- Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*. 2006;98:322–334.
- Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension*. 2005;45:974–979.
- Dubroca C, Loyer X, Retailleau K, Loirand G, Pacaud P, Feron O, Balligand JL, Levy BI, Heymes C, Henrion D. RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. *Cardiovasc Res*. 2007;73:190–197.
- Hofmann JJ, Iruela-Arispe ML. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res*. 2007;100:1556–1568.
- Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, Piga N, Chapon F, Godfrain C, Tournier-Lasserre E. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest*. 2000;105:597–605.
- Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*. 2007;134:2709–2718.
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillon M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*. 1996;383:707–710.
- Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjkowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev*. 2004;18:2730–2735.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Sundberg JP, Beatus P, Lendahl U, Joutel A, Gridley T. Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis*. 2003;37:139–143.
- Baron-Menguy C, Bocquet A, Guihot AL, Chappard D, Amiot MJ, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic. *Faseb J*. 2007;21:3511–3521.
- Loufrani L, Henrion D, Chansel D, Ardaillou R, Levy BI. Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291:583–588.
- Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane-induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res*. 2002;39:353–360.
- Loufrani L, Henrion D. Vasodilator treatment with hydralazine increases blood flow in mdx mice resistance arteries without vascular wall remodeling or endothelium function improvement. *J Hypertens*. 2005;23:1855–1860.
- Ben Driss A, Devaux C, Henrion D, Duriez M, Thuillez C, Levy BI, Michel JB. Hemodynamic stresses induce endothelial dysfunction and remodeling of pulmonary artery in experimental compensated heart failure. *Circulation*. 2000;101:2764–2770.
- Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:317–324.
- Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, Loirand G, Pacaud P. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005;96:1152–1160.
- Bevan JA, Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *Faseb J*. 1991;5:2267–2273.
- Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation*. 2005;12:33–45.
- Schubert R, Mulvany MJ. The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond)*. 1999;96:313–326.
- Wellman GC, Bevan JA. Barium inhibits the endothelium-dependent component of flow but not acetylcholine-induced relaxation in isolated rabbit cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;274:47–53.
- Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999;79:387–423.
- Lagaud G, Gaudreault N, Moore ED, Van Breemen C, Laher I. Pressure-dependent myogenic constriction of cerebral arteries occurs independently of voltage-dependent activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2187–H2195.
- Schubert R, Kalentchuk VU, Krien U. Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2288–H2295.
- Gokina NI, Park KM, McElroy-Yaggy K, Osol G. Effects of Rho kinase inhibition on cerebral artery myogenic tone and reactivity. *J Appl Physiol*. 2005;98:1940–1948.
- Martinez-Lemus LA, Crow T, Davis MJ, Meininger GA. α 5 β 1- and α 5 β 1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of

- skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H322–H329.
35. Earley S, Resta TC, Walker BR. Disruption of smooth muscle gap junctions attenuates myogenic vasoconstriction of mesenteric resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2677–H2686.
36. Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*. 2004;377:327–337.
37. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*. 1997;139:1047–1059.
38. Muller JM, Chilian WM, Davis MJ. Integrin signaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res*. 1997;80:320–326.
39. Koshida R, Rocic P, Saito S, Kiyooka T, Zhang C, Chilian WM. Role of focal adhesion kinase in flow-induced dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2548–2553.
40. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399:601–605.
41. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol*. 1991;261:H1706–H1715.
42. Thorin-Trescases N, Bevan JA. High levels of myogenic tone antagonize the dilator response to flow of small rabbit cerebral arteries. *Stroke*. 29:1194–1200, 1998; discussion 1200–1191.
43. Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E. Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling Pathway. *Am J Hum Genet*. 2004;74:338–347.
44. Monet M, Domenga V, Lemaire B, Souilhol C, Langa F, Babinet C, Gridley T, Tournier-Lasserre E, Cohen-Tannoudji M, Joutel A. The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Hum Mol Genet*. 2007;16:982–992.

***Notch3* is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries**

E.J. Belin de Chantemèle, K. Retailleau, F. Pinaud, E. Vessières, A Bocquet , A.L. Guihot, B. Lemaire, V. Domenga, C. Baufreton, L. Loufrani, A. Joutel, D. Henrion

Supplementary Material and methods

Animals

The procedure followed in the care and euthanasia of the study animals was in accordance with European Community standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Agriculture, France, authorization no. 6422 and 75-572).

Notch3^{-/-} mice (KO) and their wild-type littermates (WT) were obtained by crossing *Notch3* heterozygous mice. Genomic DNA was obtained from toe biopsy for genotyping by PCR ¹. Adult (10-12 weeks old) male mice (n= 25 WT and 25 KO) were anesthetized using isoflurane (2.5%) and blood pressure measured in the femoral artery ². Anesthetized animals were then killed by CO₂ inhalation. Common carotid, mesenteric, middle cerebral and tail caudal arteries were collected for histological, functional and biochemical analysis.

Histological analysis

In order to determine the effects of *Notch3* deletion on vascular structure, carotid, mesenteric, middle cerebral and tail caudal arteries were dissected under a microscope, fixed in CARSON solution and embedded in Epon E812 resin. Semi-thin sections were stained with toluidine blue and observed under a DMR microscope (Leica) as previously described ¹.

Pharmacological study in isolated arteries

Arterial segments (2 mm long) were dissected and mounted on a wire-myograph (Danish MyoTechnology, DMT, Aarhus, Denmark), according to the technique of Mulvany and Halpern ³, as previously described ⁴. Briefly, 2 tungsten wires (25 µm diameter) were inserted in the lumen of the arteries and fixed to a force transducer and a micrometer, respectively.

Arteries were bathed in a 5 ml organ bath containing a physiological salt solution (PSS) maintained at a pH of 7.4, a pO₂ of 160 mmHg and a pCO₂ of 37 mmHg⁵. After wall tension normalization³, arteries were allowed to stabilize for one hour. Arteries viability was tested using a potassium rich solution (80 mmol/L-PSS). Contractile properties of the artery were tested by Phenylephrine (PE, 0.01 to 10 µmol/L), thromboxane A₂ mimetic (U46619, 10 pmol/L to 0.1 µM)⁶ and Angiotensin II (AngII, 1 pmol/L to 0.1 µM) cumulative concentration response curves (CRC). A CRC to calcium (0.1 to 1 mmol/L) was obtained in arteries in a calcium-free PSS⁷. Data were expressed as force developed (mN) in response to the pharmacological stimulation.

In a separate series of experiments, we determined the effect of the Rho-kinase inhibitor Y27632 (0.01 to 10µM) on the contraction induced by PE (0.3 µmol/L), calcium (0.5 mmol/L) or KCl (60 mmol/L) as previously described and data were expressed as percentage of inhibition⁸.

Concentration-dependent relaxation in response to Acetylcholine (ACh) (0.01 to 10 µmol/L) was obtained after phenylephrine-serotonin-induced precontraction (PE 1 µmol/L + 5HT 1 µmol/L). Similar CRC to ACh were realized under NO synthase blockade (L-NAME 100 µmol/L), and NO synthase plus cyclooxygenase blockade (L-NAME 100 µmol/L + indomethacin 10 µmol/L)⁹. Data were expressed as percentage of dilation of phenylephrine-serotonin induced precontraction¹⁰. The pharmacological study ended by a dose dependent relaxation curves to sodium nitroprussiate (SNP) (0.01 to 10 µmol/L).

Pressure and flow-dependent tone in isolated arteries

Three-five mm long segment of tail caudal artery (distal part), middle cerebral artery (first segment), mesenteric artery (3^d order) and carotid artery were cannulated at both ends and mounted in a video monitored perfusion system (Living Systems, LSI, Burlington, VT) as previously described¹¹. Briefly, cannulated arterial segments were bathed in a 5 ml organ bath containing the PSS described above. Perfusion of the artery was achieved with a similar PSS. Pressure was controlled by a servo-perfusion system and a peristaltic pump-generated flow. Flow-induced dilation was studied by increasing flow rate by steps from 0 to 100 µL.min⁻¹. Data were obtained from arterial segments precontracted with phenylephrine (PE) at approximately 50-60 % of maximal response and with intraluminal pressure set at 75 mmHg as previously described¹². Myogenic tone was determined by increasing intraluminal pressure by steps from 10 to 150 mmHg without intraluminal flow. Diameters measured in

normal PSS were considered as diameter under active tone or “active diameter”. At the end of each experiment arteries were superfused with a Ca^{2+} free PSS containing ethylenbis-(oxyethyleninitrolo) tetra-acetic acid (EGTA, 2 mmol/L), SNP (10 $\mu\text{mol/L}$) and papaverine (10 $\mu\text{mol/L}$). Pressure steps were repeated to determine the passive diameter of the arteries. Pressure and diameter measurements were collected by a Biopac® data acquisition system (Biopac MP 100, La Jolla, CA, USA) and continuously recorded. Data were analyzed with the Acqknowledge® software.

In a separate series of experiments, the effect of the Rho-kinase inhibitor Y27632 (0.01 to 10 μM) on myogenic tone was determined ⁸.

Results are given in micrometers for artery diameters. Myogenic tone or active tone was expressed as the percentage of passive diameter ((passive diameter - active diameter) / passive diameter x 100). Flow-induced relaxation was expressed as percentage dilation of active tone. Arterial cross sectional compliance was calculated using internal diameter values measured under passive conditions (internal passive diameter : PD) over the pressure range of 0-150 mmHg, internal lumen area was calculated as: $A_i = \pi \cdot \text{PD}^2/4$ (μm^2); cross-sectional compliance ($\mu\text{m}^2 / \text{mmHg}$) was then calculated as: $\Delta A_i / \Delta P$, in which ΔA_i is the change in internal lumen area induced by a pressure change (ΔP) ⁵.

Western-blotting

Arterial segments were quickly dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. Samples were crushed in liquid nitrogen, resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1% sodium dodecyl sulfate, 1 mmol/L sodium orthovanadate) and incubated on ice for 30 minutes. The detergent soluble supernatant fractions were collected after centrifugation (14.000 rpm, 20 minutes, 4°C). Protein concentration in samples was equalized using a Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). Proteins (25 μg total protein per sample) were separated by SDS-PAGE (Mini gel protean II system [Bio-Rad], 120 V, with 2.5 mmol/L Tris, 19.2 mmol/L glycine, and 0.01% SDS) using a 4% stacking gel followed by a 12 % running gel. Separated proteins were electrotransferred (120 V, 90 min, 4°C, with 2.5 mmol/L Tris, 19.2 mmol/L glycine, 0.001% SDS and 20% methanol) onto nitrocellulose membranes. Membranes were washed in TBS-T buffer (composed of 20 mmol/L Tris/base pH 7.8, 62 mmol/L NaCl, and 0.1% Tween 20), blocked for 90 minutes at room temperature (10% BSA in TBS-T), incubated over night at 4°C with the primary antibody for eNOS, p-eNOS, caveolin-1, αV -integrin and β3 -integrin, RhoA, P38, pP38, P42, pP42, P44, pP44, FAK,

pFAK, MLC and pMLC (Transduction Laboratories) followed by incubation with horseradish peroxidase–conjugated antibody (Amersham) 90 minutes at room temperature. Membranes were washed and proteins were visualized using the ECL-Plus Chemiluminescence kit (Amersham). A polyclonal anti-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used to reprobe blots to confirm equal loading in lanes. Preliminary immunoblot analysis showed that comparable results were obtained using freshly isolated arteries as compared to pressurized (75 mmHg) arterial segments (figure I, below).

RhoA pull-down assay

RhoA activation was assessed as previously described¹³ using a Rho-GTP pull-down assay kit (Cytoskeleton, Denver, USA). Briefly, RhoA activation was determined by affinity precipitation of the active GTP-bound RhoA using a glutathione S-transferase (GST)-fusion protein of the Rho-binding domain of the Rho effector rhotekin (GST-RBD).

References:

1. Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 2004;18:2730-2735.
2. Baron-Menguy C, Bocquet A, Guihot AL, Chappard D, Amiot MJ, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic. *Faseb J.* 2007;21:3511-3521.
3. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41:19-26.
4. Loufrani L, Henrion D, Chansel D, Ardaillou R, Levy BI. Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291:583-588.
5. Loufrani L, Matrougui K, Gorny D, Duriez M, Blanc I, Levy BI, Henrion D. Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation.* 2001;103:864-870.

6. Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane- induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res.* 2002;39:353-360.
7. Loufrani L, Henrion D. Vasodilator treatment with hydralazine increases blood flow in mdx mice resistance arteries without vascular wall remodelling or endothelium function improvement. *J Hypertens.* 2005;23:1855-1860.
8. Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension.* 2005;45:974-979.
9. Ben Driss A, Devaux C, Henrion D, Duriez M, Thuillez C, Levy BI, Michel JB. Hemodynamic stresses induce endothelial dysfunction and remodeling of pulmonary artery in experimental compensated heart failure. *Circulation.* 2000;101:2764-2770.
10. Loufrani L, Matrougui K, Li Z, Levy BI, Lacolley P, Paulin D, Henrion D. Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. *Faseb J.* 2002;16:117-119.
11. Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:317-324.
12. Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, Maclour J, Samuel JL, Levy BI, Michel JB. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br J Pharmacol.* 1997;121:83-90.
13. Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, Loirand G, Pacaud P. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005;96:1152-1160.

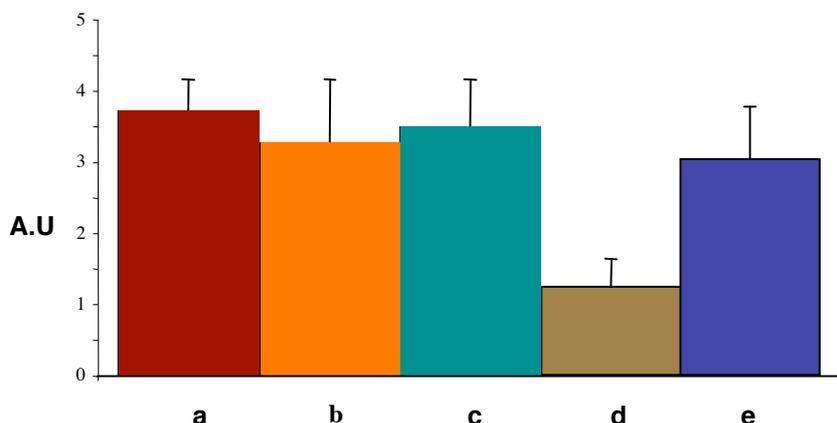
Supplementary results

Animals

Body weights of *Notch3*^{-/-} mice (25±1.6g, n= 10) were comparable to those of wild-type littermate mice (26±1.4g, n=10). Blood pressure was measured in the femoral artery. Mean blood pressure did not differ between *Notch3* null mice (88±2 mmHg, n=10) and wild-type mice (92±3mmHg, n=10).

Supplementary Figures

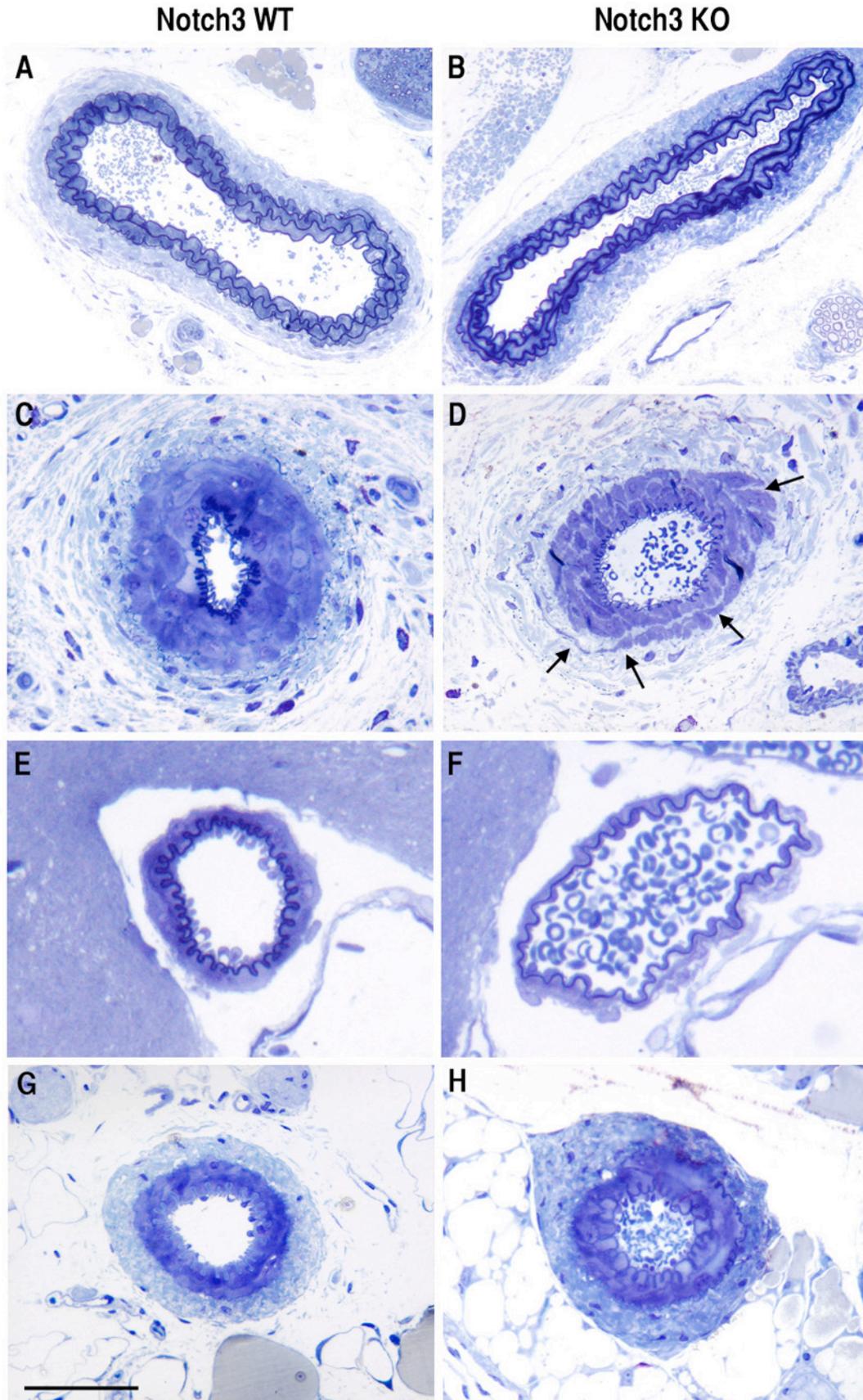
Figure I: pMLC/MLC level is identical in freshly isolated tail arteries and in pressurized arterial segments



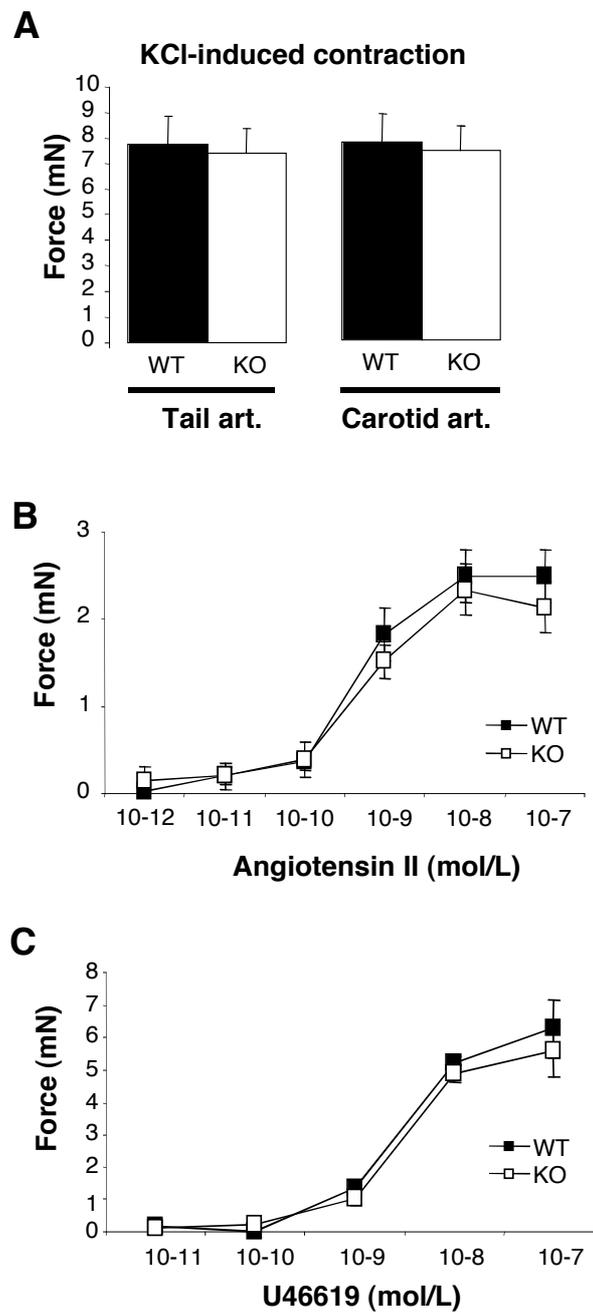
To test the hypothesis that activation of proteins, which are involved in myogenic tone, remains intact in quickly dissected arteries, we compared level of p-MLC in pressurized arterial segments and in freshly isolated arteries. The p-MLC/MLC ratio was determined by immunoblot analysis of tail caudal arteries processed as indicated: (a) arteries were freshly and quickly dissected and snap-frozen in liquid nitrogen, (b) arteries were freshly and quickly dissected and snap-frozen in liquid nitrogen after a one hour incubation in PSS at 4°C, (c) arterial segments were dissected in PSS at 4°C, mounted in an arteriograph + 60 min under a pressure of 75 mmHg (37°C) and then snap-frozen. As positive and negative controls, arteries were incubated 30 min in PSS at room temperature before being frozen (d) or stimulated with phenylephrine (1µm/L) 30 min in PSS at room temperature (e).

(n=4 tail arteries per group in a,b, d and e and n= 3 samples of 10 pooled arterial segments in c). A.U.= arbitrary unit.

Figure II: Structural properties of arteries from *Notch3* null mice

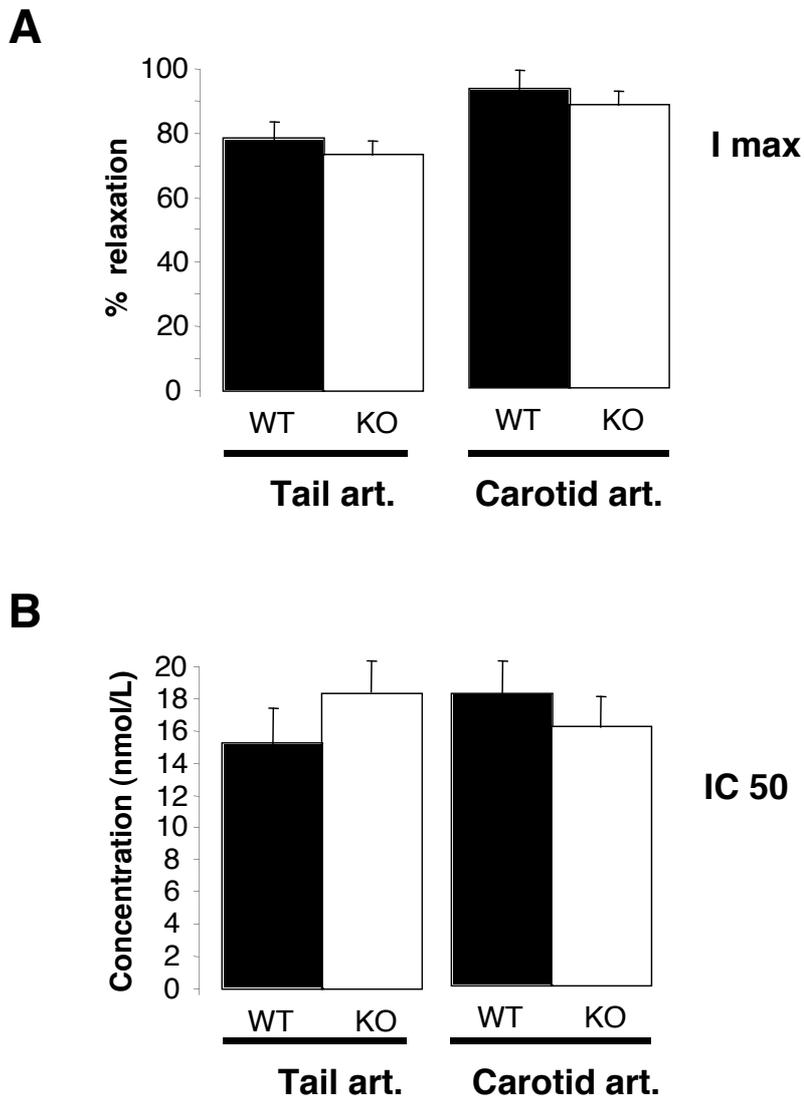


Semi-thin sections of arteries from wildtype and *Notch3 KO* mice were stained by toluidine blue. Shown are representative sections of carotid arteries (A-B), caudal tail arteries (C-D), middle cerebral arteries (E-F) and mesenteric arteries (G-H). Note the thinner media in the mutant tail and cerebral arteries with thinner smooth muscle cells, as well as the non cohesive smooth muscle cells in the media of the caudal artery (arrows) while mutant carotid and mesenteric arteries exhibit no obvious defect. Scale bar : 120 μ m (A,B) and 60 μ m (C-H)

Figure III: KCl and receptor-dependent contractions in tail and carotid arteries

Vasoconstriction induced by KCl (80 mmol/L, **A**), angiotensin II (**B**) and the thromboxane A₂ analog U46619 (**C**) was investigated in tail (A-C) and carotid arteries (art.) isolated from *Notch3* KO mice and their wild-type (WT) control (n=12 WT and 9 KO). NS, KO versus WT.

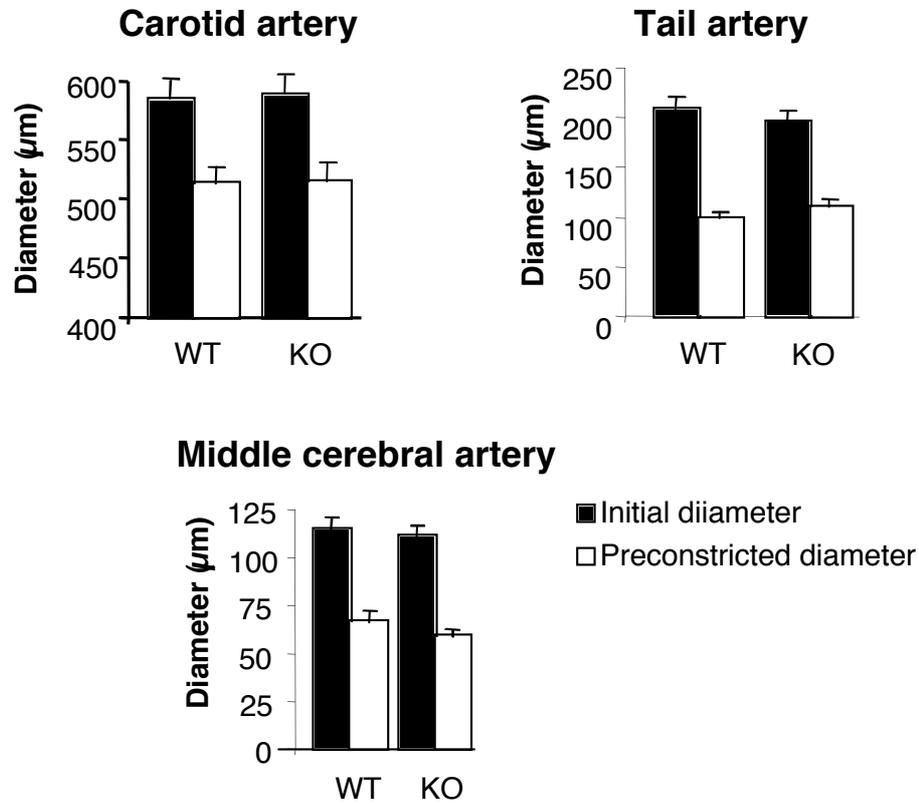
Figure IV: Acetylcholine-induced dilation in tail and carotid arteries



Cumulative concentration response curve to Acetylcholine performed in tail and carotid arteries from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice. I_{max} (A) and IC₅₀ (B) calculated from cumulative concentration response curves.

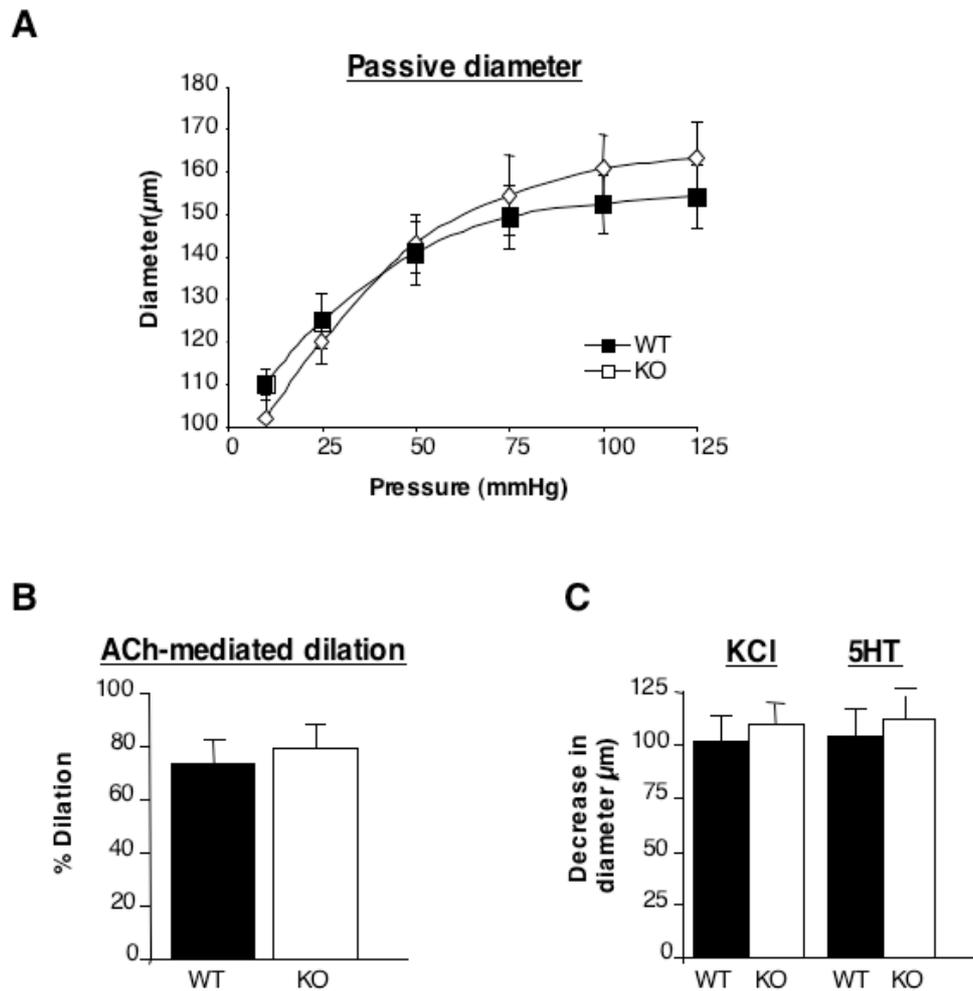
Data are presented as MEAN ± SEM. (n=12 WT and 9 KO). NS, KO versus WT.

Figure V: Precontraction induced prior to flow-mediated dilation



Precontraction in carotid, tail and middle cerebral arteries isolated from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice, induced prior to flow-mediated dilation (data in figure 3), are presented. NS, KO versus WT.

Data are presented as MEAN ± SEM. (n=12 WT and 9 KO).

Figure VI: Mechanical properties and vasoreactivity of middle cerebral arteries

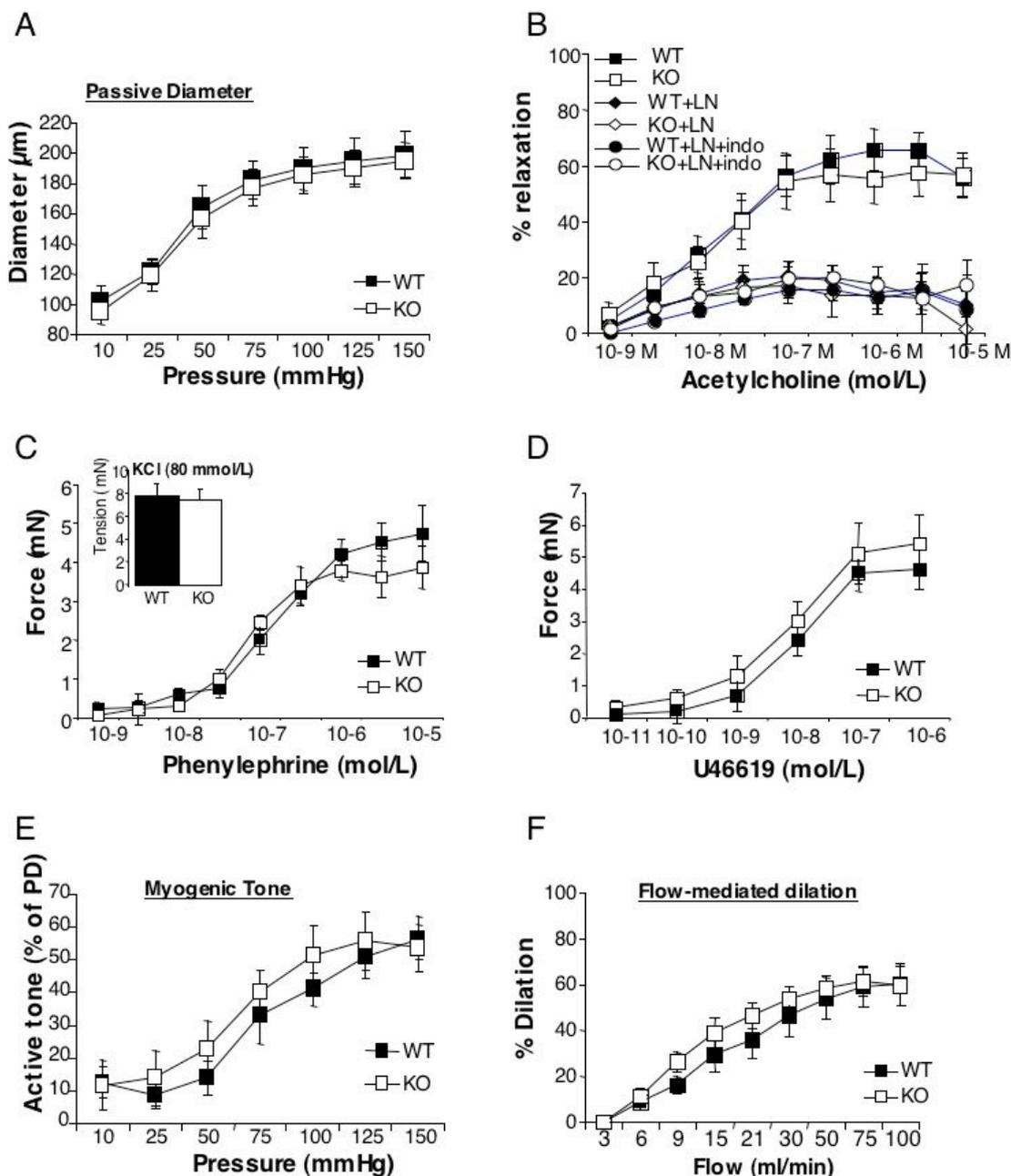
A: Changes in passive diameter in response to stepwise increases in pressure

B: Vasodilation induced by acetylcholine (ACh, 1 µmol/L)

C: Vasoconstriction induced by KCl (80 mmol/L) and by serotonin (5HT, 1 µmol/L).

Middle cerebral arteries were isolated from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice. Data are presented as MEAN ± SEM. (n=5 WT and 5 KO). NS, KO versus WT.

Figure VII: Mechanical properties and vasoreactivity of mesenteric arteries are unaltered in *Notch3* KO mice



A: Changes in passive diameter in response to stepwise increases in pressure

B: Cumulative concentration response curve to Acetylcholine performed in the presence of the NO-synthase inhibitor L-NAME (LN) or L-NAME plus the cyclooxygenase inhibitor indomethacine (LN+INDO).

C: Constriction induced by a potassium-rich (KCl, 80 mmol/L) and phenylephrine.

D: Constriction induced by the thromboxane A₂ mimetic U46619

E: Response to stepwise increases in intraluminal pressure (Myogenic tone).

F: Response to stepwise increases in intraluminal blood flow (Flow-mediated dilation) .

Mesenteric resistance arteries were isolated from wild-type (WT) and *Notch3*^{-/-} (KO) mice.

Data are presented as MEAN ± SEM. (n=12 WT and 9 KO). NS, KO versus WT.

ARTICLE 3

Selective involvement of Serum Response Factor in pressure-induced myogenic tone in resistance arteries.

K. Retailleau^{1,2,3}, B. Toutain^{1,2,3}, G. Galmiche², R. Sharif-Naeini³, G. Kauffenstein^{1,2,3},
M. Mericksay², F. Duprat³, P. Lacolley⁴, R. Feil⁵, D. Henrion^{1,2,3}, Z. Li²,
and L. Loufrani^{1,2,3}. *En soumission*

¹ INSERM U771, Angers, F-49045, France

² CNRS UMR 6214, Angers, F-49045, France

³ Université d'Angers, Angers, F-49045, France

² Université Pierre & Marie Curie, Paris, F-75005, France.

³ IPMC-CNRS, Valbonne, F-06560, France.

⁴ Inserm U961, Nancy, F-54505, France.

⁵ Universität Tübingen, Germany

Résumé :

La contractilité vasculaire, et plus particulièrement TM, sont des mécanismes intimement liés à la structure du cytosquelette des CMLs. Le facteur de réponse au sérum (SRF) est un facteur de transcription intervenant dans le maintien de la structure et de la contractilité de différents organes tels que le cœur et l'intestin. Des études antérieures montrent que l'activité transcriptionnelle de SRF peut être modulée par la protéine RhoA, qui est une protéine clé dans la réactivité vasculaire. SRF régule aussi l'expression de protéines contractiles comme la kinase de la chaîne légère de la myosine, ainsi que des protéines du cytosquelette telles que l'actine ou la myosine. Cependant, le rôle de SRF dans la microcirculation n'a pas encore été décrit, or sa place en aval de RhoA ainsi que son rôle dans l'expression de certaines protéines font de lui un bon candidat dans la régulation de la réactivité vasculaire. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact qu'aurait l'absence de SRF sur la réactivité des artères de résistance.

Cette étude a été faite sur des segments d'artères caudales de souris conditionnellement déficientes (SRF^{smko}) ou non pour SRF au niveau du muscle lisse. Ces vaisseaux ont été montés dans des cuves à organes isolés et soumis à un étirement physiologique isométrique ou isobarique. En absence de SRF, seul le TM est altéré (SRF^{smko}: $2,8 \pm 0,9\%$ versus contrôle: $16,4 \pm 3,2\%$ à 100mmHg). Les contractions induites par des agents pharmacologiques tels que la phényléphrine (PE) et l'U46619 (mimétique thromboxane A2) ne sont pas ou peu modifiées. Ce travail a été complété par une étude électrophysiologique révélant une diminution de la sensibilité des canaux mécanosensibles accompagnée soit d'une diminution de leur nombre, soit d'une diminution de leur probabilité d'ouverture chez les souris SRF^{smko}. De plus des immunomarquages ont révélé une altération du cytosquelette par la diminution de la polymérisation de l'actine et de l'expression de la filamine A. L'expression de différentes protéines de la contraction, telles que la chaîne légère de la myosine et sa kinase, est inhibée en absence de SRF. En revanche, la voie de la MAPK P38 est augmentée chez les souris SRF^{smko}.

SRF a donc un effet spécifique sur le TM en régulant les canaux mécanosensibles, le cytosquelette et les protéines contractiles. La mise en place de mécanismes compensateurs tels que la suractivation de la MAPK P38 permet le maintien des contractions en réponse à la PE et à l'U46619. SRF apparaît donc comme un important régulateur de la mécanotransduction en réponse à la pression, et comme une nouvelle cible thérapeutique lors de pathologies affectant la régulation des débits sanguins locaux.

Selective involvement of Serum Response Factor in pressure-induced myogenic tone in resistance arteries.

Kevin Retailleau (1), Bertrand Toutain (1), Guillaume Galmiche (2), Reza Sharif-Naeini (3), Gilles Kauffenstein (1), Mathias Mericskay (2), Fabrice Duprat (3), Patrick Lacolley (4), Robert Feil (5), Daniel Henrion (1), Zhenlin Li (2), Laurent Loufrani (1)

(1) UMR-CNRS 6214; INSERM 771, Angers, France; (2) Université Pierre & Marie Curie, Paris, France; (3) IPMC-CNRS, Valbonne, France; (4) Inserm U961, Nancy ; (5) Universität Tübingen, Germany

Address for Correspondence:

Laurent Loufrani, PhD.

UMR CNRS 6214 – INSERM 771

Université d'Angers

Faculté de Médecine,

49045 Angers, France

tel: 332 41 73 58 45

fax: 332 41 73 58 95

E-mail: laurent.loufrani@wanadoo.fr

Key Words: Resistance arteries, Myogenic tone, Serum Response Factor.

Abstract:

Serum Response Factor (SRF) has emerged as a dispensable transcription factor for cellular growth but as an essential orchestrator of actin cytoskeleton and contractile homeostasis. In resistance arteries, diameter adjustments in response to change in intraluminal pressure depend on vascular cytoskeleton integrity. We thus hypothesised that SRF deletion will affect the pressure-dependent mechanotransduction in resistance arteries. To address the role of SRF, the tail caudal artery from inducible smooth muscle cell-specific SRF KO mice (SRF^{smko}) and their littermate control was cannulated in an arteriograph. Contraction to stepwise increase in pressure (myogenic tone) was determined in each group. Mechanosensitive channels were studied by cell-attached patch clamp analysis.

Pressure-induced myogenic tone (MT) was lower ($5.9 \pm 2.3\%$ of passive diameter) in SRF^{smko} than in control animals ($16.3 \pm 3.2\%$). This decrease is accompanied by the decrease of activity and sensitivity of mechanosensitive channels, and expression of the filamin A, MLCK and MLC that could be involved in the decrease of MT. In contrast to the MT decrease, the contractions induced by KCl, Phenylephrine, or U46619 and endothelium (flow)-mediated dilation were not significantly modified that could be linked to a potential compensatory mechanism via FAK-P38 activation. Indeed, FAK expression and MAPK p38 phosphorylation was higher in SRF^{smko} than in control mice and contractions induced by Phenylephrine and U46619 were more sensitive to p38 blockade.

This study shows that SRF is involved in pressure-induced myogenic tone in resistance arteries. Due to the central role of myogenic tone in vascular homeostasis this finding opens new perspectives in vascular disorders.

INTRODUCTION

Resistance arteries play a key role in the control of peripheral vascular resistance, tissue perfusion and hence in cardiovascular homeostasis¹. They possess a basal (myogenic) tone, opposed by flow (shear stress) mediated dilation². Equilibrium between myogenic tone and flow-mediated dilation (FMD) allows an efficient control of local blood flow in peripheral tissues and provides a background vascular tone increasing the efficacy of circulating and locally produced vasoactive agents.

Myogenic tone (MT) is characterized by a smooth muscle cells contraction in response to increase in pressure or stretch³. A rise in MT amplitude has been associated with diseases such as hypertension⁴ and diabetes mellitus⁵. Signaling mechanisms contributing to MT require opening of mechanosensitive channels^{6,7}, membrane depolarization, activation of voltage-operated calcium channels^{8,9}, calcium entry¹⁰, protein kinase C¹¹ and phospholipase C activation¹² as well as calcium-sensitization of the contractile apparatus³. The cytoskeleton has an important role in MT. The decrease, inhibition or absence of proteins such as integrins¹³ reduces MT. Furthermore, actin polymerization is essential for the maintenance of MT. Indeed, F-actin depolymerization with cytochalasin D reduces MT¹⁴.

SRF is a member of the MADS box transcription factor family, directly binds to cis-element, CArG-box. It is involved in the control of several extra cellular stimuli-regulated genes important for cell growth and survival as well as cytoskeletal genes including actins, myosins, calponins, troponin, dystrophin, desmin and metabolic enzyme such as muscle creatine kinase¹⁵.

Two main families of signal-regulated SRF cofactors have been characterized. First, members of the ternary complex factor (TCF) family of Ets domain proteins, SAP-1 and Net, are activated by mitogen activated protein kinase phosphorylation and interact with SRF to stimulate the

transcription of immediate early genes such as C-fos or Egr1¹⁶. The myocardin-related transcription factors (MRTFs), MRTF-A (also called MAL or MKL1 or BSAC) and MRTF-B (also called MKL2 or MAL16) form the second family. Activity and nuclear translocation of MAL are controlled by the RhoA-family of GTPases and by actin filament dynamic. Upon actin polymerization, MAL is released from nuclear G-actin and interacts with SRF to stimulate its transcriptional activity on specific promoters including actins promoters¹⁷⁻¹⁹. Therefore, SRF is a the core of a positive regulatory loop in which extracellular and biomechanical signals triggering actin polymerization further stimulate the transcription of actin and other cytoskeletal genes through direct SRF activation.

In human pathologies, reduced SRF expression has been associated with heart failure^{20,21}. Whereas increased SRF expression has been associated with a hypercontractile phenotype in cerebral arteries of Alzheimer patients²².

In mouse Cre-lox models, cardiac specific SRF disruption in the adult induces a rapid progression to dilated cardiomyopathy correlated with a decreased expression of the proteins involved in force generation and transmission as well as with a low level of actin polymerization²³.

SRF role in the maintenance of vascular SMC differentiation has been extensively studied, especially in the context of atherosclerosis²⁴. Nevertheless, direct assessment of the role of SRF through targeted disruption in the adult vasculature has not been addressed so far. We have shown previously that inducible smooth muscle cell-specific SRF mutation in the adult mice, leads to a severe motility disorder resembling chronic intestinal pseudo-obstruction in humans, demonstrating that SRF plays a crucial role in maintaining visceral smooth muscle contractility²⁵.

The involvement of SRF in the gene regulation involved in cytoskeletal proteins allows hypothesizing that SRF might modulate microvascular mechanotransduction, especially in

response to pressure, which is the strongest mechanical force acting on the vessel wall. Thus, we investigated pressure-induced myogenic tone in adult smooth muscle-specific SRF knock out mice (SRF^{smko}).

MATERIALS AND METHODS

Animals

To address the role of SRF in the myogenic tone, we used mice expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase under the control of a smooth muscle-specific gene²⁶ crossed with floxed SRF mice²⁵. Adult male (3-4 months) smooth muscle cells inducible SRF^{smko} (n=10) and control mice (WT; n=10) were treated with intra-peritoneal injection of tamoxifen (50 mg/Kg/day) for three days. After 14 days, mice were anesthetized (isoflurane), blood pressure was measured in the tail artery. The tail artery were then removed and placed in ice-cold physiological salt solution (PSS). From each mouse several arterial segments were used for functional and biochemical studies as described below.

In a separate series of experiments, we used dissociated smooth muscle cells of tail arteries for electrophysiological studies.

The procedure followed in the care and euthanasia of the study animals was in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals (authorization #00577).

Pressure myography

A segment of artery, approximately 300 μ m in internal diameter and 2 mm long was cannulated at both ends and mounted in a video monitored perfusion system as previously described²⁷.

Briefly, cannulated arterial segments were bathed in a 5 ml organ bath containing a PSS maintained at a pH of 7.4, a pO₂ of 160 mmHg and a pCO₂ of 37 mmHg. Arterial diameter was measured and recorded continuously using a video monitoring system (Living System Instrumentation Inc., Burlington, VT). Pressure and flow rate could be changed independently. In order to measure MT, diameter changes were measured in each segment when intraluminal pressure was set at 10, 25, 50, 75, 100 and 125 mmHg. Arteries were then submitted to 75 mmHg of pressure and further contracted with phenylephrine (PE) and serotonin in order to maintain a stable and reproducible tone in the different groups. Intraluminal flow was then increased by step (0 to 100 µl/min) and diameter measured. At the end of each experiment arteries were perfused and superfused with a Ca²⁺-free PSS containing ethylenebis-(oxyethyleninitrolo) tetra-acetic acid (EDTA, 2 mM/L), sodium nitroprusside (10 µM/L) and papaverine (10 µM/L). Pressure steps (10 to 125 mmHg) were then repeated in order to determine arterial passive diameter, i.e., in the absence of smooth muscle tone. Pressure and diameter measurements were collected using a Biopac data acquisition system (Biopac MP 100, La Jolla, CA, USA) and analyzed (Acqknowledge® software, Biopac). Myogenic tone was calculated as percentage of passive diameter and flow-mediated dilation as % dilation of active tone²⁷.

Before each experiment, the contractility of the muscle was tested using PE (1 µM/L) and the integrity of the endothelium was assessed by testing the relaxing effect of acetylcholine (Ach, 1 µM/L)²⁷.

Wire-myography

Two-millimeter long segments of tail arteries were mounted on a wire-myograph (DMT, Aarhus, DK) as previously described²⁸. Two tungsten wires (40 µm in diameter) were inserted into the artery lumen and fixed to a force transducer and a micrometer, respectively. Arteries were bathed in PSS. Before each experiment, the arteries were tested as described above.

PE (3 µM/L)- or U46619 (1 µM/L)-dependent contraction was tested before and after addition of the p38 MAP-Kinase inhibitor SB203580 (10^{-5} M) to the bath.

In a separate series of experiment, arteries were washout with calcium-free PSS containing EGTA and then bath in a calcium-free PSS containing KCl (80 mM/L, 80K PSS). Contraction to calcium was tested by adding cumulative concentrations of calcium 0.1 to 1.2 mM).

Data were expressed as a percentage of the maximum response obtained with KCl (80 mM/L).

Patch clamp analysis:

Dissociation of vascular smooth muscle cells:

Mice were anaesthetized using isoflurane. A segment of tail artery (300 µm internal diameter, 3 to 5 mm length) was dissected and incubated (20 min at 37°C) with papain (1 mg/ml) and DTT (1 mg/ml), followed by a second incubation (5 min at 37°C) in collagenase F (0.7 mg/ml) and collagenase H (0.3 mg/ml). Papain, DTT and collagenase was dissolved in a DCML solution of the following composition (in mM): NaCl 140, KCl 5.6, MgCl₂ 2, HEPES 10, glucose 10, CaCl₂ 0.1 and bovine serum albumin (BSA, 1 mg/ml). Arteries were washed 3 times in cold DCML solution and triturated. Cell suspensions were placed on 35 mm poly-D-lysine coated dishes and kept at 4°C for at least 45 min before recording. Recordings were only performed on elongated cells.

Cell-attached:

Electrophysiological procedure has been previously described²⁹. Briefly, single channel cell-attached or inside-out recordings were performed on acutely dissociated VSMCs at a holding potential (V_{hold}) of -80 mV. Unless stated otherwise, pipette solution contained (in mM): NaCl 140; KCl 5; CaCl₂ 1; MgCl₂ 1; TEA-Cl 10; 4-AP 5; HEPES 10; pH 7.35. Bath solution contained (in mM): KCl 140, MgCl₂ 1, HEPES 10, and glucose 10 (pH 7.25). The osmolality of all solutions was adjusted to 320 mOsm/kg. Membrane patches were stimulated with brief negative pressure pulses through the recording electrode using a pressure-clamp device (ALA High Speed Pressure Clamp-1 system, ALA-scientific).

Histological analysis:

F/G actin ratio on pressure myograph

Segments of resistance arteries were fixed in formaldehyde 4% at 75 mmHg, 10 mmHg or in presence of PE (10^{-6} M) and were mounted in embedding medium (Tissue-Tek, Miles, Inc), frozen in isopentane pre-cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Transverse cross sections (7 μ m thick) were incubated with an globular (G) actin “marker”, DNase I conjugated with alexa fluor 488 and a filamentous (F) actin marker, Phalloidin, conjugated with Alexa Fluor® 546 dye (Invitrogen). Fluorescence was visualized using confocal microscopy (Nikon, Eclipse TE2000S and Solamere Technology, Salt Lake City, UT, USA). Image analysis was performed as previously described using Histolab (Microvision, France)³⁰.

Isolation and culture of SRF-flex2neo (Sf/Sf) SMCs

Primary cultures of SMCs were isolated from the aorta of adult Sf/Sf mice. Briefly, under sterile conditions, the media muscle layer of each aorta was scraped from the endothelium intima

layer, minced into small pieces, pooled and digested with bacterial collagenase (1mg/ml) (Roche) and elastase type III (0,5mg/ml) (Sigma). After inactivation of the enzyme with fetal bovine serum (FBS), cells were allowed to attach to a plastic tissue culture flask for 6 days. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza, Belgium) supplemented with 20% FBS (Gibco) and antibiotics (Cambrex) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air at 37 °C. Cells between their fifth and sixth population doubling level were used for all experiments.

SMC differentiation and adenovirus infection

In order to restore differentiated properties of SMCs, the medium was replaced with a serum-free medium containing a 1:1 (vol/vol) mixture of HAM-F12/DMEM (Lonza, Belgium) complemented with 0,2 mM sodium ascorbate, 1X Insulin-Transferrin-Selenium cocktail (Gibco) and antibiotics for 48h. For adenovirus infection, mouse SMCs containing LoxP elements flanking the second exon of SRF were treated either Adenovirus (Genethon, Evry, France) containing Cre-recombinase associated with a green fluorescent protein (Ad-CRE-GFP) to mediate excision of SRF floxed exon 2, or Adenovirus containing green fluorescent protein alone (Ad-GFP) as control. The Ad-CRE and Ad-GFP virus mediate transgene expression through a human CMV promoter. SMCs infection was performed at 37°C with gentle rocking for 5 h in serum-free medium. Cells were maintained in serum-free medium for 7 days until further analyses.

Immunostainings

SMCs were fixed in 4% formaldehyde solution for 5 min at 37°C. After 3 washes with PBS, cells were permeabilized in 0,2% Triton X-100 for 5 min at RT. No-specific sites were

blocked with 2 % bovine albumin (BSA) in PBS. SMA Staining and F-actin was performed by incubating the cells with monoclonal SMA-Cy3 and phalloidin-TRITC respectively (1:400, sigma, Ref : C6198 ; fluka, Ref : 77418) for 45 min at RT. Detection of filamin-1, and SRF was performed by incubating cells overnight at 4°C with polyclonal filamin-1 antibodies (1:100, Santa Cruz, H300, Ref: SC28284), and polyclonal SRF antibodies (1:100, Santa Cruz, H300, Ref: SC13029). Secondary antibodies were then added (1h30, 25°C, IgG mice cy3 red Jackson laboratory 1:300; anti rabbit DyLight 649 Jackson laboratory 1:300). Slides were mounted in MOWIOL. Immunofluorescence images were collected with an SP5 confocal laser-scanning microscope (DM6000; Leica, Inc.). Images were processed using Image J.

qPCR analysis

After dissection, arterial segments were kept in 100 µL RNA-later (Sigma) at -20°C until RNA extraction using the RNeasy® micro kit (Qiagen). 200 ng of total RNA extracted from each artery were subjected to reverse transcription (RT) with the QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen). Real-time PCR assays were carried out on an ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with Sybr® Green Jumpstart Taq Readymix® kit (Sigma) and gene-specific primers. All data were normalized to the Hprt RNA. Differences in transcript level were determined using the cycle threshold method as described by the manufacturer. mRNA levels are expressed as the log (base 2) of the ratio of the SRF^{smko} mutant to the control mice.

Western Blot Analysis of proteins expression

Western blot analysis was performed in segments of the tail artery. Arterial segments were homogenized using a lysis buffer (1% sodium dodecyl sulfate, 10 mM/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L sodium orthovanadate, and proteases inhibitors cocktail). Extracts were incubated at 4°C

for 30 minutes and then centrifuged (14000 rpm, 15 minutes, 14°C). Proteins concentration was determined using the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). After denaturation at 95°C for 5 minutes, equal amounts of proteins (25 µg) were loaded on a 9% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes for 90 min (100 V, 4°C). Membranes were blocked with 5% bovine albumin (BSA) in T-TBS (20 mM/L Tris, pH 8.0, 150 mM/L NaCl, and 0.1% Tween-20) for 60 minutes and were then incubated with primary antibody in BSA 5% in T-TBS overnight at 4°C. After extensive washing in T-TBS at room temperature, membranes were then incubated with the anti-rabbit horseradish peroxidase antibody (dilution 1:10000, Pierce) or with the anti-mouse horseradish peroxidase antibody (dilution 1:10000, Pierce) for 90 minutes at room temperature. After 3 washes with T-TBS, immunocomplexes were detected by chemiluminescent reaction (SuperSignal West Femto, Pierce) using a computer based imaging system (Fuji LAS 3000 plus; Fuji Medical System). Quantification was performed by densitometric analysis³⁰.

RhoA-GTP measurement

RhoA-GTP was measured in segments of the tail artery using commercially available kit (G-LISA™ RhoA Activation Assay Biochem Kit™ ; BK124, Cytoskeleton).

Calcium analysis

Fura-2AM Ca²⁺ imaging:

Freshly dissociated smooth muscle cells (SMC) were incubated for 20 min at room temperature, in darkness, with 2 µM Fura-2AM (molecular probes) and 0.002% pluronic acid. A modified tyrode solution containing in mM: NaCl₂ 140, KCl 4, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, glucose 5, Hepes 10, at pH 7.4 was used during all the experiment. After 10 min wash, ratiometric imaging of internal calcium

level on SMC was done on a microscope (lens x40, Axio Observer, Zeiss) equipped with a CCD camera (CoolSNAP, Roper scientific). An appropriate field of cells was identified and was excited with wavelengths of 340 and 380 nm and images were collected and stored at each wavelength, every second, with 150 ms exposure. The ratio of fluorescence emitted at 510 nm analyzed after subtraction of background fluorescence levels was acquired during 5 min using a data acquisition software (Metafluor, Roper Scientific). At the end of the experiment, SMC were perfused with a tyrode solution containing ionomycin (4 $\mu\text{g/ml}$) and then with a solution without calcium containing in mM: EDTA 100, KCl 4, MgCl_2 2, Hepes 10, at pH 7.4. This allows converting ratios to calcium concentrations using standard calculation³¹. Images were analyzed offline with imaging software (Metafluor, Roper Scientific).

Statistical analysis:

Results are expressed as means \pm s.e.m. Significance of the differences between groups is determined by analysis of variance (one factor ANOVA, or ANOVA for consecutive measurements, when appropriate) or unpaired student t-test. P values less than 0.05 are considered to be significant.

RESULTS

Vascular reactivity

Blood pressure (WT=108 \pm 6 mmHg, SRF^{smko} =101 \pm 6 mmHg, N=6) and body weight (WT=24 \pm 2 g, SRF^{smko} =22 \pm 3 g, N=10) were not affected by the decrease of SRF in SRF^{smko} mutant mice at 14 days after tamoxifen injection. The absence of SRF did not affect arterial passive diameter (Figure 1A). Increasing pressure by step (10 to 125 mmHg) induced a contraction,

myogenic tone, in resistance arteries. The absence of SRF strongly reduced myogenic tone in isolated caudal arteries (Figure 1A). On the other hand, Phenylephrine- and U46619-induced contractions were not affected by the absence of SRF (Figure 1B).

Mechanosensitive channels and MT

We then examined SAC activity in vascular smooth muscle cells (VSMCs) freshly dissociated from resistance mesenteric arteries of WT and SRF^{smko} mice. In cell-attached patches, brief negative pulses applied through the recording electrode evoked the reversible opening of SACs (Figure 2A). The amplitude of averaged currents was significantly lower in SRF^{smko} myocytes (Figures 2A and 2B). At the single channel level, the conductance was identical in both conditions (27.4 ± 0.3 pS, n=51, and 27.2 ± 0.3 pS, n=50, for WT and SRF^{smko} myocytes respectively, p=0.471), and similar to previously published values³², confirming that we were recording from the same channels. Moreover, we observed a significant augmentation (p=0.006) in the minimum pipette pressure needed to trigger channel opening in SRF^{smko} myocytes (Figure 2C). When channel activity in function of pressure was fitted by a Boltzmann equation (Figure 2B), we observed that SAC activity of both genotypes saturated near -80 mmHg, indicating that all the channels in that patch were activated.

When the patches were excised in the inside-out configuration we observed the increase in the current due to the loss of cytoskeleton already described³² but the current was still much lower in SRF^{smko} mice (Figure 2D).

Actin polymerization

As actin dynamics have been implicated in the development of MT and SAC activation^{14,32}, we examined the F/G actin ration in VSMCs. Increasing pressure from 10 mmHg to 75 mmHg induced myogenic tone and an increased F/G actin ratio in arteries isolated from control mice. In SRF^{smko} mice arteries the F/G ratio did not change when pressure was increased from 10 to 75 mmHg (Figure 3A).

Co-staining of SRF(blue)-Actin F(red) and Filamine A (blue)-Actin F(red) (Figure 3B) on isolated cells from WT and SRF^{smko} mice demonstrated a decrease of SRF, Actin polymerization and Filamin A staining in SRF^{smko} mice.

RNA and protein analysis of the microvascular artery

Specific genes expression involved in smooth muscle contractility was then investigated in mRNA levels. SM-MHC, MLCK, SM-actin, Elk1, profilin and filamin A mRNA levels were reduced in SRF^{smko} mice compared to wild type animals (Figure 4) while the expression of MRTFs, Erk, p38, FAK was not affected.

Furthermore, amounts of proteins involved in smooth muscle contraction like MLCK, and MLC were decreased in SRF^{smko} mice (Figure 4). Surprisingly the quantity of FAK is increased in SRF^{smko} mice but not the pFAK/FAK ratio. RhoA and activated RhoA protein were not modified by the absence of SRF. Furthermore, Filamin A, an important cytoskeletal element is strongly decreased in SRF^{smko} mice (Figure 4)

MAPK p38 activity

The expression level of p38 was similar in SRF^{smko} and WT whereas the activity reflected by the ratio of phospho-p38/p38 was significantly increased in the absence of SRF (Figure 5A). Then, we evaluated the involvement of p38 in MT, PE- and U46619-induced contraction. The effect of

the p38 inhibitor SB203580 on PE- and U46619-induced contraction was higher in arteries from SRF^{smko} mice than in control arteries (Figure 5B).

Calcium analysis (supplemental data)

The sensitivity to calcium of contractile apparatus, illustrated by the vasoconstriction induced by exogenous calcium in 80 mM KCl-rich PSS, was similar in SRF^{smko} and WT mice (supplement S1).

Furthermore, we measured the baseline calcium concentrations in freshly dissociated smooth muscle cells. We found no difference between SRF^{smko} and WT mice with calcium concentrations (in nM) of 83.60 ± 7.65 (n=56) and 79.94 ± 11.29 (n=21) respectively (p=0.8, permutation test) (supplement S1).

On specific endothelial SRF KO mice (SRF^{endo}), contractions to phenylephrine and U46619 as well as myogenic tone were unaffected (supplement S2).

DISCUSSION

In this study, we show that SRF has a key role in pressure-dependent mechanotransduction in small resistance arteries (Figure 1). The absence of SRF in smooth muscle cells impaired both pressure-induced (myogenic) tone and the mechanosensitive channels activity in the tail artery (Figure 2). In parallel the deletion did not alter U46619- and PE-induced contraction, suggesting the selectivity of the effect.

As Stretch activated channels (SAC) have an important role in myogenic tone^{6,7,32}, we examined the characteristics of SAC in arteries isolated from SRF^{smko} mice. We found that in the absence of SRF, the sensitivity (first opening channel) and the activity (mean ionic current) of SAC were decreased. Interestingly, the percentage of patches in which at least one SAC was observed

(termed active patches) was not different between the two genotypes, suggesting that the reduced SAC activity (NPo) in SRF^{smko} myocytes is due to either a lower number (N) of SACs in active patches, or to a reduced probability of opening (Po) of SACs in these active patches. The significantly lower activity in SRF^{smko} cells suggests that the number of active channels in these patches might be reduced. Furthermore, inside-out experiment suggests that a cytoskeleton-independent regulation of SACs by SRF might also be present. Those results suggest a relation between SACs and SRF in MT. We also found that actin filaments polymerization was altered in mice lacking SRF in SMCs (Figure 3). This finding is consistent with previous studies on adult cardiac and visceral smooth muscle cells lacking SRF^{23,25}. Thus, the decrease in MT found in SRF^{smko} mice could be due, at least in part, to this decrease in actin polymerization and filamin content. This is in agreement with a previous study showing that the inhibition of actin polymerization with cytochalasin D inhibited the development of MT¹⁴.

The mRNA expression of several genes involved in smooth muscle cell contraction was also altered in SRF^{smko} mice. In addition, both MLCK, and myosin light chain mRNA and protein levels were decreased in arteries from SRF^{smko} mice. These proteins are involved in myogenic tone but also in the contractions induced by the pharmacological agents, phenylephrine and U46619. As phenylephrine- and U46619-induced contractions were not modified by the SRF deletion in VSMCs we further analyzed the pathways potentially involved in the contractions.

We thus measured the activity of the two MAP-kinase ERK1/2 and p38, both potentially involved in arterial contractility but not involved or minimally involved in MT. ERK1/2 activity was not affected by the absence of SRF in tail arteries. This is consistent with our previous study showing that ERK1/2 is not involved in MT³³. On the other hand, we found that the ratio of phospho-p38/p38 was increased in SRF^{smko} arteries. Interestingly, FAK expression, an upstream activator of P38 is also significantly increased in SRF^{smko} arteries, although the ratio of

phosphorylated FAK/FAK is only slightly increased in SRF^{smko} SMCs due to the high level of FAK. We have previously shown that the angiotensin II increases phosphorylation of FAK and P38 in VSMCs³⁴ and that P38 is strongly involved in U46619-induced contraction³⁵ but minimally involved in MT³⁶. Furthermore, p38 inhibition with SB203580 attenuated phenylephrine- and U46619-induced contraction without significantly reducing MT in arteries from SRF^{smko} mice. These findings suggest that increased FAK and p38 activity in SRF^{smko} mice could reflect a compensatory mechanism allowing agonist-dependent contraction to remain active in arteries from SRF^{smko} mice.

Thus, the present finding provides a novel pathway (SRF-actin-filamin-SAC) involved selectively in the myogenic tone in a resistance artery.

Sources of funding

This work was supported in part by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), Paris, France. Kevin Retailleau was supported by Angers-Loire Metropole.

Acknowledgements:

We thank the local Animal Care Unit of the University of Angers and Jérôme Roux, Pierre Legras, Dominique Gilbert for their kind help in treating the rats.

Disclosures: None

REFERENCES

1. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990;70(4):921-961.
2. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999;79(2):387-423.
3. Schubert R, Kalentchuk VU, Krien U. Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(6):H2288-2295.
4. Hughes JM, Bund SJ. Arterial myogenic properties of the spontaneously hypertensive rat. *Exp Physiol.* 2002;87(5):527-534.
5. Ungvari Z, Pacher P, Kecskemeti V, Papp G, Szollar L, Koller A. Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca²⁺ channels and protein kinase C. *Cardiovasc Res.* 1999;43(4):1018-1028.
6. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res.* 2002;90(3):248-250.
7. Park KS, Kim Y, Lee YH, Earm YE, Ho WK. Mechanosensitive cation channels in arterial smooth muscle cells are activated by diacylglycerol and inhibited by phospholipase C inhibitor. *Circ Res.* 2003;93(6):557-564.
8. Wesselman JP, VanBavel E, Pfaffendorf M, Spaan JA. Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res.* 1996;33(1):32-41.
9. Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science.* 1992;256(5056):532-535.
10. Laher I, van Breemen C, Bevan JA. Stretch-dependent calcium uptake associated with myogenic tone in rabbit facial vein. *Circ Res.* 1988;63(3):669-672.
11. Laher I, Vorkapic P, Dowd AL, Bevan JA. Protein kinase C potentiates stretch-induced cerebral artery tone by increasing intracellular sensitivity to Ca²⁺. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165(1):312-318.
12. Osol G, Laher I, Kelley M. Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 2):H415-420.
13. Balasubramanian L, Ahmed A, Lo CM, Sham JS, Yip KP. Integrin-mediated mechanotransduction in renal vascular smooth muscle cells: activation of calcium sparks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(4):R1586-1594.
14. Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J.* 2002;16(1):72-76.
15. Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(6):577-593.
16. Treisman R. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4(1):96-101.
17. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell.* 2003;113(3):329-342.
18. Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, Treisman R. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science.* 2007;316(5832):1749-1752.

19. Wang DZ, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schrott G, Richardson JA, Nordheim A, Olson EN. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):14855-14860.
20. Chang J, Wei L, Otani T, Youker KA, Entman ML, Schwartz RJ. Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation*. 2003;108(4):407-413.
21. Davis FJ, Gupta M, Pogwizd SM, Bacha E, Jeevanandam V, Gupta MP. Increased expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of SRF in human failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(4):H1521-1533.
22. Chow N, Bell RD, Deane R, Streb JW, Chen J, Brooks A, Van Nostrand W, Miano JM, Zlokovic BV. Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):823-828.
23. Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation*. 2005;112(19):2930-2939.
24. McDonald OG, Owens GK. Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics. *Circ Res*. 2007;100(10):1428-1441.
25. Mericskay M, Blanc J, Tritsch E, Moriez R, Aubert P, Neunlist M, Feil R, Li Z. Inducible mouse model of chronic intestinal pseudo-obstruction by smooth muscle-specific inactivation of the SRF gene. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1960-1970.
26. Kuhbandner S, Brummer S, Metzger D, Chambon P, Hofmann F, Feil R. Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis*. 2000;28(1):15-22.
27. Loufrani L, Levy BI, Henrion D. Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res*. 2002;91(12):1183-1189.
28. Loufrani L, Matrougui K, Li Z, Levy BI, Lacolley P, Paulin D, Henrion D. Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. *Faseb J*. 2002;16(1):117-119.
29. Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M, Honore E. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J*. 2005;24(1):44-53.
30. You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2005;111(8):1006-1011.
31. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-3450.
32. Sharif-Naeini R, Folgering JH, Bichet D, Duprat F, Lauritzen I, Arhatte M, Jodar M, Dedman A, Chatelain FC, Schulte U, Retailleau K, Loufrani L, Patel A, Sachs F, Delmas P, Peters DJ, Honore E. Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell*. 2009;139(3):587-596.
33. Loufrani L, Lehoux S, Tedgui A, Levy BI, Henrion D. Stretch induces mitogen-activated protein kinase activation and myogenic tone through 2 distinct pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(12):2878-2883.
34. Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, Gardner H, Thornton SN, Challande P, Li Z, Lacolley P. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and

angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(4):H2597-2604.

35. Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane-induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res*. 2002;39(4):353-360.
36. Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension*. 2005;45(5):974-979.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1

(A) Pressure-diameter (passive arterial diameter and myogenic tone) and (B) contraction induced by phenylephrine and U46619, relationship determined in resistance arteries. Arteries were isolated from control and SRF^{smko} mice 14 days after tamoxifen injection.

Values are mean±SEM.

*p<0.05, SRF^{smko} arteries compared to control arteries.

Figure 2

Mean SAC activity (NPo), recorded in cell-attached patches and inside-out configuration, as a function of pressure in WT and SRF^{smko} VSMCs

Figure 3

(A) G and F actin staining in caudal resistance arteries from control and SRF^{smko} mice.

F and G actin levels were quantified by image analysis.

(B) Co-staining of SRF(blue)-Actin F(red) and Filamine A (blue)-Actin F(red) (Figure 3B) on isolated cells from WT and SRF^{smko} mice.

*p<0.05, control versus SRF^{smko}.

Figure 4

RNA and protein expression levels in caudal resistance arteries from control and SRF^{smko} mice.

*p<0.05, control versus SRF^{smko} (n=6 per group)

Figure 5

(A) Protein expression levels of MAP Kinase p38 and phosphorylated form Pp38 in resistance arteries from control and SRF^{smko} mice.

(B) Contraction induced by phenylephrine and U46619 determined after MAP Kinase p38 inhibition in resistance arteries. Arteries isolated from control and SRF^{smko} mice.

Values are mean \pm SEM.

* $p < 0.05$, control versus SRF^{smko} (n=6 per group)

Supplemental data:

Figure S1

Left: Calcium induced contractility in tail arteries from wild type (WT) and SRF^{smko} mice.

Right: Baseline calcium concentrations (in nM) in freshly dissociated smooth muscle cells from SRF^{smko} and WT mice.

Values are mean \pm SEM.

Figure S2

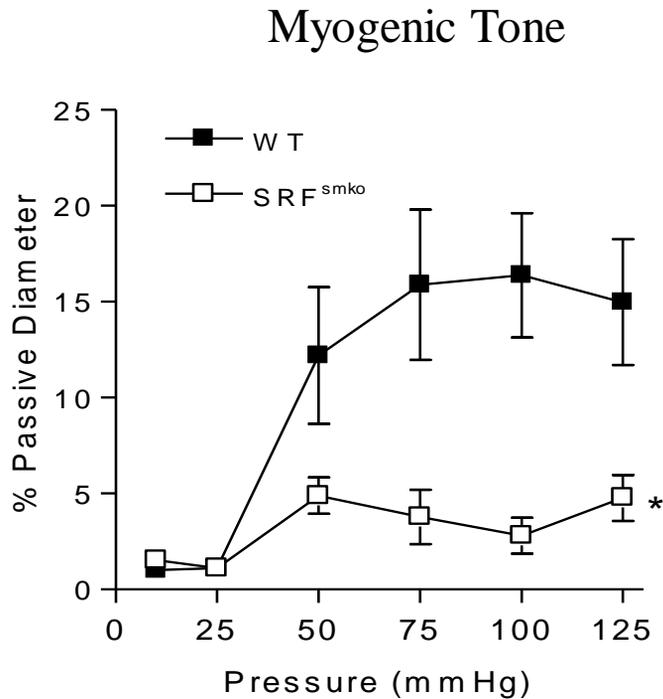
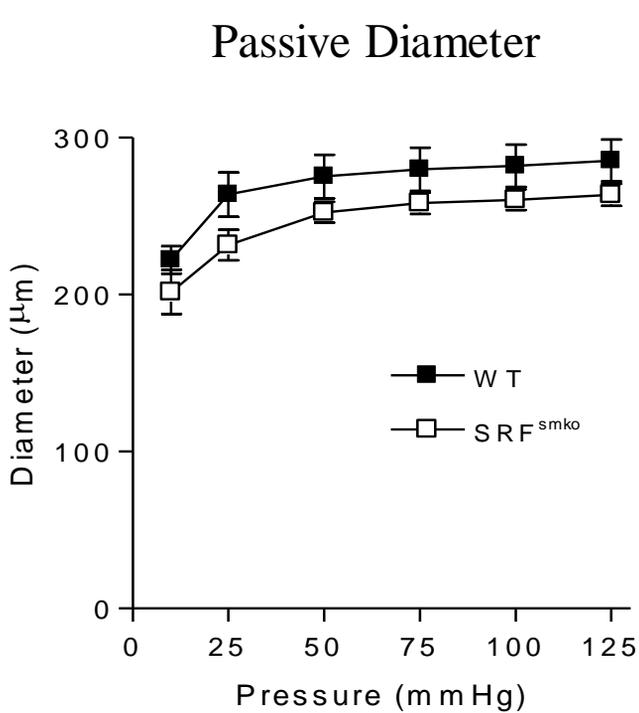
(A) contraction induced by phenylephrine and U46619; (B) Pressure-diameter (passive arterial diameter and myogenic tone) relationship determined in resistance arteries. Arteries were isolated from control and SRF^{endo} mice.

Values are mean \pm SEM,

* $p < 0.05$, control versus SRF^{smko} (n=6 per group)

Fig. 1

A



B

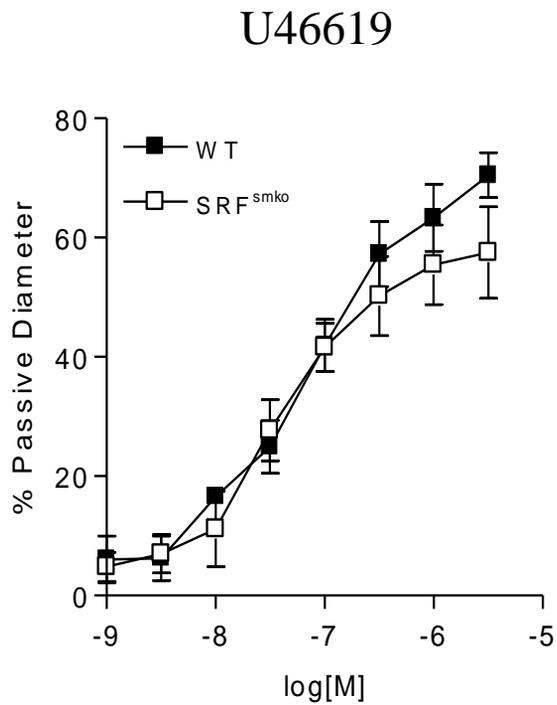
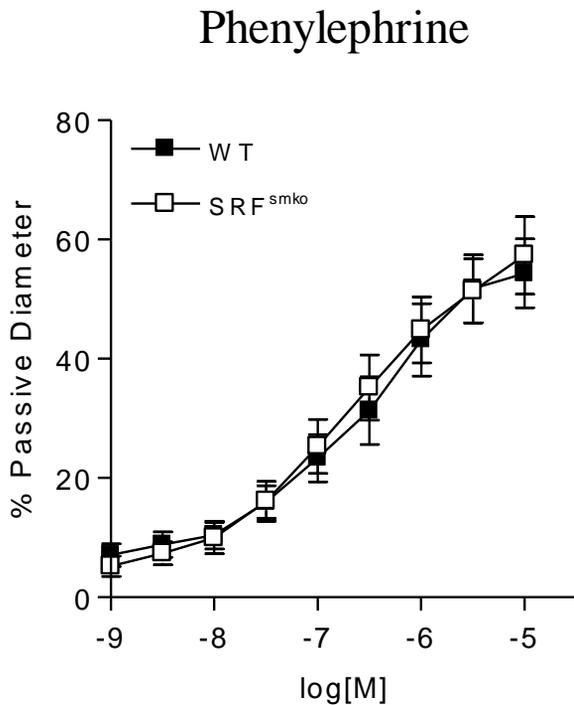


Fig. 2

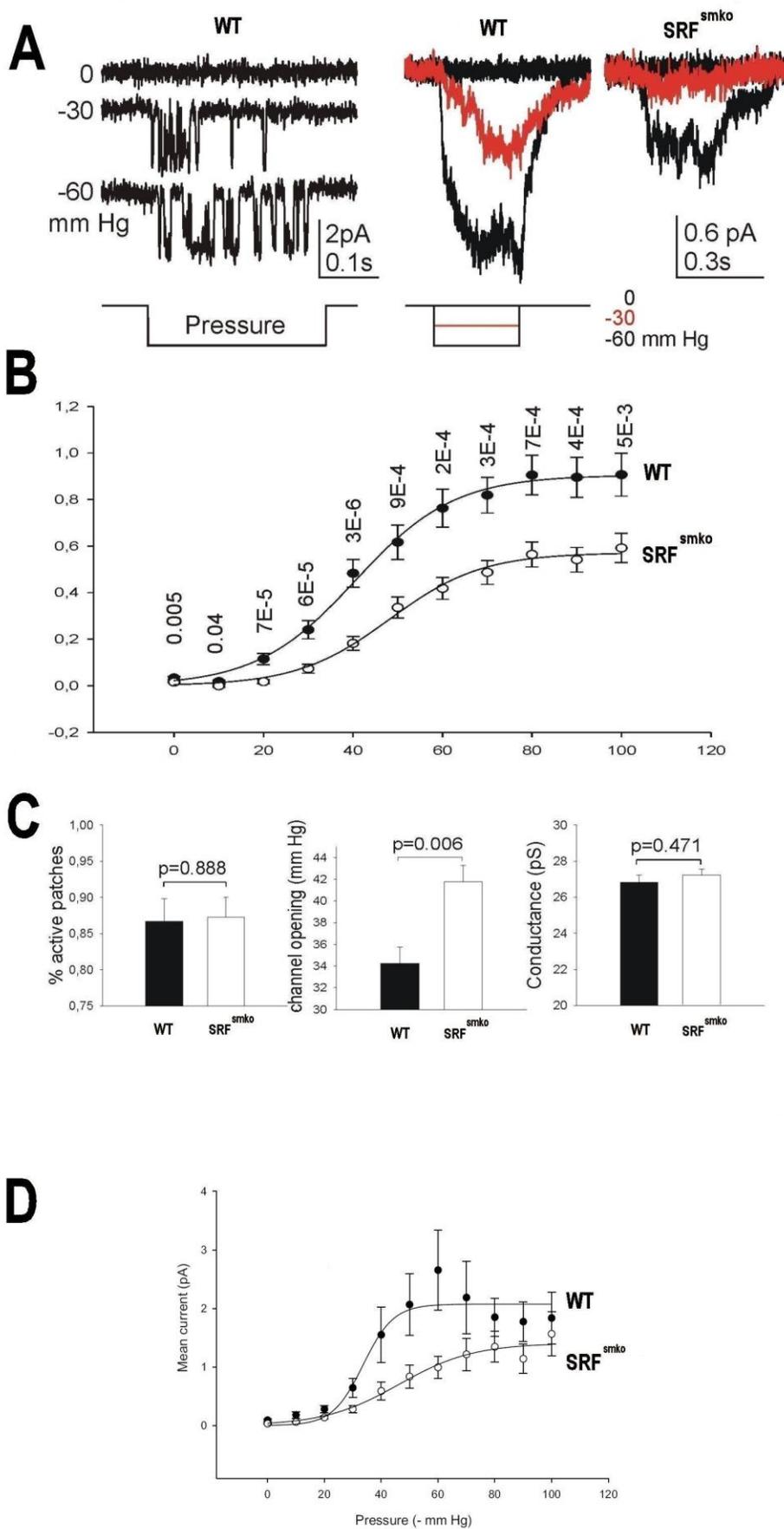


Fig. 3

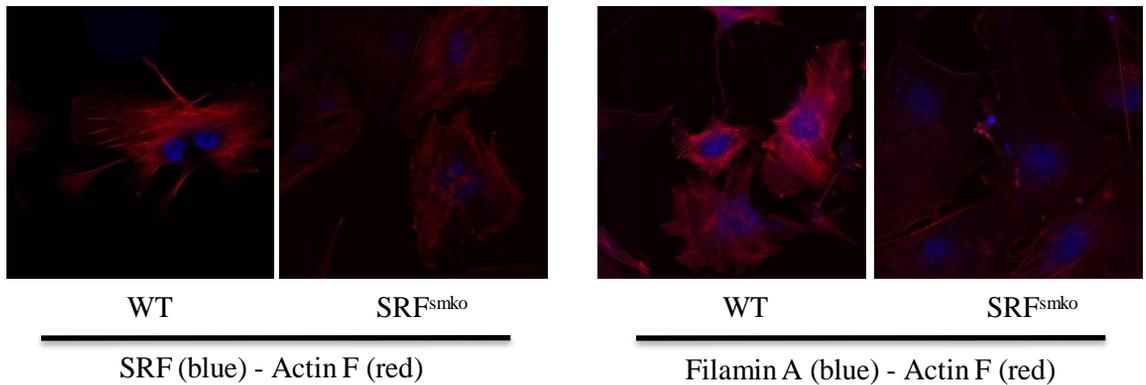
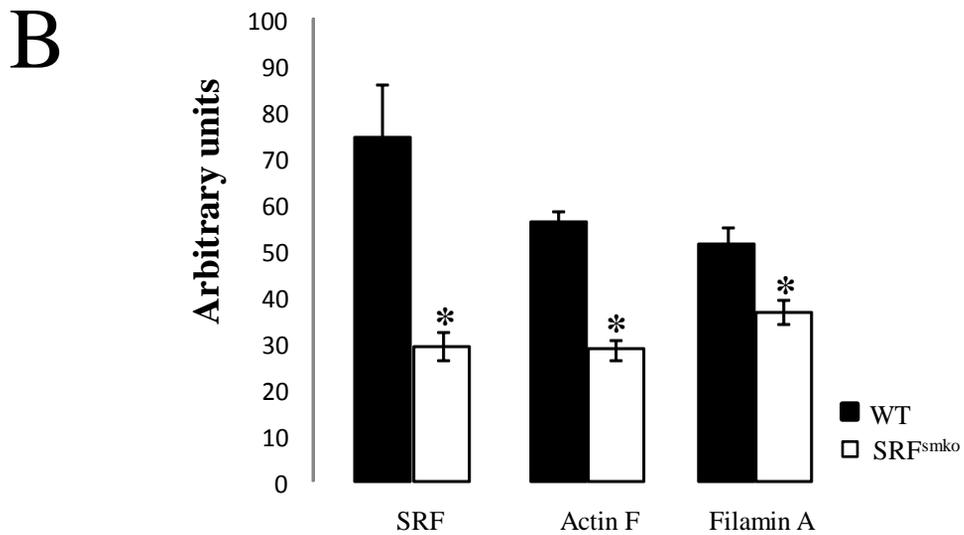
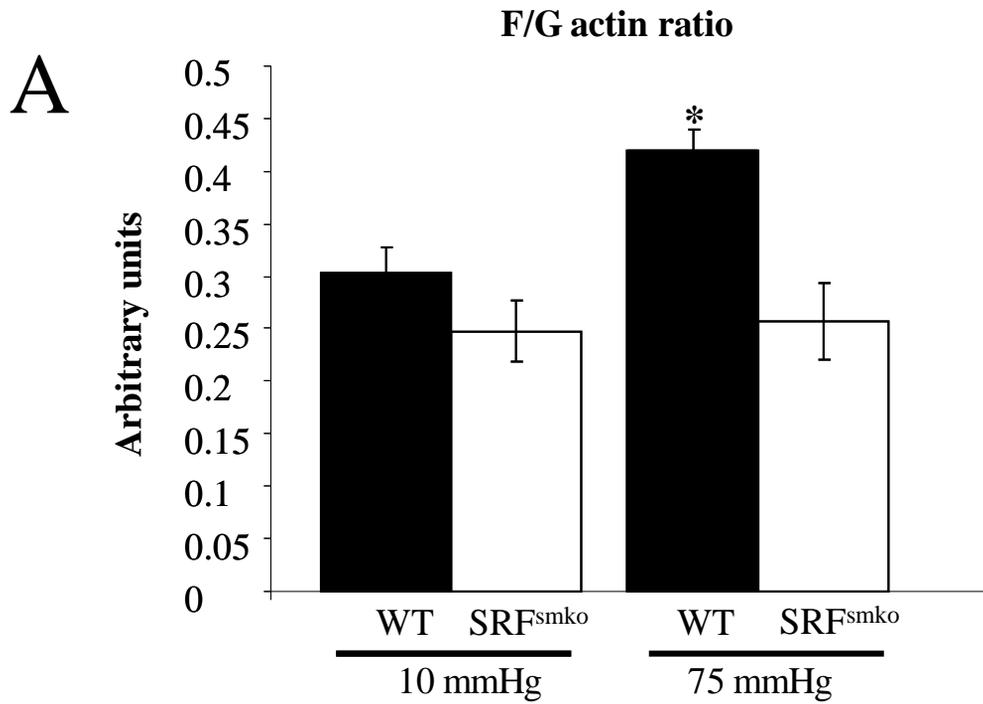
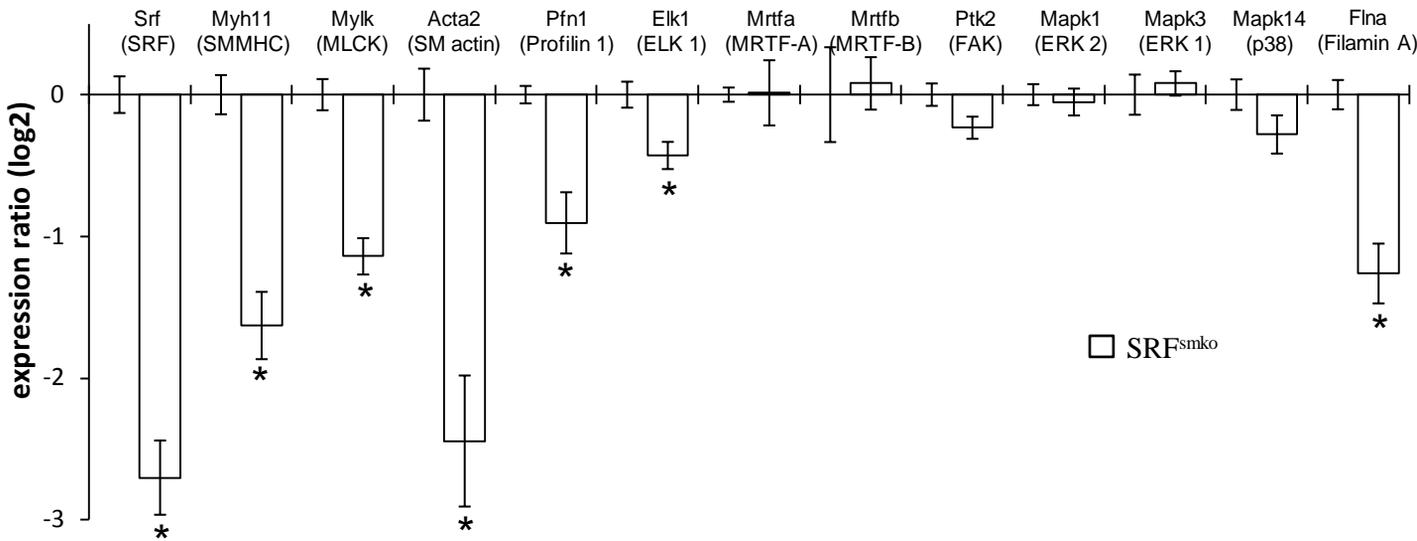


Fig. 4

Gene expression



Protein expression

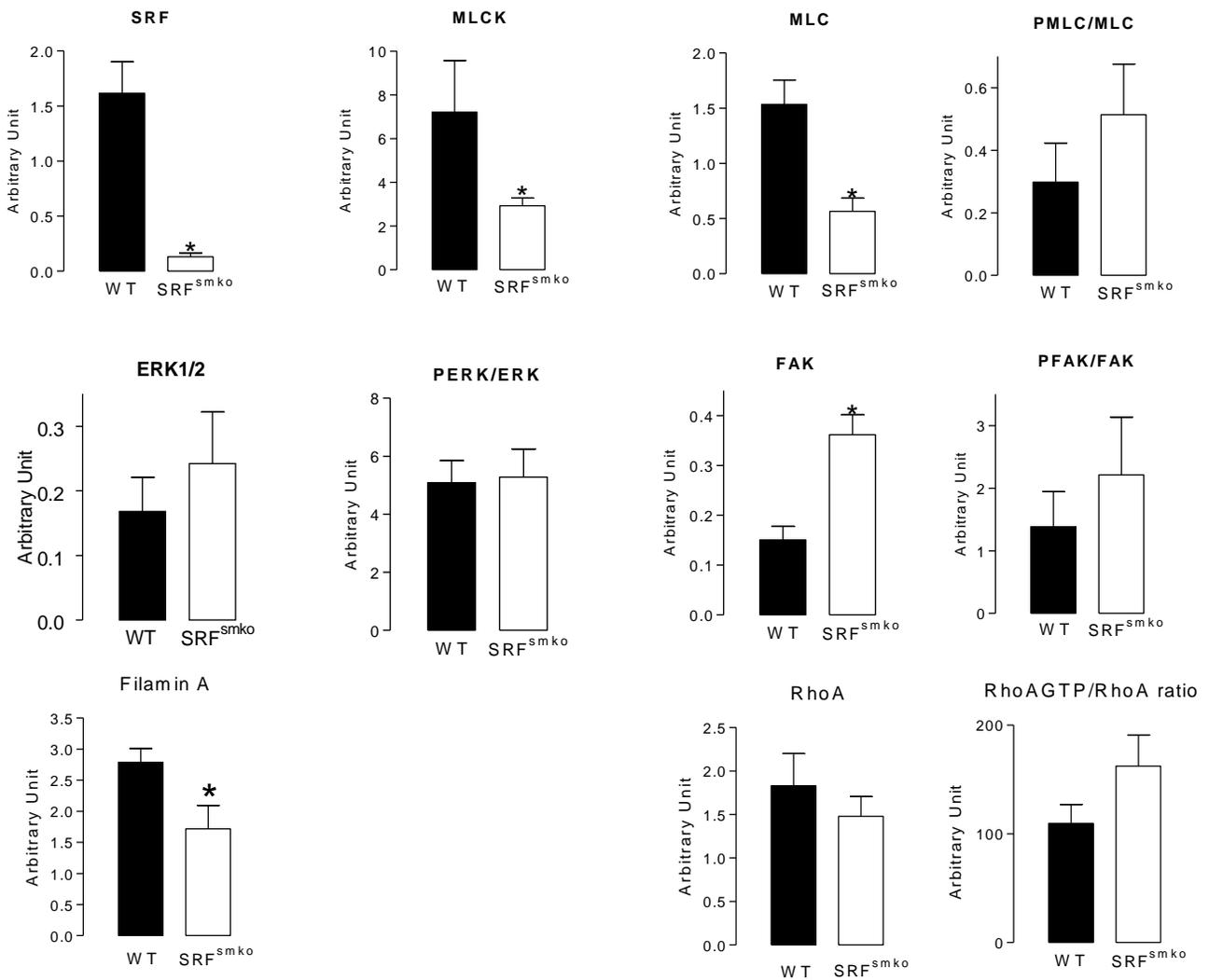
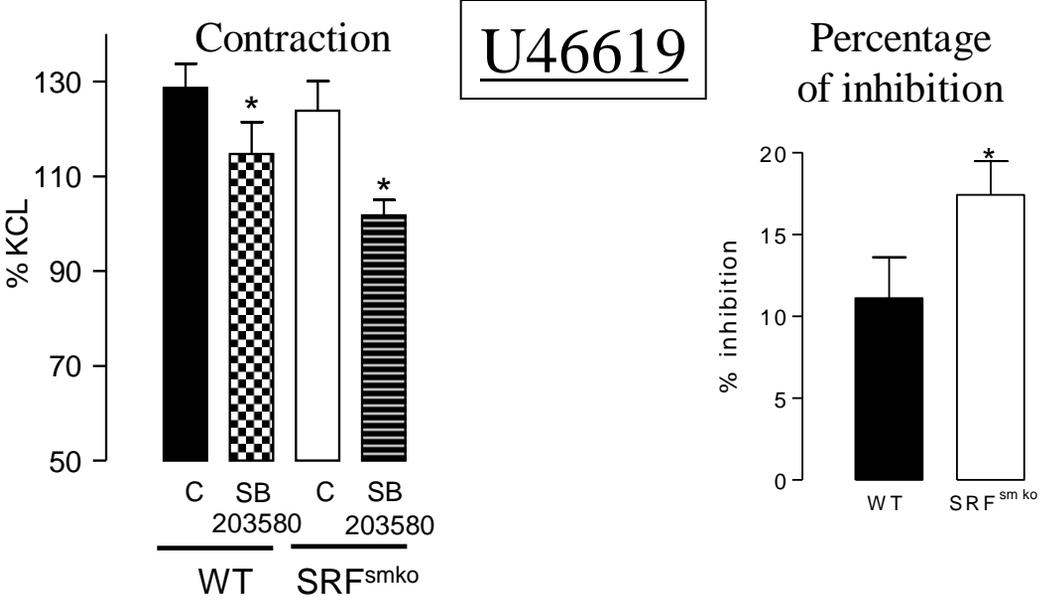
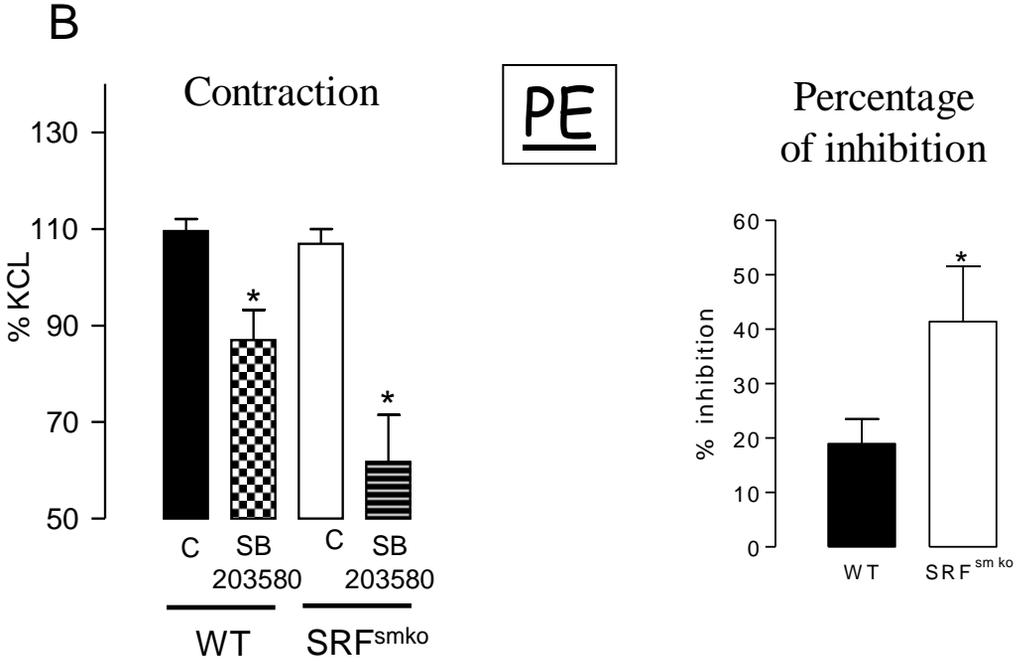
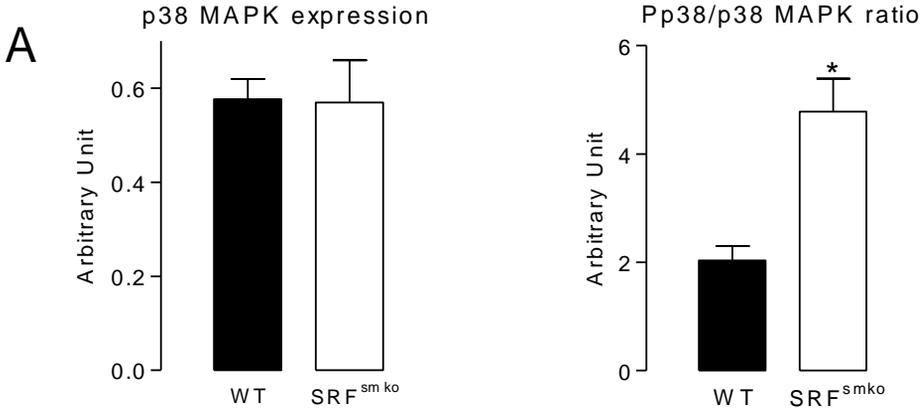
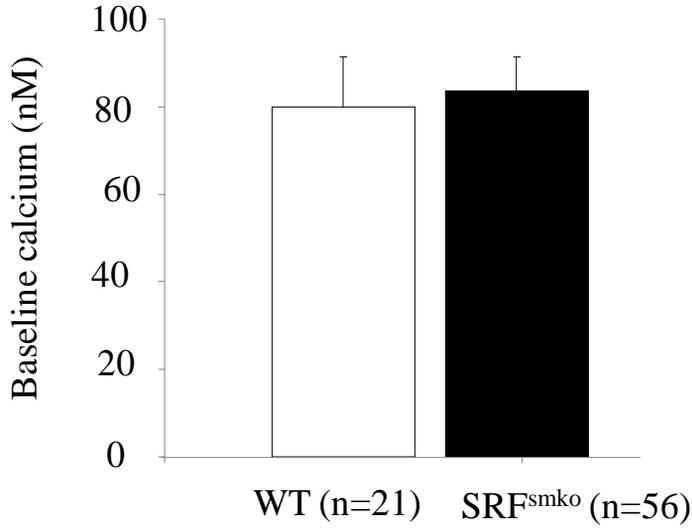
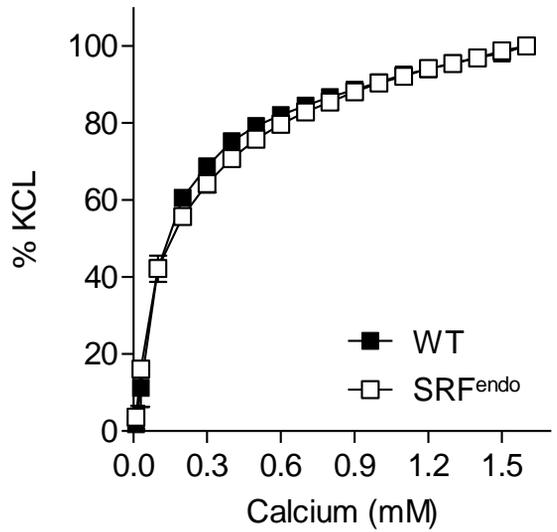


Fig. 5



Supplemental data S1

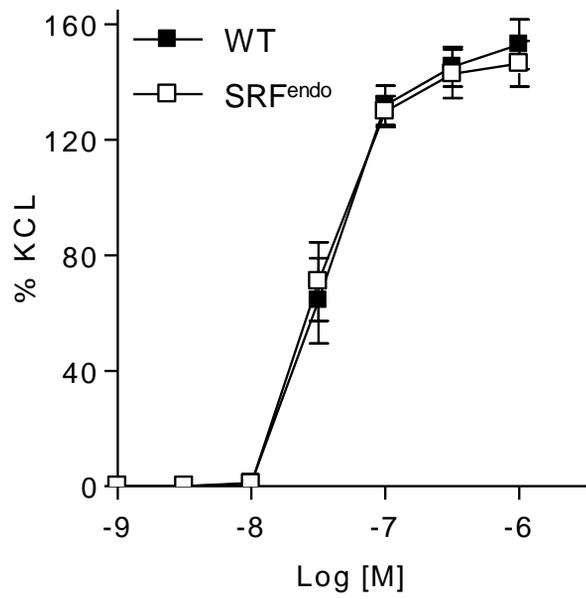
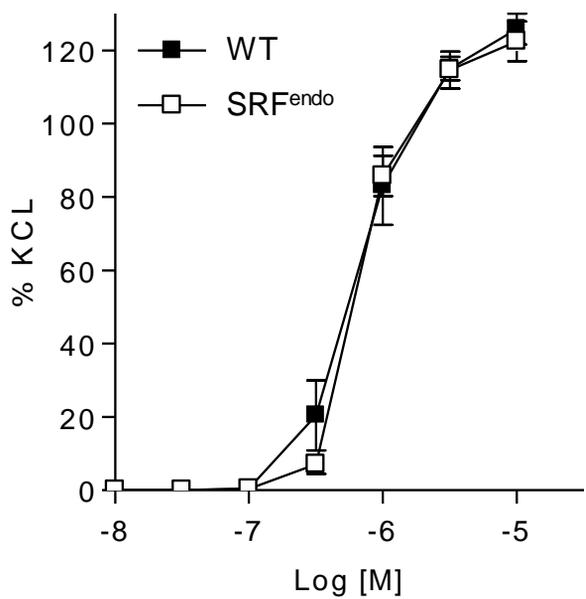


Supplemental data S2

A

Phenylephrine

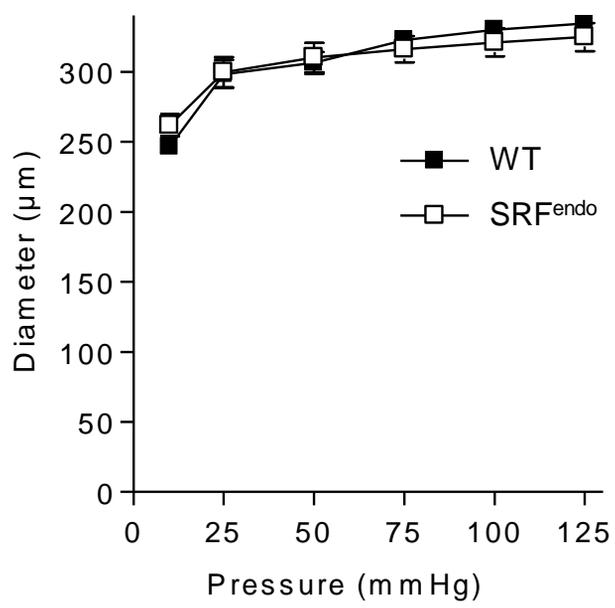
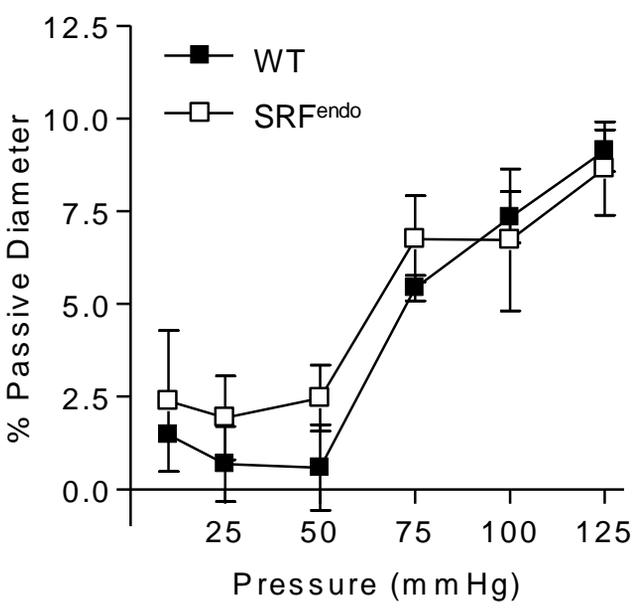
U46619



B

Myogenic Tone

Passive Diameter



SRF^{endo} endothelial cell

ARTICLE 4

The PDE5 inhibitor treatment and its interruption affect myogenic tone in rat resistance arteries.

K. Retailleau^{1,2,3}, D. Tsvirkun^{1,2,3}, C. Baron-Menguy^{1,2,3}, A.L. Guihot^{1,2,3}, B. Toutain^{1,2,3}, L. Grimaud^{1,2,3}, P. Pacaud^{4,5}, G. Loirand^{4,5,6}, D. Henrion^{1,2,3} and L. Loufrani^{1,2,3} *En préparation*

¹INSERM U771, Angers, F-49045, France

²CNRS UMR 6214, Angers, F-49045, France

³Université d'Angers, Angers, F-49045, France

⁴Inserm, U915, Nantes, F-44007, France.

⁵University of Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44007, France.

⁶CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44007, France.

Résumé :

Le Sildénafilest un vasodilatateur utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Cet inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5 entraîne une augmentation du GMPc activant ainsi la protéine kinase G (PKG), qui phosphoryle ses diverses cibles provoquant une vasodilatation. Une des cibles de la PKG est la petite protéine G RhoA. La phosphorylation de RhoA par la PKG empêche sa translocation à la membrane et donc inhibe l'activation de ces effecteurs tels que la Rho-kinase. Le rôle de la voie RhoA/Rho-kinase dans le TM n'étant plus à démontrer, il était intéressant pour nous d'étudier quel serait l'effet d'une inhibition chronique de cette voie sur la mécanotransduction vasculaire ainsi que les conséquences engendrées par l'arrêt de ce traitement.

Cette étude a été effectuée sur des rats Wistar traités avec du Sildénafile (25mg/kg/j) pendant 18 jours. Les paramètres physiologiques ont été mesurés *in vivo* par télémétrie, et des études *ex vivo* et *in vitro* sur des artères mésentériques ont été effectuées avant, pendant et après le traitement.

L'étude *in vivo* a mis en évidence une diminution des pressions artérielles systolique et diastolique, durant le traitement, respectivement de $-5,73 \pm 0,23\%$ et $-3,08 \pm 0,24\%$ par rapport à la pression de base. L'arrêt du traitement engendre une augmentation rapide de pression ($+10,11 \pm 0,25\%$ pour la pression systolique et de $+9,17 \pm 0,41\%$ pour la pression diastolique). L'étude histomorphométrique révèle la mise en place d'un remodelage expansif hypertrophique durant le traitement qui persiste après la fin du traitement. L'analyse de la réactivité vasculaire montre une augmentation des réponses à la phényléphrine et au KCl des artères de rats traités, alors que le TM est inférieur à la normale durant le traitement et plus élevé à l'arrêt. Cette étude a été complétée par une analyse biochimique montrant la surexpression de RhoA. L'utilisation d'un inhibiteur de la Rho-kinase (Fasudil ; 40mg/kg/j) lors de l'arrêt du traitement au Sildénafile atténue le pic de pression.

La levée de l'inhibition de RhoA par le Sildénafile lors de l'arrêt du traitement provoquerait une augmentation de la quantité et de la disponibilité de RhoA, conduisant ainsi à une suractivation de cette voie. L'hypertension engendrée par l'arrêt du traitement résulte d'une augmentation du TM associée à une hypercontractilité vasculaire. L'existence d'un tel effet dit « effet rebond » consécutif à l'arrêt d'un traitement au Sildénafile pourrait être un facteur de risque lors de traitement de l'HTAP, cependant l'utilisation de fasudil permettrait en partie de contrecarrer cet effet rebond.

INTRODUCTION :

L'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP) est une pathologie touchant environ 2000 cas en France par an et dont on ne connaît pas la cause. Cette pathologie touche les adultes jeunes (entre 20 et 40 ans, et plus particulièrement les femmes) et se caractérise par une augmentation de la pression à l'intérieur des artères pulmonaires. Cette augmentation de pression résulte d'une vasoconstriction exacerbée et se caractérise par un épaissement très important de la paroi des artérioles pulmonaires. Ce remodelage artériel pulmonaire, consistant en l'obstruction du vaisseau par la prolifération des cellules musculaires lisses et endothéliales, représente la principale cause de l'HTAP¹. Progressivement, les résistances vasculaires pulmonaires augmentent, ce qui conduit à une insuffisance cardiaque droite pouvant dans les cas extrêmes entraîner la mort. La diminution de la biodisponibilité du NO, puissant vasodilatateur endogène, semble être un facteur important dans la mise en place de l'HTAP². Il a été démontré que la diminution de NO, au niveau de cultures de cellules endothéliales humaines en condition d'hypoxie, était causée par la voie RhoA/Rho-kinase³. L'inhibition de la Rho-kinase au niveau de différents modèles d'HTAP prévient le développement du remodelage vasculaire ainsi que de l'élévation de la pression artérielle pulmonaire^{4,5}.

Le tonus vasculaire induit par la pression (tonus myogénique ; TM) est une caractéristique des artères de résistance. Ce mécanisme contractile joue un rôle important dans la régulation du diamètre vasculaire. Le TM, comme les contractions induites par l'activation de récepteurs, nécessite une dépolarisation membranaire et une entrée de calcium⁶. Cependant, la sensibilisation au calcium de l'appareil contractile tient une place plus importante dans le cas de la contraction myogénique⁷. Rho-kinase a un rôle majeur dans le processus de sensibilisation au calcium. Comme décrite précédemment, la translocation à la membrane de la protéine RhoA, induite par une augmentation de pression, est nécessaire à l'activation de la Rho-kinase et au développement du TM. Un inhibiteur de cette translocation aurait alors un effet sur le développement de la contraction myogénique.

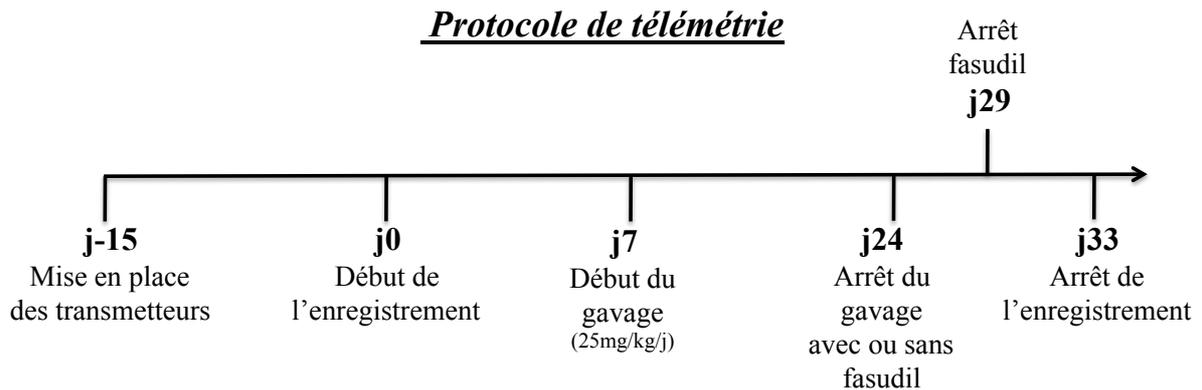
Le Sildénafil (Viagra[®]) est une molécule hypotensive couramment utilisée dans le traitement de l'HTAP car il mime les effets vasodilatateurs du NO et inhibe la voie RhoA/Rho-kinase. Son effet inhibiteur sur la phosphodiesterase de type 5 (PDE5), conduit à une inhibition de la dégradation de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et donc à une augmentation de l'activité de la PKG, provoquant alors une relaxation du muscle lisse vasculaire. De plus, cet effet est potentialisé du fait que l'activation de la PKG favorise l'accumulation cytoplasmique de RhoA, entraînant alors une baisse de son activité^{8,9}. Cet

effet vasodilatateur entraîne une augmentation du flux sanguin et permet une meilleure perfusion des organes, ce qui a valu au Sildénafil une place importante dans le traitement des troubles de l'érection. Les circonstances d'utilisation de cette molécule peuvent nécessiter des traitements à long terme, or l'effet d'un traitement chronique augmentant le flux sanguin a potentiellement des conséquences sur la structure et la réactivité vasculaire.

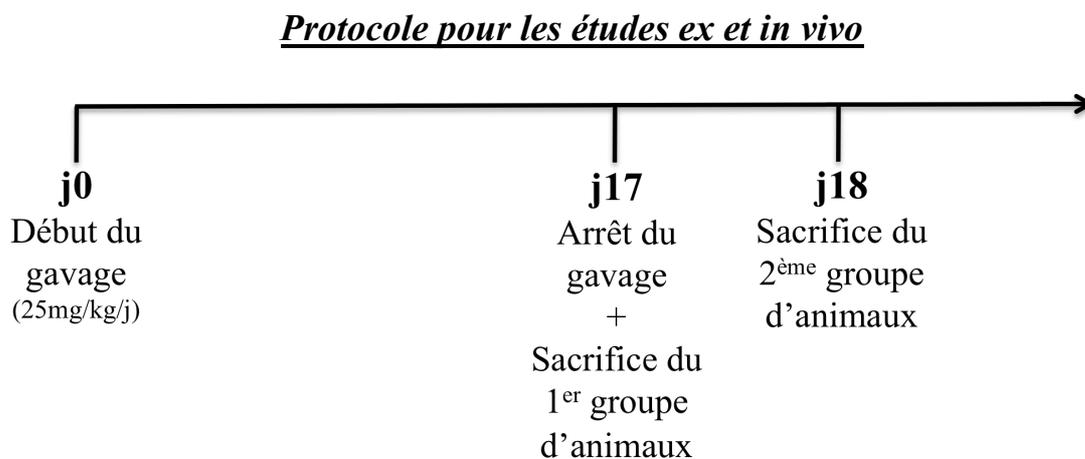
A travers cette étude nous avons cherché à analyser les conséquences vasculaires d'un traitement au Sildénafil et de son arrêt sur la réactivité et la structure des artères de résistance.

MATERIEL ET METHODES

Cette quatrième étude a été effectuée sur des rats Wistar de 9 semaines, gavés avec cet inhibiteur de la PDE5 (25mg/Kg/j) pendant 18 jours. Les paramètres physiologiques (pressions systolique et diastolique, fréquence cardiaque) de ces animaux ont été mesurés en télémétrie avant, pendant et après un traitement avec du Sildénafil.



Des études fonctionnelles, biochimiques et histomorphologiques ont été effectuées sur les artères mésentériques prélevées sur une autre série de rats Wistar du même âge traité avec du Sildénafil pendant 18 jours. Un premier groupe a été sacrifié à l'arrêt du traitement, et un deuxième groupe le lendemain. Ces animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane puis euthanasiés par inhalation de CO₂ afin de pouvoir prélever le mésentère.



➤ Mesure des paramètres physiologiques en Télémétrie

Cette technique permet de mesurer, en continu et pendant des périodes relativement longues, les différents paramètres hémodynamiques d'animaux vigiles (pression systolique, diastolique, fréquence cardiaque).

Implantation du transmetteur

Les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane. De la Buprénorphine (Tamgesic®, 0,3 mg/ml; 0,4 mg/kg) est injectée comme analgésique avant l'opération. Une laparotomie est effectuée dans des conditions aseptisées et le cathéter du transmetteur (model TL11M2C50-PXT; Data Science International) est inséré dans l'aorte abdominale juste au delà de l'artère rénale afin de mesurer en continu la pression artérielle et la fréquence cardiaque. Le cathéter est fixé dans l'aorte à l'aide d'un petit morceau de tissu adhésif (3M Vetbond). Le transmetteur est placé dans la cavité péritonéale et est fixé à la paroi de l'abdomen par des sutures.

Post-opératoire

Durant les trois jours suivant l'opération, de l'ibuprofène pédiatrique (Advil®) est utilisé comme analgésiant dans l'eau de boisson. Les rats ne seront utilisés que 14 jours après l'opération afin de leur permettre de se remettre de l'intervention. Ils sont placés dans des cages individuelles durant les 5 jours suivant l'implantation puis ils sont répartis à deux par cage avec un rat du même âge non-opéré.

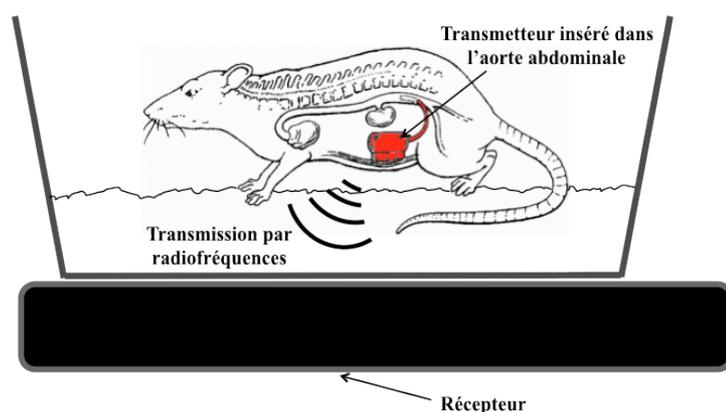


Schéma du système d'enregistrement en télémétrie.

Enregistrement

Les cages sont placées sur des récepteurs et les transmetteurs sont activés. La pression sanguine, la fréquence cardiaque, la température corporelle et l'activité des animaux sont

mesurées à une fréquence d'une par minute par un système d'acquisition : Dataquest telemetry system (Data Science International). L'enregistrement commence 5 jours avant le début du traitement, il se poursuit pendant les 18 jours de traitement et se termine 14 jours après l'arrêt du traitement. Durant toute la période d'enregistrement, les cages sont placées dans des armoires ventilées facilitant ainsi le contrôle de la température ambiante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) et du cycle jour/nuit (12 heures).

➤ **Mesure du diamètre artériel par artériographie (pressure-myography)**

L'utilisation de cette technique permet de placer un vaisseau dans des conditions maîtrisées de flux et de pression afin d'étudier la réactivité vasculaire en réponse à des variations de ces deux paramètres¹⁰. Un segment d'artère mésentérique est isolé puis canulé in vitro dans un artériographe. Ce segment est visualisé sur un moniteur relié à un système d'analyse d'images qui permet de mesurer le diamètre interne du vaisseau¹¹. Le débit est contrôlé par une pompe située en amont du vaisseau (pompe 1). La pression est mesurée en amont (P1) et en aval (P2) du vaisseau. La pression moyenne entre P1 et P2 est contrôlée par un système de servo-contrôle régulant la pompe n°2.

Les artères sont plongées dans un milieu physiologique (PSS), à pH 7,4 de composition suivante : 135mM NaCl ; 15mM NaHCO₃ ; 4,6mM KCl ; 1,5mM CaCl₂ ; 1,2mM MgSO₄ ; 11mM glucose ; 10mM N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N-2-ethylsulfonic acid (HEPES), bullé en permanence avec un mélange de 75% O₂, 20% N et 5% CO₂ et maintenu à 37°C.

Chaque expérience débute par un test de l'état des artères en utilisant une solution riche en potassium (80 mmol/L, 80K PSS). Puis l'état de la media est testé par l'utilisation d'une monodose de phényléphrine (10^{-6}M) et l'état de l'endothélium par une monodose d'Acétylcholine (10^{-6}M). Les artères utilisées ont toutes une dilatation en réponse à l'Acétylcholine supérieure à 80%.

- La relation pression-diamètre est étudiée sur des artères mésentériques soumises à des paliers de pression de 10 à 150mmHg en absence de flux. Le diamètre mesuré à chaque palier de pression correspond au diamètre actif de l'artère.

- A la fin de chaque expérience, l'artère est soumise au nitroprussiate de sodium (10^{-5}M), à la papavérine (10^{-4}M) et à de l'EGTA 2 mM dans un milieu dépourvu de calcium permettant ainsi de mesurer le diamètre du vaisseau totalement dilaté (propriétés passives du vaisseau). Le produit de la différence entre ce diamètre passif et le diamètre actif correspond au tonus myogénique de l'artère.

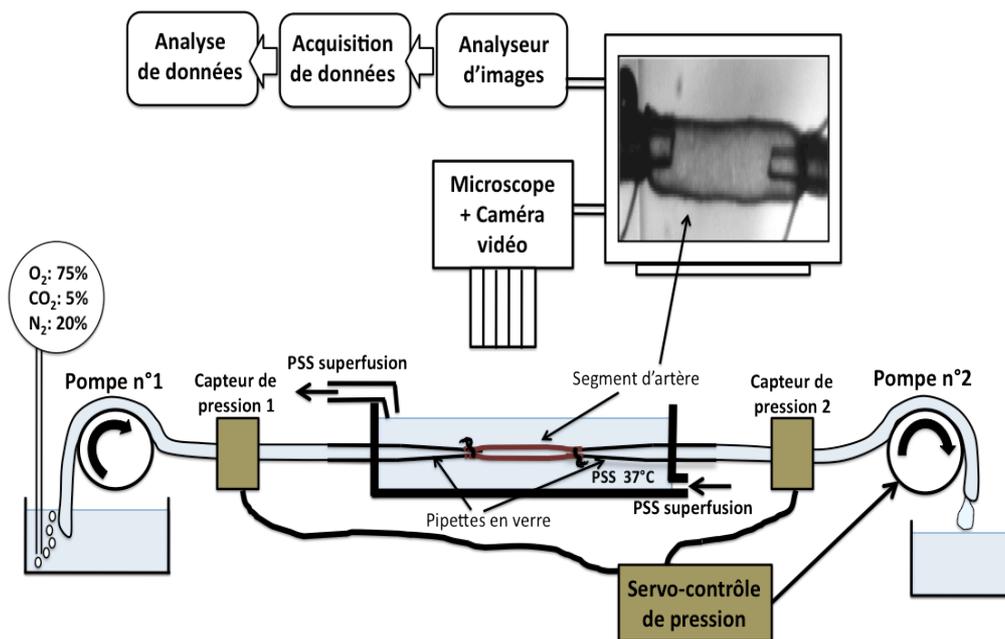
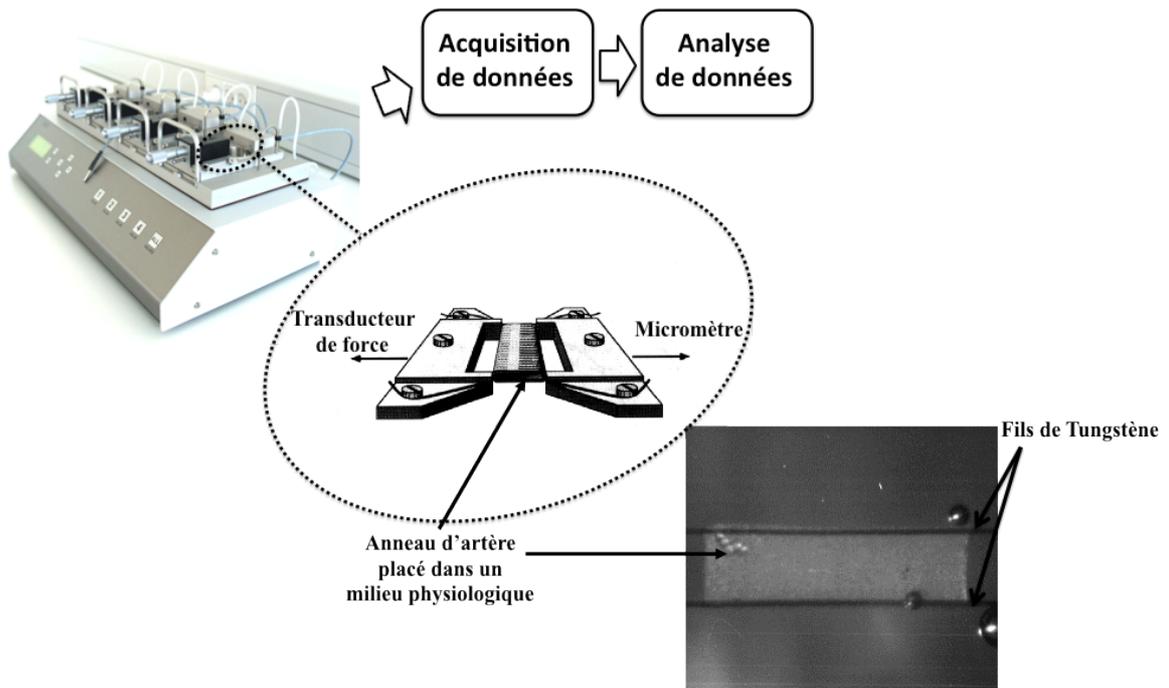


Schéma représentant une cuve d'artériographie dans laquelle une artère est canulée et mise sous pression entre deux pipettes de verre.

Intérêts : Ce montage permet de placer le vaisseau dans des conditions physiologiques (température, pH, pression, flux) en s'affranchissant des afférences sympathiques. Il nous permet aussi de faire varier indépendamment la pression et le débit intraluminal afin de pouvoir déterminer la réponse des artères soumises séparément à chacun de ces stimuli mécaniques.

➤ Mesure de la réactivité vasculaire par myographie (Wire-myography)

Après dissection, les segments d'artères mésentériques (2mm) sont isolés¹² et placés dans un myographe. Deux fils de tungstène, de 40µm chacun, sont insérés dans la lumière du vaisseau. L'un d'eux est relié à un support dont la position peut être modifiée grâce à un micromètre. L'autre fil est relié à un capteur de force (jauge de contrainte, mesure de force isométrique) relié à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement de données. Chaque segment plonge dans une cuve de 6ml, maintenue à 37°C et contenant du PSS composé de 135mM NaCl ; 15mM NaHCO₃ ; 4,6mM KCl ; 1,5mM CaCl₂ ; 1,2mM MgSO₄ ; 11mM glucose. Le pH est de 7.4 et la solution est bullée avec un mélange de 95% O₂ et 5% CO₂. La solution physiologique est rincée toutes les 20 minutes.



Représentation schématique d'une cuve de myographie où un anneau d'artère est monté entre deux fils de tungstène.

Une fois placées entre les deux fils, les artères sont soumises à une tension équivalente à une pression de 90mmHg. Après une stabilisation (45 min), chaque expérience débute, comme en artériographie, par un test de l'état des artères en utilisant une solution riche en potassium (80 mmol/L, PSS 80K). Ensuite, l'état de la media est testé par l'utilisation d'une monodose de phényléphrine (10^{-6} M) et l'état de l'endothélium par une monodose d'Acétylcholine (10^{-6} M). Les artères utilisées ont toutes une dilatation à l'Acétylcholine supérieure à 80%. Suite à cela, la réponse contractile à une concentration croissante de phényléphrine (10^{-8} à 10^{-5} M) a été mesurée.

Intérêts : Cette technique est moins physiologique que l'artériographie mais permet de soumettre les anneaux vasculaires à différents agents pharmacologiques. La possibilité de monter plusieurs anneaux en simultanément permet de tester plusieurs conditions en même temps.

➤ **Analyse par Western-blot de l'expression de RhoA.**

Préparation des échantillons

Le broyage des artères mésentériques de rats se fait de façon manuelle avec de l'azote liquide dans du tampon de lyse (1% de sodium dodecyl sulfate, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L d'orthovanadate de sodium et un cocktail d'inhibiteurs de protéases). Les

extraits sont incubés pendant 30 minutes à 4°C et sont ensuite centrifugés à 14 000g pendant 15 minutes à 10°C. Après avoir récupéré le surnageant, les protéines sont dosées selon la méthode de Pierce (Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology).

Dépôt et migration

Chaque échantillon est complété par 70% de tampon Laemmli. Après 5 minutes de dénaturation à 95°C, 25 µg de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide 9% placé dans un système d'électrophorèse. Après migration, les protéines sont transférées pendant 1H30 (100V, 4°C) sur une membrane de nitrocellulose (Amersham).

Hybridation

Les membranes sont ensuite saturées pendant 1H30 à température ambiante avec 5% de poudre de lait ou de BSA (Bovin Serum Albumin) dans du TBS-T (20 mmol/L Tris ; pH 8,0 ; 150 mmol/L NaCl et 0.1% Tween-20). Selon le protocole, les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C dans le même milieu que celui de saturation en présence d'un anticorps primaire dirigé contre RhoA (1/500 ; sc418 ; Santa cruz). Puis les membranes sont rincées dans du TBS-T (3 lavages de 10 minutes) et incubées à température ambiante pendant 1H30 avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP dirigé contre les anticorps de souris (1/20000 ; Sigma).

Révélation

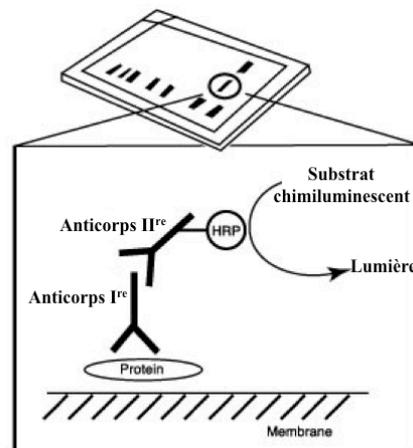


Schéma du mécanisme de révélation des immunocomplexes

Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS-T, les immunocomplexes formés sont détectés par chimiluminescence (SuperSignal West Femto, Pierce) en utilisant un système d'imagerie (Fuji LAS 3000 plus; Fuji Medical System). La quantification se fait par analyse densitométrique¹³. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à la β -actine.

➤ **Mesure de la quantité de GMPc plasmaticque par ELISA**

Préparation des échantillons

Le dosage du GMPc a été effectué sur des segments d'aortes de rats non traités, traités et après l'arrêt du traitement par du Sildénafil. Les aortes sont broyées dans l'azote avec un pilon. Après broyage, chaque échantillon est pesé.

Les échantillons sont placés dans la glace et on y ajoute une solution d'acide Trichloracétique (TCA) 5% à la proportion de 100µl pour 10mg de tissu. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 secondes pour ramener le broyat dans le fond.

Les échantillons sont de nouveau broyés à l'aide d'un polytron dans la glace puis ils sont centrifugés à 1500g pendant 15 minutes à 4°C.

Les surnageants sont récupérés et il faut ensuite extraire le TCA. Pour cela, 5 volumes d'éther saturé sont rajoutés au surnageant, l'ensemble est agité pendant 10 secondes puis il faut laisser les différentes phases se séparer. La phase supérieure correspondant à l'éther et au TCA est alors enlevée. Cette étape doit être répétée deux fois.

Pour finir les restes d'éther sont éliminés en chauffant pendant 5 minutes à 70°C, puis les échantillons sont transférés dans des tubes propres et évaporés de nouveau à 60°C sous flux d'azote.

Dosage en ELISA

L'ELISA a été fait selon le protocole du kit « Cyclic GMP EIA Kit » (ref 5811021) de chez CAYMAN Chemical.

➤ **Histomorphométrie**

L'étude histomorphométrique a été effectuée sur des artères mésentériques, préalablement montées en artériographie, comme décrit précédemment, et complètement relâchées dans une solution de physiologique (PSS) sans calcium et contenant 2mM d'EGTA, de la papavérine (100 µM) et du nitroprussiate de sodium (10 µM). Après 10 minutes d'incubation, ces vaisseaux sont fixés par une solution de formaldéhyde (4%) à une pression de 75 mmHg. Après 10 minutes de fixation, les artères sont incluses dans un milieu de montage (Tissu-Tek, Miles, Inc) et congelées dans de l'isopentane préalablement refroidit dans de l'azote liquide¹⁴.

Des coupes transversales de 7µm ont ensuite été effectuées à l'aide d'un cryocut (Leica CM3050S). Après les avoir séchées, les lames sont plongées dans des bains successifs. Un bain d'orcéine de 15 minutes permet la coloration des fibres élastiques. Un bain d'1

minute dans de l'eau lithinée permet de bleuir les noyaux. Pour finir, après une déshydratation de 5 minutes avec de l'alcool absolu suivie de 3 bains (1 min) de toluène, le montage entre lame et lamelle est fait avec du milieu DPX. La mesure du diamètre et de l'épaisseur de la média est permise par une analyse morphométrique à l'aide d'un programme d'analyse automatique¹⁴.

➤ **Analyse Statistique :**

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard (sem). Une différence significative entre deux groupes est déterminée par analyse de variance : ANOVA deux voies sur les courbes entières, ou ANOVA une voies suivie par un test de Bonferroni. Une valeur de P inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

RESULTATS :

Nous avons tout d'abord mesuré, par télémetrie, les pressions artérielles systolique (PAS) et diastolique (PAD) de rats Wistar avant (de -5 à -1 jours), pendant (de 0 à 18 jours) et après (à partir de 19 jours) un traitement avec du Sildénafil (25mg/kg/j).

Ces mesures nous ont permis de voir (Figure 1) qu'un traitement prolongé avec du Sildénafil entraine une diminution des pressions systolique et diastolique (Figure 1A et 1B) en accord avec l'effet hypotenseur du Sildénafil. Cependant, après 18 jours de gavage, l'arrêt de ce traitement provoque une augmentation significative de la pression artérielle dont le niveau est supérieur à celui avant traitement (Pic). Ce pic se maintient pendant quatre jours avant un retour progressif à la normale. Durant ce pic, la fréquence cardiaque diminue ($356,5 \pm 8,2$ battements/min à la Fin versus $330,2 \pm 3,4$ battements/min au Pic) sans aucune modification de la taille du cœur. Cette bradycardie illustre donc l'activation du baroréflexe en réponse à une augmentation de pression artérielle, résultant d'une hausse des résistances périphériques.

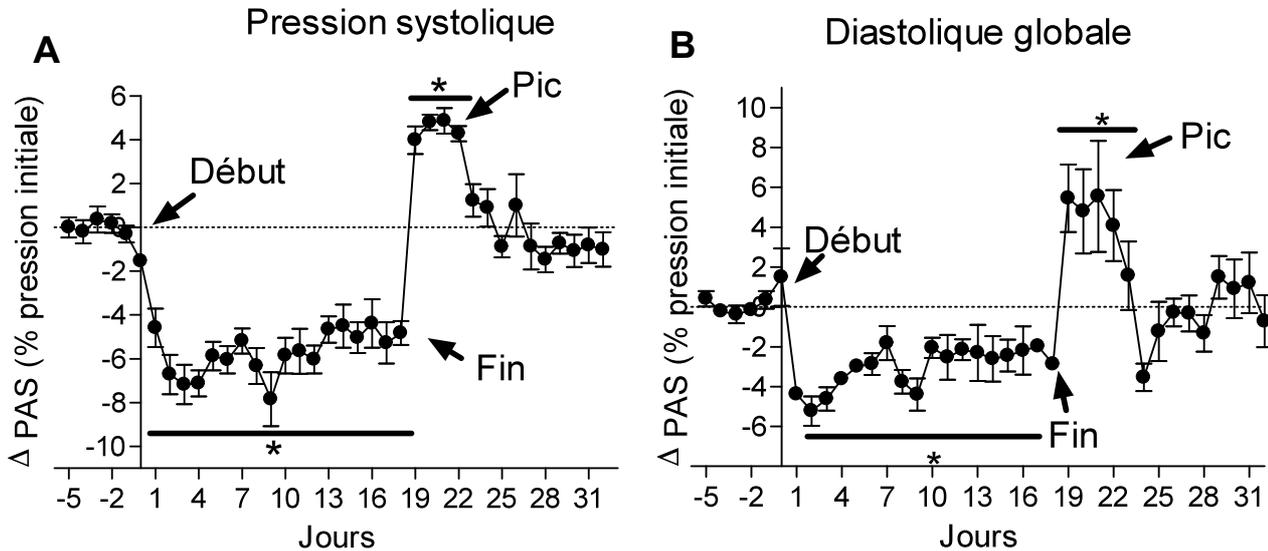


Figure 1 : Variations de la pression artérielle

Mesure de la pression systolique (A) et de la pression diastolique (B) en télémetrie sur des rats Wistar avant, pendant (Début⇔Fin) et après (Pic) un traitement de 18 jours au Sildénafil (25mg/kg/j).

Chaque point correspond à la moyenne des valeurs prises toutes les minutes pendant 24h. Chaque point est exprimé en pourcentage de variation rapporté à la pression de base (avant traitement).

* = $p < 0,05$; N=6 : Rats pendant ou après traitement comparés aux rats non traités.

Afin de donner une explication à cette augmentation de pression, nous avons recherché l'origine de cette augmentation des résistances périphériques.

Dans un premier temps, nous avons analysé la structure des artères mésentériques de rats traités ou non avec du Sildénafil. La mesure du diamètre interne des vaisseaux pressurisés ainsi qu'une analyse histomorphologique des artères mésentériques, par une coloration à l'orcéine, a révélé une augmentation du diamètre vasculaire (remodelage expansif) suite à un traitement au Sildénafil (Figure 2A), accompagnée d'une hypertrophie de la paroi vasculaire (Figure 2B).

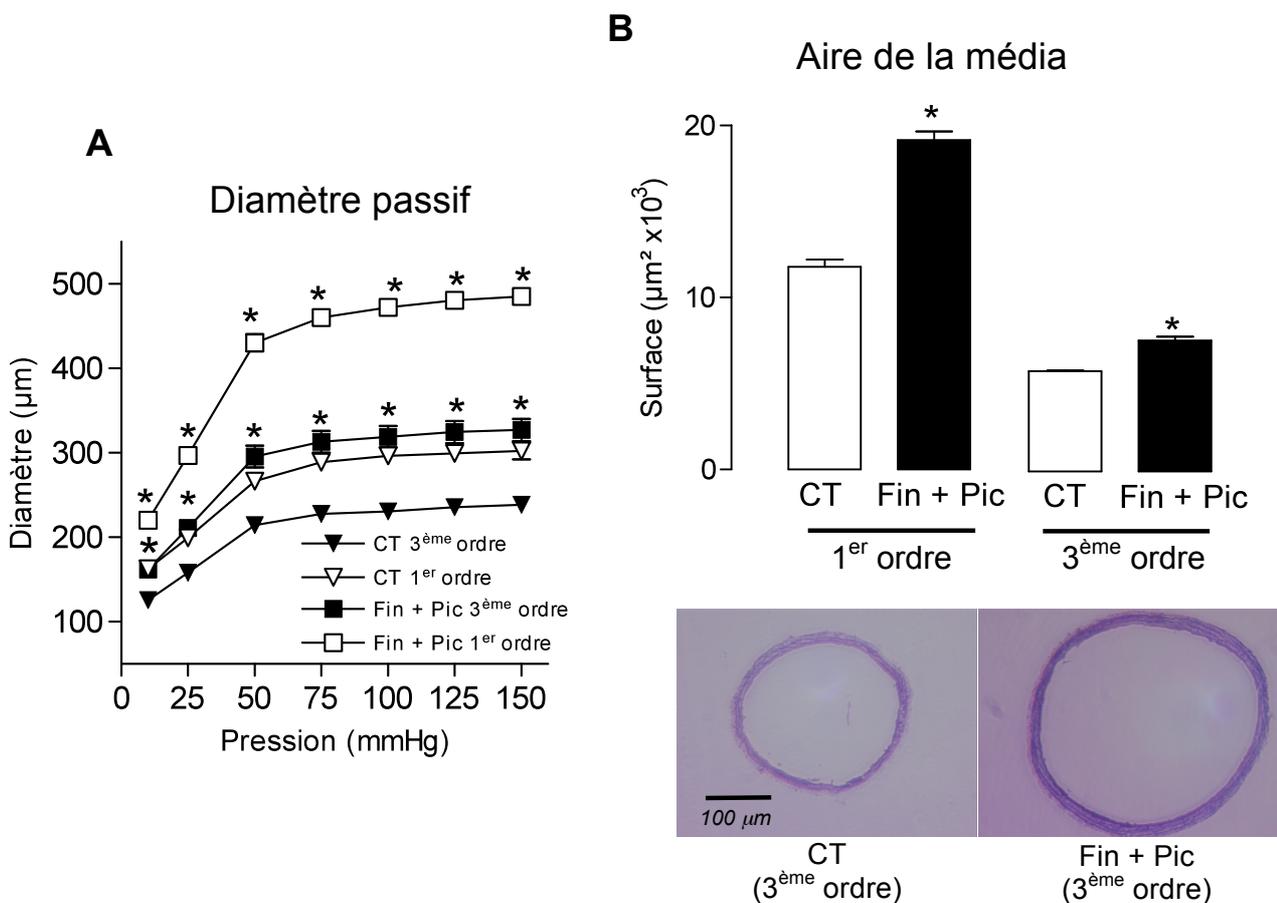


Figure 2 : Modifications structurales des artères mésentériques, de 1^{er} et 3^{ème} ordre.

(A) Le diamètre interne passif, d'artères mésentériques de rats wistar traités (Fin + Pic) ou non (CT) avec du Sildénafil (25mg/kg/j), a été déterminé en artériographie. Chaque artère est soumise à différents paliers de pression (10 à 150 mmHg) dans un milieu physiologique dépourvu de calcium et contenant de l'EDTA (2 mmol/L) et du nitroprussiate de sodium (10 µmol/L). (B) Mesure de la surface de la média par une coloration à l'orcéine de coupes transversales d'artères pressurisées et fixées à 75 mmHg.

* = $p < 0,05$; N=9 : Artères de rats traités comparées aux artères contrôles de même ordre.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réactivité de ces artères en réponse aux stimuli vasoconstricteurs de différente nature. Pour se faire nous avons utilisé les techniques de myographie et d'artériographie. Cela a mis en évidence que la contraction des artères mésentériques de rats en réponse au KCl (80 mM ; Figure 3A) ou à la phényléphrine (Figure 3B) était significativement augmentée pendant (Fin) et après le traitement (Pic) au Sildénafil par rapport aux rats non traités (CT). Le TM est diminué chez les rats durant le traitement par rapport aux contrôles. Par contre, à l'arrêt du traitement, le TM est plus élevé que chez les rats contrôles ou sous traitement (Figure 3C). De plus, des artères mésentériques de 1^{er} ordre, dépourvues de TM chez les rats contrôles et traités, développent un TM à l'arrêt du traitement.

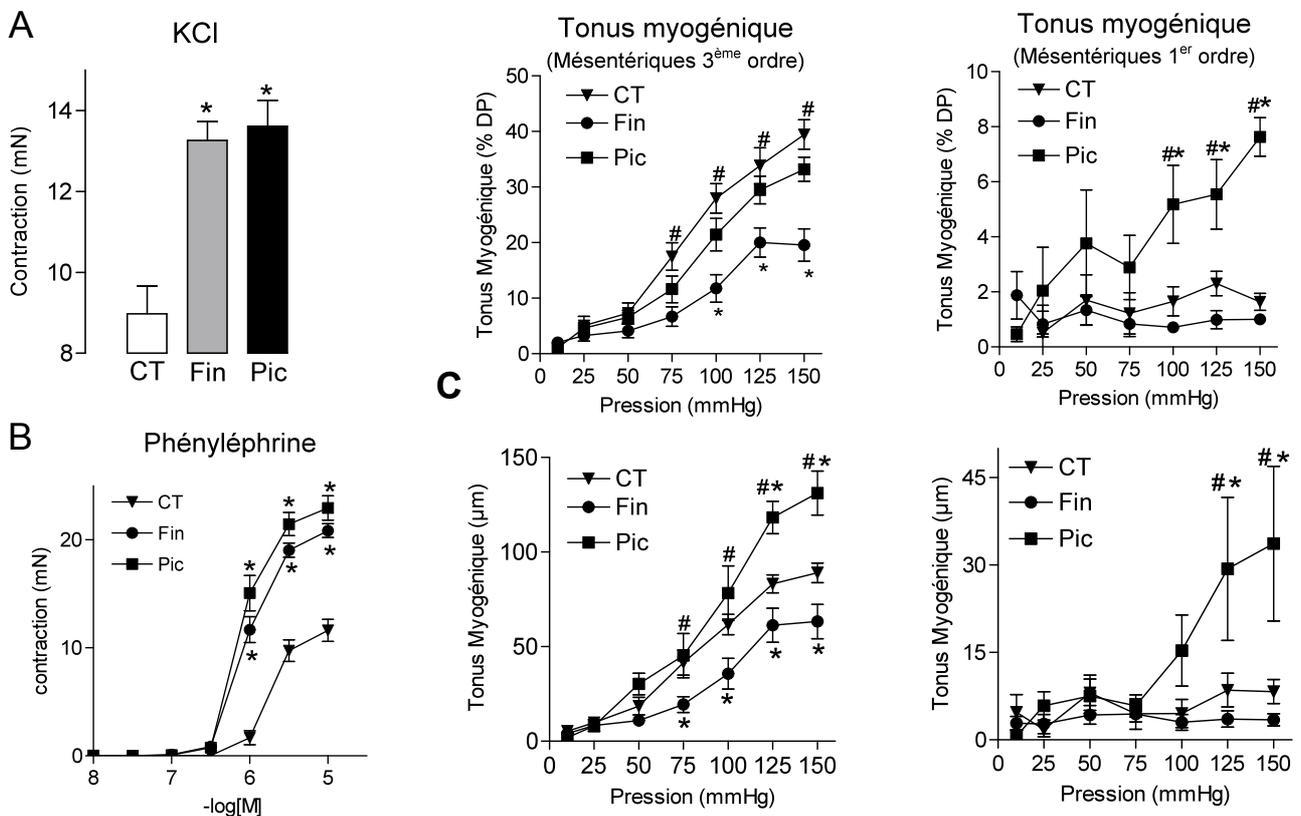


Figure 3 : Réactivité vasculaire des artères mésentériques de 3^{ème} ordre.

(A) Mesure en myographie de la vasoconstriction induite par une solution riche en potassium (KCl : 80 mmol/L) sur des artères de rats avant (CT), pendant (Fin) et après (Pic) un traitement avec du Sildénafil (25mg/kg/j). (B) Courbe concentration-réponse à la phényléphrine (PE : 10^{-8} à 10^{-5} mol/L) dans les trois mêmes conditions. (C) Mesure en artériographie des changements de diamètre vasculaire en réponse à des paliers croissants de pression (10 à 150 mmHg). Valeurs en pourcentage du diamètre passif (% DP ; haut) et en μm (bas).

* = $p < 0,05$; N=9 :Rats traités (Fin et Pic) comparés aux contrôles (CT)

= $p < 0,05$; N=9 :Rats pendant le traitement (Fin) comparés à ceux après le traitement (Pic).

Afin de comprendre plus précisément ces différences de réactivité nous avons quantifié par western-blot l'expression de protéines telles que RhoA (Figure 4A), et par ELISA la production de GMPc (Figure 4B).

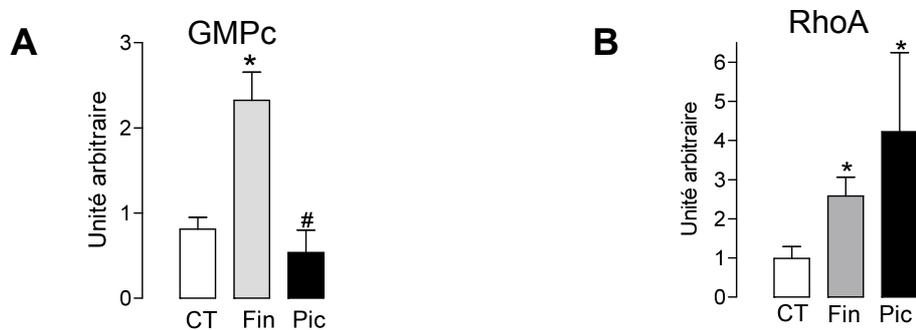


Figure 4 : Quantification du GMPc et de RhoA.

(A) Mesure du GMPc plasmatique en Elisa avant (CT), pendant (Fin) et après (Pic) un traitement avec du Sildénafil (25mg/kg/j). (B) Mesure de l'expression de RhoA au niveau d'artères mésentériques dans les trois mêmes conditions.

* = $p < 0,05$; $N=9$: Rats traités (Fin et Pic) comparés aux contrôles (CT)

= $p < 0,05$; $N=9$: Rats pendant le traitement (Fin) comparés à ceux après le traitement (Pic).

Comme attendue, la production de GMPc augmente durant le traitement et chute dès l'arrêt alors que le niveau d'expression de RhoA reste élevé. Le maintien d'un niveau élevé de RhoA lors du pic de pression pourrait expliquer l'augmentation du TM observée dans les artères mésentériques de résistance.

Afin de tester l'implication de la voie RhoA/Rho-kinase dans le développement du pic de pression, nous avons regardé l'impact de l'utilisation d'inhibiteurs de la Rho-kinase (Fasudil) lors de l'arrêt du traitement (Figure 5). Sous Fasudil, il y a une atténuation significative du pic de pression.



Figure 5 : Effet du fasudil sur le pic de pression.

Moyenne des Δ PAS ou Δ PAD (en % de la pression initiale) obtenues durant les 4 jours suivant l'arrêt du traitement.

* = $p < 0,05$; $N=5$: Arrêt du traitement en présence de fasudil versus arrêt sans fasudil.

Discussion :

A travers cette étude nous avons mis en évidence que l'effet hypotenseur caractéristique du Sildénafilest maintenu durant toute la durée du traitement, et qu'il est suivi d'un surprenant effet hypertenseur transitoire lors de l'arrêt du traitement (effet rebond). Ce traitement engendre la mise en place d'un remodelage expansif hypertrophique des artères mésentériques accompagné d'une augmentation de la contractilité artérielle.

Le remodelage observé lors du traitement au Sildénafilest pourrait être comparé à celui engendré par une augmentation chronique de flux, comme cela a été montré avec l'utilisation d'un modèle de ligature alternative d'artères mésentériques¹⁵. Dans le cas d'artères soumises à une augmentation chronique de flux, comme c'est le cas lors d'un traitement avec un vasodilatateur tel que le Sildénafilest¹⁶, un remodelage expansif hypertrophique s'effectue avec une augmentation de la contractilité vasculaire liée à un nombre de CMLs plus élevé.

En présence de l'inhibiteur de la PDE5, le TM développé par les artères mésentériques de résistance est significativement diminué. Cela peut s'expliquer par l'inhibition de la voie RhoA par le Sildénafilest, via l'augmentation du GMPc et de l'activité de la PKG qui phosphoryle RhoA sur la sérine 188 et induit son maintien dans le cytosol⁹. L'activité de RhoA, ainsi que celle de Rho-kinase, serait donc inhibée. Ceci engendre une diminution du mécanisme de sensibilisation au calcium de l'appareil contractile ce qui peut expliquer la diminution du TM. Parallèlement, le traitement au Sildénafilest induit une augmentation de l'expression de RhoA. Cette surexpression peut résulter de l'augmentation de l'activité de la PKG lors du traitement qui a été décrite comme contrôlant positivement l'expression de RhoA¹⁷. De plus, la phosphorylation de RhoA au niveau de la sérine 188 par la PKG entraîne une diminution de son activité^{8,9} ainsi qu'une diminution de sa dégradation¹⁸ via sa localisation cytoplasmique.

A l'opposé, l'arrêt du traitement engendre une nette augmentation du TM pouvant être causée par une biodisponibilité de RhoA plus importante due à l'augmentation de son expression et une levée de l'inhibition par la PKG à l'arrêt. Par conséquent, l'augmentation du TM à l'arrêt du traitement pourrait être une cause possible de l'élévation de la pression artérielle. Néanmoins, de nombreuses études^{19,20}, dont celle sur SRF, ont montré que le TM n'est pas forcément impliqué dans la régulation de la pression artérielle systémique. Ce mécanisme de régulation local intervient plutôt dans le maintien d'une perfusion optimale des organes, alors que la pression artérielle est majoritairement régulée par le système sympathique et le système rénine-angiotensine. Le TM pourrait intervenir, au moins en partie,

à côté de l'hypercontractilité provoquée par le remodelage hypertrophique engendré par le traitement. Durant le traitement, la part de relaxation tient une place plus importante, ce qui se traduit par une hypotension. Cependant, à l'arrêt du traitement, il y a une perte de l'effet vasodilatateur du Sildénafil avec un maintien du remodelage hypertrophique et de l'hypercontractilité, pouvant expliquer une augmentation de la pression artérielle. L'élévation du TM ajoutée à cette hypercontractilité vasculaire conduirait à une augmentation des résistances périphériques, provoquant l'augmentation de la pression artérielle.

Cette étude montre clairement que l'utilisation du Sildénafil comme hypotenseur a les effets escomptés lors d'un traitement chronique. Cependant, l'effet rebond hypertenseur observé à l'arrêt du traitement pourrait être préjudiciable dans le cas de patients souffrant d'HTAP. La compréhension de cet effet rebond comme pouvant résulter d'une suractivation de RhoA permettrait d'avoir des cibles thérapeutiques potentielles. Les résultats préliminaires obtenus avec un traitement au fasudil, inhibant l'effet rebond, sembleraient confirmer l'intervention de la voie RhoA/Rho-kinase dans ce phénomène, et pourrait illustrer un moyen de pallier à cette hypertension post-traitement.

Néanmoins ces résultats restent à être complétés par différentes approches comme :

- l'analyse de l'évolution du remodelage vasculaire après l'arrêt du traitement. La réversibilité du remodelage pourrait participer au retour progressif de la pression à la normale.
- la mesure de l'activité de RhoA en quantifiant sa forme liée au GTP.
- la quantification de RhoA phosphorylée sur la sérine 188 afin de mettre en évidence la régulation de cette protéine par la PKG, ainsi que la levée de l'inhibition lors de l'arrêt.
- l'étude de l'activité de Rho-kinase et du mécanisme de sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile par la mesure de l'état de phosphorylation de la sous-unité MYPT1 de la MLCP.
- l'analyse de la réactivité de différents types de vaisseaux afin de voir si seules les artères de résistance sont affectées.

Références bibliographiques

1. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.
2. Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res.* 2004;68(2):75-103.
3. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;106(1):57-62.
4. Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, McMurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(4):L656-664.
5. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res.* 2004;94(3):385-393.
6. Laher I, van Breemen C, Bevan JA. Stretch-dependent calcium uptake associated with myogenic tone in rabbit facial vein. *Circ Res.* 1988;63(3):669-672.
7. Henrion D, Laher I, Bevan JA. Intraluminal flow increases vascular tone and 45Ca^{2+} influx in the rabbit facial vein. *Circ Res.* 1992;71(2):339-345.
8. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21722-21729.
9. Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Makhlof GM. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(6):G1006-1016.
10. Henrion D, Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Friedlander G, Poitevin P, Levy BI. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2909-2914.
11. Halpern W, Kelley M. In vitro methodology for resistance arteries. *Blood Vessels.* 1991;28(1-3):245-251.
12. Barany K, Ledvora RF, Mougios V, Barany M. Stretch-induced myosin light chain phosphorylation and stretch-release-induced tension development in arterial smooth muscle. *J Biol Chem.* 1985;260(11):7126-7130.
13. You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2005;111(8):1006-1011.
14. Matrougui K, Loufrani L, Heymes C, Levy BI, Henrion D. Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension.* 1999;34(4 Pt 1):659-665.

15. Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(2):317-324.
16. Zhang H, Pakeerappa P, Lee HJ, Fisher SA. Induction of PDE5 and de-sensitization to endogenous NO signaling in a systemic resistance artery under altered blood flow. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(1):57-65.
17. Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P. RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9472-9480.
18. Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, Loirand G, Pacaud P. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005;96(11):1152-1160.
19. Schubert R, Mulvany MJ. The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond).* 1999;96(4):313-326.
20. Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005;98(9):913-921.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le tonus myogénique est un mécanisme primordial dans la régulation des débits sanguins locaux. Cette propriété des artères de résistance leur confère la capacité de maintenir une perfusion optimale des différents organes, permettant ainsi le bon fonctionnement de l'organisme. Cette contraction myogénique implique l'ouverture de canaux mécanosensibles lors d'une augmentation de pression, engendrant des influx cationiques qui conduisent à une dépolarisation. Il en résulte une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, et une activation de différentes voies de signalisation conduisant, entre autres, à une sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile responsable de la contraction des CMLs. Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, les éléments intervenant dans le développement du TM sont nombreux et divers (canaux, protéines kinases, protéines G...), néanmoins ils sont loin d'être tous connus. Les vaisseaux étant soumis en permanence à des variations de pression, la compréhension de la transmission de ce signal mécanique ainsi que l'identification des éléments le régulant sont fondamentales. De plus, les modifications du TM observées lors de pathologies comme l'hypertension et le diabète font de lui une cible thérapeutique potentielle.

Mon travail de thèse avait pour objectif d'apporter des connaissances supplémentaires sur cet aspect important de la physiologie vasculaire. Connaissant la place importante de Rho-kinase dans le développement du TM par son rôle dans la sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile, nous nous sommes focalisés sur les éléments pouvant se trouver en amont ou en aval de cette voie, dans le développement du TM.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que l'intervention de la voie RhoA/Rho-kinase dans le TM implique :

- une localisation cellulaire précise de RhoA, afin d'interagir avec la cavéoline-1 et d'activer ses effecteurs tels que Rho-kinase.
- l'intervention de Notch3 en tant que mécanosenseur régulant l'activation de RhoA par la pression.
- une intervention du facteur de transcription SRF, régulant la sensibilité à la pression de la CMLV modifiant alors le TM.
- une modification du TM pendant et après un traitement chronique avec du Sildénafil.

Nos premiers résultats mettent en évidence le mécanisme d'activation de la petite protéine G RhoA lors d'une augmentation de pression. Cette protéine, qui oscille entre une forme active (liée au GTP) et inactive (liée au GDP), nécessite une translocation et un ancrage à la membrane pour son activation et celle de ses effecteurs, tels que Rho-kinase. Lors d'une augmentation de pression, la translocation membranaire et l'association de RhoA avec la cavéoline-1 au niveau de la membrane plasmique des cavéoles, sont des conditions nécessaires à l'activation de Rho-kinase et

au développement d'une contraction. Ainsi, la caveoline-1 apparaît ici comme un activateur de RhoA, alors que généralement elle intervient en tant qu'inhibiteur de fonctions moléculaires comme celles des protéines kinases src⁹⁷ et de la NO synthase endothéliale⁴²². La déstructuration des cavéoles par l'extraction du cholestérol avec de la métyl- β -cyclodextrine atténue le TM. Cette partie de nos résultats montre que les cavéoles, riches en caveoline-1, interviennent dans la mécano-transduction de la pression.

L'importance de la cavéoline-1 dans le TM a été confirmée au niveau des artères cérébrales de souris⁴²³. Ces auteurs montrent que l'absence de cavéoline-1 provoque une diminution de la dépolarisation induite par la pression, ainsi que les influx calciques qui en découlent, ce qui engendre une réduction de la contraction. Cette diminution de la dépolarisation pourrait venir d'une augmentation de l'activité des canaux K_{Ca} . De plus, il a été montré qu'une dépolarisation stimule RhoA et induit sa translocation à la membrane⁴²⁴. Ainsi, la cavéoline-1 aurait un effet sur l'activité de RhoA via leur interaction, mais aussi via son effet sur la translocation de RhoA à la membrane en régulant la dépolarisation.

Dans cette optique d'un lien structure-fonction, nous avons mis en évidence, dans notre deuxième étude, l'intervention de Notch3 dans l'élaboration du TM au niveau des artères de résistance. L'absence de ce récepteur induit une diminution du TM et une augmentation de la dilatation au flux. Ces résultats sont en miroir avec ceux obtenus dans une étude précédente, montrant une augmentation du TM et une diminution de la dilatation au flux lors d'une surexpression d'un récepteur Notch3 muté¹⁴.

Ce récepteur, impliqué dans la maladie CADASIL, intervient spécifiquement dans la structure de ces vaisseaux (artères caudales et cérébrales uniquement). L'absence de Notch3 induit une diminution du TM corrélée à une inhibition de l'activité de RhoA et de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine. Notch3 apparaît ici comme un régulateur du TM présent en amont de la voie RhoA/Rho-kinase. Le lien existant entre Notch3 et cette voie n'est pas connu, mais il est clair que les voies faisant intervenir les intégrines, FAK, ERK1/2 ou la MAP Kinase p38 n'interviennent pas dans ce mécanisme de régulation. L'absence d'effet de la délétion de Notch3 sur les réponses contractiles à la phényléphrine, à l'angiotensine II ou au thromboxane A₂, montre que seule la voie RhoA/Rho-kinase activée par la pression est modulée par Notch3. RhoA apparaît donc comme l'élément responsable de l'effet modulateur de Notch3 sur le TM. RhoA intervient aussi dans l'assemblage des sites d'adhésion focaux⁴²⁵, ainsi que dans la structure cellulaire via son effet sur l'assemblage des complexes d'intégrines. De plus, RhoA joue un rôle important dans la mise en place et le maintien des liaisons cellule-cellule formées par les E-cadhérines, son inhibition entraîne la dislocation de ces structures⁴²⁶. Cela suggère que l'effet d'une délétion de Notch3 sur la

structure vasculaire résulterait aussi de la diminution de l'activité de RhoA. L'absence d'effet de la délétion de Notch3 au niveau des artères de conductance, développant peu de TM, renforce l'importance de la voie Notch3/RhoA dans le TM. Nous avons aussi montré qu'en fonction du lit vasculaire étudié, l'intervention de Notch3 est différente, expliquant ainsi que des pathologies qui affectent l'expression de Notch3 ciblent des vaisseaux différents. Par exemple, lors de notre étude, nous avons remarqué que la délétion de Notch3 n'affecte ni la structure ni la réactivité des artères mésentériques de résistance. Cette observation est en accord avec les observations histopathologiques réalisées sur les souris surexprimant le récepteur Notch3 (modèle de maladie CADASIL) : en effet, dans ce modèle, seules les artères cérébrales et caudales sont affectées¹². Cette différence de rôle de Notch3 en fonction du lit vasculaire est aussi illustrée par une étude montrant l'association entre une surexpression de Notch3 et le développement de l'HTAP humaine⁴²⁷. Au niveau d'artères pulmonaires normoxiques, Notch3 aurait plutôt un effet dans le remodelage vasculaire plutôt que dans le tonus vasomoteur. La voie Notch3 intervient donc différemment au niveau du territoire concerné. C'est une voie complexe dont nous venons d'apporter un nouvel élément qu'est RhoA. Cependant le lien entre ce récepteur et la petite protéine G est loin d'être élucidé, cela nécessite d'autres études.

La troisième partie de nos résultats illustre le rôle spécifique de SRF dans le développement de la réponse myogénique à la pression. L'absence de ce facteur de transcription, qui cible de nombreux gènes spécifiques des CMLs, engendre une altération du TM via l'inhibition des canaux mécanosensibles, une altération du cytosquelette, et une diminution du niveau d'expression d'éléments majeurs du système contractile comme la MLC_{20} et sa kinase (MLCK). Le maintien des contractions en réponse aux agents pharmacologiques, tels que le thromboxane A2 et la phényléphrine, révèle la mise en place d'un mécanisme compensatoire auquel la suractivation de la MAPK p38 participe. Cette MAPK intervient de manière plus importante dans ces contractions en absence de SRF.

Sachant que l'absence de SRF entraîne une diminution de la sensibilité des canaux mécanosensibles associée soit à une diminution de leur nombre soit à une diminution de leur probabilité d'ouverture, on peut supposer que cela soit inversé dans le cas d'une surexpression ou d'une suractivation de SRF. Ainsi, pour une pression donnée, l'activité globale des canaux augmenterait conduisant à une potentialisation des influx ioniques et de la dépolarisation. Il en résulterait une hypercontractilité. De plus, sachant que la voie RhoA régule l'activité de SRF (localisation subcellulaire et activité transcriptionnelle), et que cette voie est stimulée par une augmentation de pression, on peut en déduire que dans le cas d'une stimulation à long terme de la voie RhoA par une augmentation de pression, SRF serait suractivé. Cela mènerait à une hypercontractilité des CMLs en réponse à la

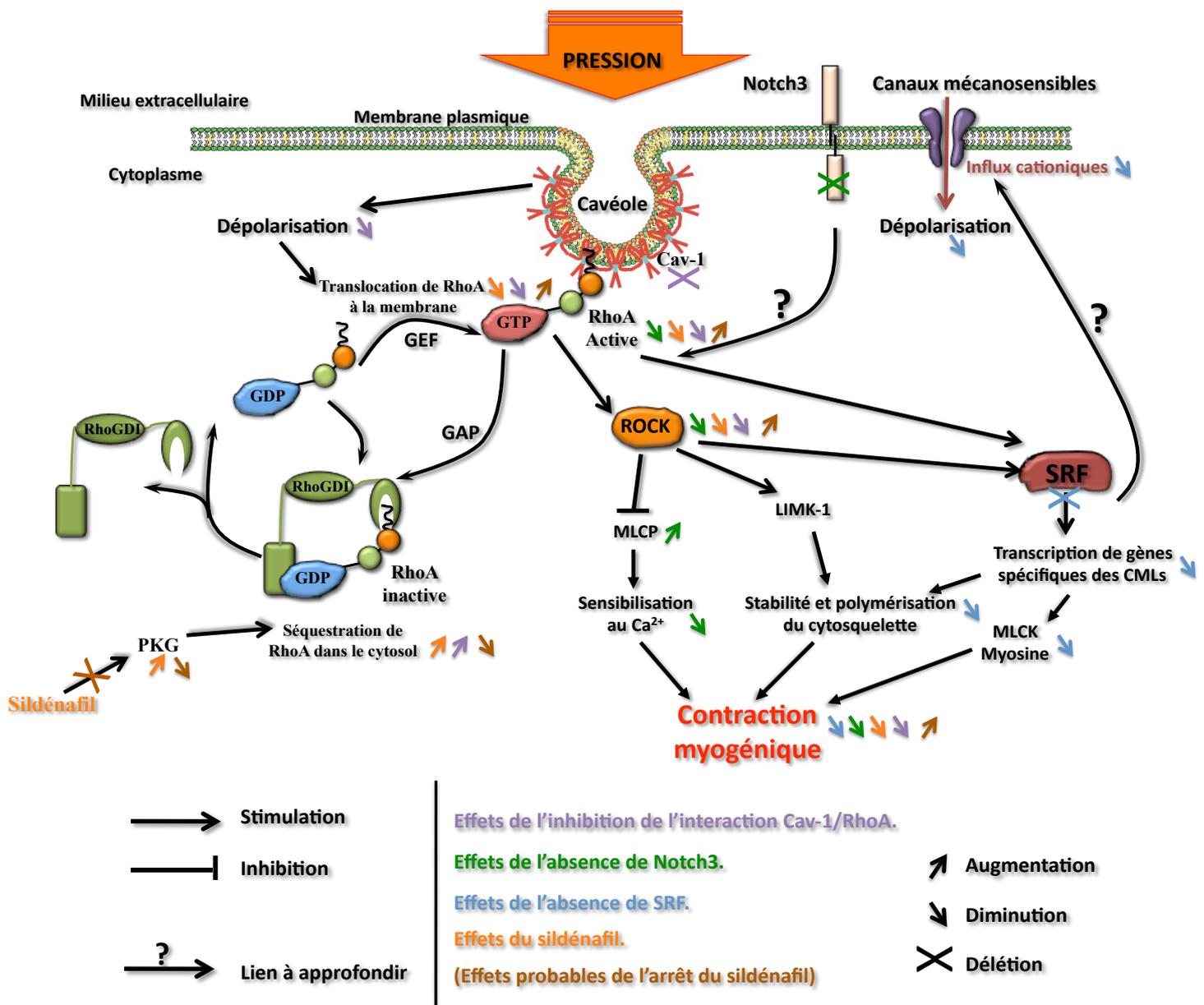


Figure 28 : Schéma bilan des voies mises en évidence dans cette thèse.

Etude n°1 : L'augmentation de pression induit la translocation de RhoA à la membrane où elle interagit avec la cavéoline-1, présente au niveau des cavéoles. Cette localisation et cette interaction permettent à RhoA d'activer Rho-kinase et d'induire la contraction en stimulant des voies telles que la polymérisation de l'actine et la sensibilisation au calcium de l'appareil contractile. L'inhibition de l'interaction Cav-1/RhoA (**en violet**) provoque un maintien de RhoA dans le cytosol, une diminution de l'activité de Rho-kinase et du tonus myogénique.

Etude n°2 : Notch3 régule la voie RhoA/Rho-kinase recrutée lors d'une augmentation de pression. La délétion de Notch3 (**en vert**) entraîne une diminution de l'activité de Rho-kinase et de son effet inhibiteur sur la MLCP. Il en résulte une diminution de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine qui conduit à une altération de la contraction myogénique.

Etude n°3 : La voie RhoA stimule aussi l'activité du facteur de transcription SRF en induisant sa translocation dans le noyau ainsi que celle de son cofacteur MAL. De cela, résulte l'expression de gènes spécifiques des CMLs. La délétion de SRF (**en bleu**) entraîne l'inhibition de l'activité globale des canaux mécanosensibles (diminution du nombre ou de la probabilité d'ouverture) entraînant une diminution de la dépoliarisation pouvant être à l'origine de l'altération du tonus myogénique. A cet effet s'additionnent une diminution des protéines contractiles et une altération du cytosquelette.

Etude n°4 : L'utilisation de Sildénafil (**en orange**) stimule la séquestration de RhoA dans le cytosol entraînant une inhibition de son activité et donc une diminution de l'activation de la voie Rho-kinase. L'arrêt du traitement (**en marron**) augmente probablement la quantité de RhoA disponible et transloquée à la membrane. Cela engendre une suractivation des voies telles que celle de Rho-kinase pouvant expliquer l'augmentation du tonus myogénique.

pression. Cette réponse vasculaire pourrait conduire à une vasoconstriction chronique induisant une hypoperfusion des différents organes cibles. Cette hypercontractilité pourrait être potentialisée par une augmentation de l'expression de la MLCK et de la MLC₂₀. Dans la maladie d'Alzheimer, il a été montré que la surexpression de SRF et de la myocardine dans les artères cérébrales entraîne une hypercontractilité et une dérégulation des flux sanguins cérébraux associées à la démence d'Alzheimer²⁷⁷. Il serait donc intéressant de mesurer le TM dans de telles conditions ainsi que l'activité des canaux mécanosensibles pouvant participer à l'hypoperfusion des tissus cérébraux. La régulation de l'activité ou de l'expression de ces canaux en modulant SRF pourrait ainsi être une cible pour d'éventuelles thérapies.

La dernière partie de nos résultats met en évidence l'effet hypertenseur engendré par l'arrêt d'un traitement chronique au Sildénafil chez des rats Wistar. Ce vasodilatateur, inhibiteur de la PDE 5, est principalement utilisé dans le traitement de l'HTAP en tant qu'hypotenseur. Dans notre étude menée chez le rat, ce traitement engendre une hypotension associée à une diminution du TM suivie, à l'arrêt du traitement, par une hypertension. Cette hypertension peut provenir d'une synergie entre l'augmentation du TM et l'hypercontractilité engendrée par l'hypertrophie vasculaire observée lors du traitement. Cet effet hypertenseur proviendrait en partie d'une suractivation de la voie RhoA/Rho-kinase. Cette augmentation de pression pourrait être particulièrement délétère connaissant la fragilité des patients atteints d'HTAP. Cette étude permet tout d'abord de mettre en évidence l'existence d'un effet secondaire d'un traitement chronique au Sildénafil. Il est primordial d'avoir conscience de l'existence d'un tel mécanisme afin de pouvoir moduler l'utilisation d'un tel médicament. De plus, ces premiers résultats ouvrent une piste sur l'origine de cet effet rebond en ciblant la protéine RhoA. L'utilisation d'un inhibiteur de Rho-kinase (Fasudil) atténue en partie l'hypertension survenant à l'arrêt du traitement, ce qui confirme l'intervention de la voie Rho-kinase et suggère une potentielle solution de sevrage pour pallier à cette hypertension post-traitement.

L'ensemble de nos résultats montre l'intervention de nouvelles voies (Figure 28), de nature bien différente, dans le développement du TM au niveau d'artères de résistance, allant du récepteur Notch3 à un facteur de transcription tel que SRF, en passant par la nécessité d'interaction de protéines cytoplasmiques (RhoA) avec des protéines membranaires (Cav-1). La description de l'intervention spécifique dans le TM d'éléments tels que Notch3 et SRF, qui affectent la structure des CMLVs (cytosquelette...) et régulent l'expression de gènes spécifiques des CMLs, illustre clairement l'importance d'un lien structure/fonction dans cette réponse myogénique. Ces résultats nous permettent à la fois de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une augmentation

de pression au niveau des artères de résistance, mais aussi de pouvoir apporter d'éventuelles cibles thérapeutiques dans le traitement de pathologies telles que la maladie CADASIL où le récepteur Notch3 est muté, la maladie d'Alzheimer où SRF est surexprimé, ainsi que dans de nombreuses pathologies dans lesquelles la voie RhoA/Rho-kinase joue un rôle telles que l'hypertension artérielle et l'hypertension artérielle pulmonaire.

En continuité de ces travaux il serait intéressant d'étudier les interconnexions possibles entre ces différentes voies. Ainsi il serait judicieux d'étudier les canaux mécanosensibles au niveau des souris déficientes ou surexprimant un récepteur Notch3 muté (phénotype CADASIL), afin de voir si leur activité diminue. Sachant que Notch3 induit une diminution de l'activité de RhoA, que RhoA régule l'activité de SRF, et qu'une absence de SRF altère les canaux mécanosensibles, peut être que l'absence ou la mutation de Notch3 modifierait le fonctionnement de ces canaux, participant aussi à la variation du TM. Il serait aussi intéressant d'évaluer l'expression de la cavéoline-1 et la formation de complexes Cav-1/RhoA dans ces deux modèles, afin d'identifier plus particulièrement à quel niveau interviendrait la voie Notch3.

En ce qui concerne l'étude de SRF, sachant qu'une suractivation de SRF est à l'origine d'une augmentation de l'expression de la MLCK chez des rats spontanément hypertendus (SHR), il serait intéressant de poursuivre nos travaux par l'implantation de mini-pompes à angiotensine II ou à endothéline-1 sur les souris SRF^{smko}, permettant d'induire une hypertension. Cela nous permettrait d'évaluer l'effet de SRF dans le développement d'une telle pathologie et de voir si sa délétion préviendrait l'hypertension faisant de SRF une éventuelle cible thérapeutique.

Dans le cas de l'étude sur l'effet du sildénafil, il a aussi été montré que la phosphorylation de RhoA sur la sérine 188 par la PKG modifie l'affinité de la petite protéine G pour ses différents effecteurs. La phosphorylation induit une diminution de l'affinité de RhoA pour Rho-kinase mais augmente celle pour mDia¹³⁴. Connaissant l'effet potentialisateur de la voie mDia sur l'activité transcriptionnelle de SRF, il serait intéressant de regarder l'évolution durant et après le traitement des éléments régulés par SRF, tels que le cytosquelette d'actine et les canaux mécanosensibles. De plus, la PKG a un effet potentialisateur sur l'activité transcriptionnelle de SRF en stimulant l'expression de son co-facteur la myocardine. Ainsi, nous pourrions supposer que la suractivation de la PKG stimulerait l'activité transcriptionnelle de SRF qui potentialiserait entre autre l'activité globale des canaux mécanosensibles. Ceci serait à l'origine d'une augmentation de la mécanosensibilité des CMLVs qui participerait à l'augmentation du TM lors de l'arrêt du traitement au Sildénafil.

ANNEXES

COMPLEMENT DU MATERIEL ET METHODE DE L'ETUDE N°3

⇒ Description du modèle de souris SRF^{smko}.

Obtention d'un modèle inductible de souris déficientes en SRF spécifiquement au niveau des cellules musculaires lisses.

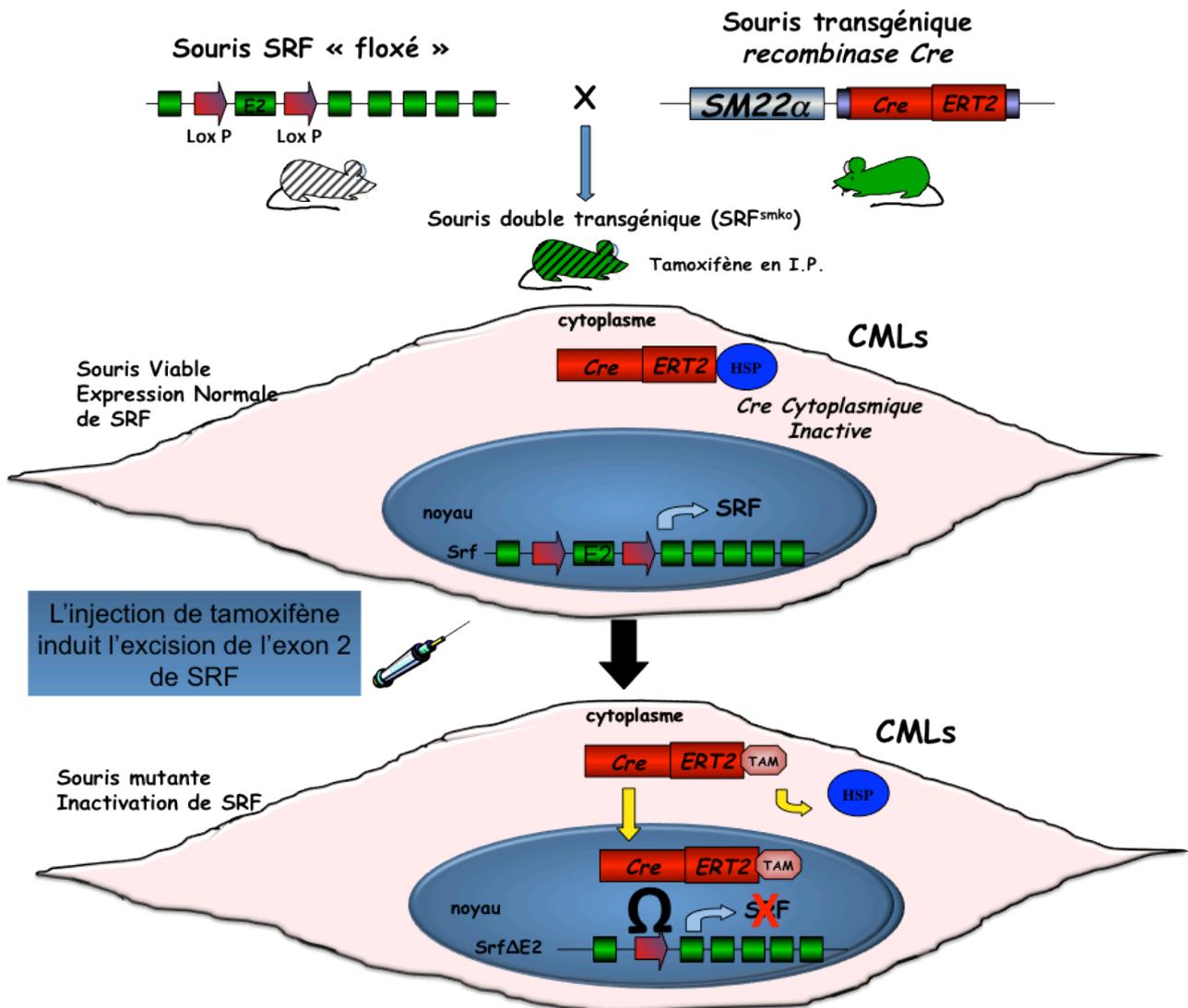


Schéma de l'obtention du modèle de souris SRF^{smko}.

Ce modèle d'inactivation ciblée et conditionnelle utilise le système de recombinaison Cre-loxP. Ce système fait intervenir une recombinaise appelée Cre et une séquence d'ADN de 34 bases dénommée LoxP. Cette recombinaise a pour propriété d'exciser tout fragment d'ADN situé entre deux sites LoxP. Une construction, contenant le gène *srf* dans lequel deux sites LoxP ont été insérés à chaque extrémité de l'exon 2, a été introduite dans les cellules embryonnaires souches (ES) de

souris. On sélectionne les cellules ES dans lesquelles le gène SRF endogène a été remplacé par le gène SRF floxé grâce à une recombinaison homologe. On injecte ces cellules ES dans le blastocyste de souris afin d'obtenir des animaux possédant dans leur génome le gène codant pour SRF qui est alors dit « floxé » (flanqué de sites loxP). Ces souris sont a priori normales car les sites loxP sont placés de façon à ne pas altérer l'expression de SRF. Chez ces souris, l'inactivation du gène floxé se produira seulement en présence de l'enzyme Cre. Comme vous pouvez le voir, l'enzyme est apportée par croisement de la souris porteuse du gène floxé avec une souris transgénique exprimant la recombinaison. L'expression du gène Cre est sous le contrôle d'un promoteur du gène sm22 α garantissant son expression spécifiquement dans les cellules musculaires lisses. A une extrémité du transgène Cre se trouve une séquence ERT2 codant pour le récepteur muté aux estrogènes qui n'est reconnue que par le tamoxifène et non par les estrogènes endogènes. Le Cre-ERT est sequestré dans le cytoplasme par les protéines HSP en absence de tamoxifène. Ainsi l'injection de tamoxifène chez les souris (SRF^{smko}) issues du croisement va déplacer l'HSP et alors induire la translocation de la recombinaison Cre dans le noyau où elle va aller exciser l'exon 2 de SRF en coupant au niveau des sites loxP. L'exon 2 code pour les 2/3 de la boîte MADS qui est le domaine permettant la fixation de SRF sur le site CArG. Ainsi en excisant l'exon2, on empêche la fixation de SRF sur l'ADN même en présence de protéine SRF tronquée.

Intérêt : Le système Cre-LoxP donne la possibilité d'invalider un gène de manière tissu-spécifique. De plus ce système est un bon moyen, dans le cas de l'étude d'une protéine comme SRF, pour pallier aux problèmes de létalité embryonnaire engendré par une telle délétion.

⇒ Mesure de RhoA-GTP par G-LISA™.

Pour quantifier l'état d'activation de la petite protéine RhoA dans nos différentes conditions, nous avons mesuré la quantité de RhoA sous sa forme active (lié au GTP) en utilisant un kit G-LISA (BK124 CYTOSKELETON).

Principe de ce kit :

Le site de liaison de la protéine RhoA-GTP (RGB) tapisse le fond des puits d'une plaque 96 puits. La forme active de RhoA liée au GTP présente dans nos échantillons va alors se fixer dans les puits alors que la forme inactive (GDP) ne se fixera pas et sera éliminée par rinçage. Ensuite, l'utilisation d'un anticorps anti-RhoA permettra de révéler la quantité de RhoA-GTP fixée et donc présente dans chaque échantillon.

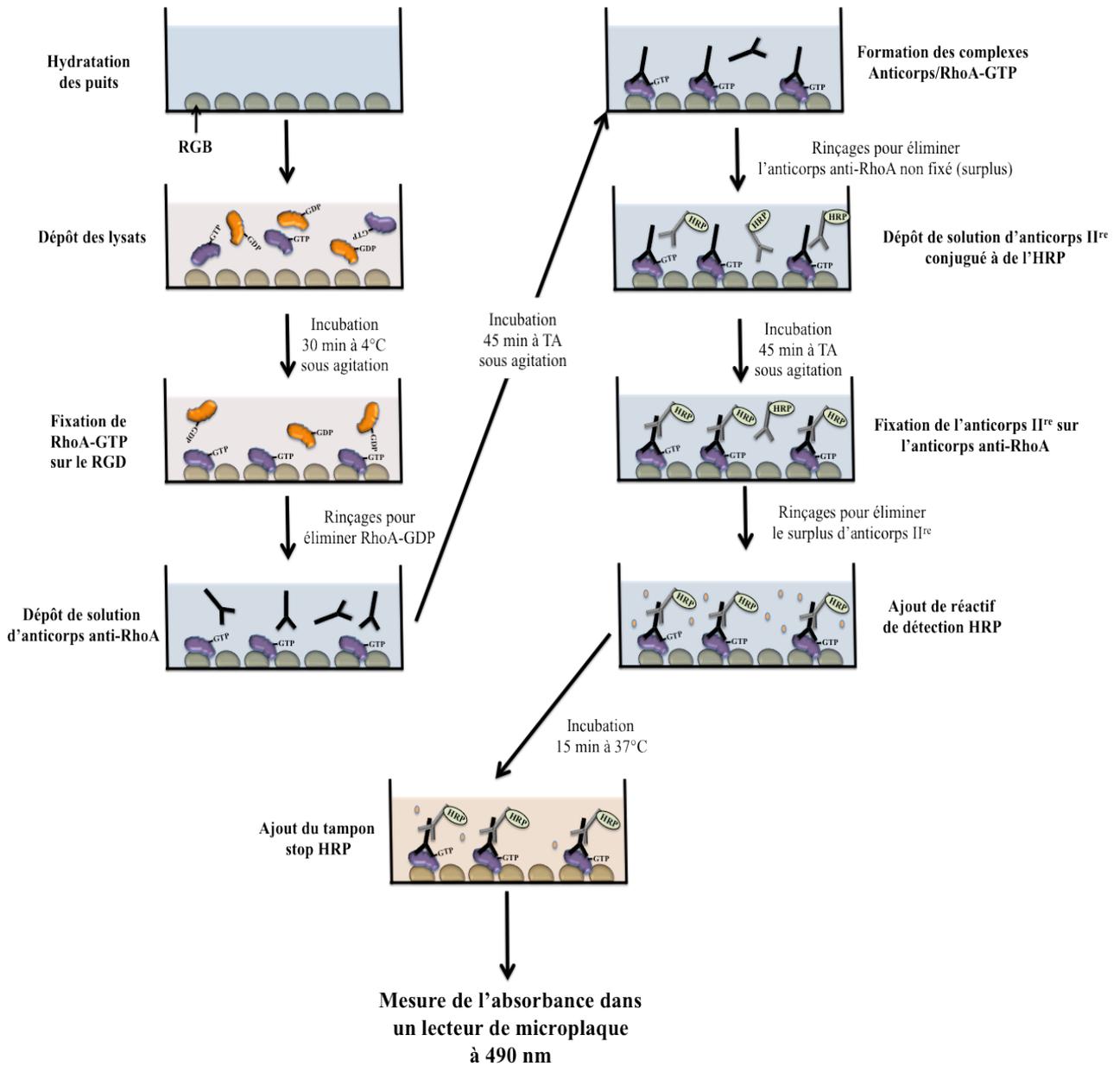


Schéma du protocole de G-lisaTM.

Intérêt : Cette technique quantitative permet de mesurer de façon précise la concentration en RhoA-GTP en se référant au contrôle positif de concentration connue et permet aussi de comparer plusieurs conditions en même temps. De plus, en comparant cette quantité de RhoA-GTP à la quantité totale de RhoA évaluée par western-blot sur les mêmes échantillons, il est possible d'estimer le ratio $RhoA-GTP/RhoA_{total}$ reflétant l'état d'activation de RhoA. Il est important de compléter l'état d'activation par une estimation de son activité reflété par l'état de phosphorylation de la sous-unité MYPT1 de la MLCP.

⇒ Anticorps utilisés en Western-blot :

Anicorps primaires	Référence	Espèce	Dilution	PM	Fournisseur
Actine Beta	A 5316	mouse	1/5000	42 kDa	SIGMA
Caveolin-1	610407	mouse	1/4000	22 kDa	BD BIOSCIENCES
phospho caveolin-1 (Tyr14)	3251 S	rabbit	1/500	22 kDa	OZYME - cell signaling
ERK 1	610032	mouse	1/5000	44 et 42 kDa	BD BIOSCIENCES
ERK 2 (D-2)	sc-1647	mouse	1/500	42 kDa	SANTA CRUZ
phospho p42/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)	9101 S	rabbit	1/1000	42 et 44 kDa	OZYME - cell signaling
FAK	06-543	rabbit	1/500	125-116 kDa	Upstate - EUROMEDEX
phospho-FAK (Tyr925)	3284 L	rabbit	1/1000	80-100 kDa	OZYME - cell signaling
MLC 2	3672	rabbit	1/1000	18 kDa	OZYME - cell signaling
phospho-MLC (Thr18/Ser19)	sc-12896-R	rabbit	1/200	18 kDa	SANTA CRUZ
MLCK	M 7905	mouse	1/5000	130-140 kDa	SIGMA
p38 MAP Kinase	9212	rabbit	1/500	38 kDa	OZYME - cell signaling
phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)	9211 S	rabbit	1/1000	38 kDa	OZYME - cell signaling
Rho A (26C4)	sc-418	mouse	1/500	24 kDa	SANTA CRUZ
SRF	sc-13029	rabbit	1/200	67 kDa	SANTA CRUZ
Filamine 1	sc-28284	rabbit	1/300	280 kDa	SANTA CRUZ
Anicorps secondaires	Référence	Espèce	Dilution	PM	Fournisseur
Goat anti rabbit Ig G HRP	sc-2004	goat	1/20000		SANTA CRUZ
Goat anti mouse Ig G HRP	31430	goat	1/5000		Pierce
Rabbit anti goat Ig G HRP	A5420	rabbit	1/80000		SIGMA
Immunofluorescence	Référence	Espèce	Dilution		Fournisseur
Alexa Fluor 568 phalloïdine	A12380		1/2000		INVITROGEN
Dnase I, alexa Fluor 488 conjugué	D12371		1/500		INVITROGEN

⇒ Amorces utilisées en PCR quantitative :

Les amorces oligonucléotidiques de tous les gènes testés sont sélectionnées à l'aide du logiciel Primer ExpressTM (version 3.0, Applied Biosystems)

Tous les couples d'amorces qui ont été utilisés sont listés dans le tableau ci-dessous.

	Amorce sens (5' → 3')	Amorce anti-sens (5' → 3')
Elk1	gctccccacacataccttga	gggtgcaattggactcaga
Acta2	accacccagagtggagaag	tacagagcccagagccattg
Flna	cctgtggagttcaccattgat	tgtgtgtcttcttgggcttg
Mapk1	ggattgaagttgaacaggctct	gaatggcgcttcagcaat
Mapk3	tggaagccatgagagatgttt	gctcagctgctggcttfta
Mapk14	gaccttctcatagatgagtggaaga	caggactccatttcttcttgggt
Mrtfa	acctctgctgcccccaagcc	accttggctcagctcctt
Mrtfb	gcagtgatgctttgtctcca	gaactgctgggacactgag
Myh11	tggaggccaagattgcac	ggccgctgttctctct
Mylk	caagtgtgtagccaagaacagc	tctactggctgagcatcg
Pfn1	ctgtccatgactgccaag	gatcaaaccacctgggaca
Ptk2	gctacaatgagggtgtcaagc	ggccaaggtggcagtg
Srf	ctgacagcagtggggaaac	gctgggtgctgtctggat

BIBLIOGRAPHIE

1. Levesque MJ, Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng.* 1985;107(4):341-347.
2. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res.* 2003;93(10):e136-142.
3. Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res.* 1967;20(1):99-111.
4. Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis.* 1985;5(1):19-34.
5. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284(5415):770-776.
6. Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, Lathrop GM, Chabriat H, Mas JL, Cabanis EA, Baudrimont M, Maciazek J, et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet.* 1993;3(3):256-259.
7. Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, Piga N, Chapon F, Godfrain C, Tournier-Lasserre E. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest.* 2000;105(5):597-605.
8. Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 2004;18(22):2730-2735.
9. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* 1994;8(6):707-719.
10. Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development.* 1999;126(15):3415-3424.
11. Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev.* 1994;46(2):123-136.
12. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillon M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature.* 1996;383(6602):707-710.
13. Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, Tournier-Lasserre E, Joutel A. Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Am J Pathol.* 2003;162(1):329-342.
14. Dubroca C, Lacombe P, Domenga V, Maciazek J, Levy B, Tournier-Lasserre E, Joutel A, Henrion D. Impaired vascular mechanotransduction in a transgenic mouse model of CADASIL arteriopathy. *Stroke.* 2005;36(1):113-117.
15. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 2000;15(3):600-616.
16. Ashton FT, Somlyo AV, Somlyo AP. The contractile apparatus of vascular smooth muscle: intermediate high voltage stereo electron microscopy. *J Mol Biol.* 1975;98(1):17-29.
17. Small JV, Furst DO, Thornell LE. The cytoskeletal lattice of muscle cells. *Eur J Biochem.* 1992;208(3):559-572.
18. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhashtonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(1):298-302.

19. Fatigati V, Murphy RA. Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem*. 1984;259(23):14383-14388.
20. Mitchell JJ, Reynolds SE, Leslie KO, Low RB, Woodcock-Mitchell J. Smooth muscle cell markers in developing rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3(6):515-523.
21. Duband JL, Gimona M, Scatena M, Sartore S, Small JV. Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. *Differentiation*. 1993;55(1):1-11.
22. Lehman W, Vibert P, Craig R. Visualization of caldesmon on smooth muscle thin filaments. *J Mol Biol*. 1997;274(3):310-317.
23. Notarianni G, Gusev N, Lafitte D, Hill TJ, Cooper HS, Derrick PJ, Marston SB. A novel Ca²⁺ binding protein associated with caldesmon in Ca²⁺-regulated smooth muscle thin filaments: evidence for a structurally altered form of calmodulin. *J Muscle Res Cell Motil*. 2000;21(6):537-549.
24. Wang CL, Wang LW, Xu SA, Lu RC, Saavedra-Alanis V, Bryan J. Localization of the calmodulin- and the actin-binding sites of caldesmon. *J Biol Chem*. 1991;266(14):9166-9172.
25. Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Vascular smooth muscle calponin. A novel troponin T-like protein. *Hypertension*. 1988;11(6 Pt 2):620-626.
26. Small JV, Gimona M. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. *Acta Physiol Scand*. 1998;164(4):341-348.
27. Mabuchi K, Li Y, Tao T, Wang CL. Immunocytochemical localization of caldesmon and calponin in chicken gizzard smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 1996;17(2):243-260.
28. Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS, Parmacek MS. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem*. 1995;270(22):13460-13469.
29. Han M, Dong LH, Zheng B, Shi JH, Wen JK, Cheng Y. Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life Sci*. 2009;84(13-14):394-401.
30. Je HD, Sohn UD. SM22alpha is required for agonist-induced regulation of contractility: evidence from SM22alpha knockout mice. *Mol Cells*. 2007;23(2):175-181.
31. Mermall V, Post PL, Mooseker MS. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*. 1998;279(5350):527-533.
32. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1496(1):3-22.
33. Kelley CA, Sellers JR, Goldsmith PK, Adelstein RS. Smooth muscle myosin is composed of homodimeric heavy chains. *J Biol Chem*. 1992;267(4):2127-2130.
34. Hodge TP, Cross R, Kendrick-Jones J. Role of the COOH-terminal nonhelical tailpiece in the assembly of a vertebrate nonmuscle myosin rod. *J Cell Biol*. 1992;118(5):1085-1095.
35. Fischer W, Pfitzer G. Rapid myosin phosphorylation transients in phasic contractions in chicken gizzard smooth muscle. *FEBS Lett*. 1989;258(1):59-62.
36. Suematsu E, Resnick M, Morgan KG. Change of Ca²⁺ requirement for myosin phosphorylation by prostaglandin F2 alpha. *Am J Physiol*. 1991;261(2 Pt 1):C253-258.
37. Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*. 2001;91(1):497-503.
38. Kolodney MS, Elson EL. Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(22):10252-10256.
39. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53(2):219-228.
40. Hammonds RG, Jr. Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell*. 1987;51(1):1.

41. Madhavan R, Massom LR, Jarrett HW. Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185(2):753-759.
42. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4560-4566.
43. Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol.* 1996;135(3):661-672.
44. Winder SJ. The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997;18(6):617-629.
45. Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem.* 1995;270(45):27305-27310.
46. Rosa G, Ceccarini M, Cavaldesi M, Zini M, Petrucci TC. Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of beta-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;223(2):272-277.
47. Madhavan R, Jarrett HW. Calmodulin-activated phosphorylation of dystrophin. *Biochemistry.* 1994;33(19):5797-5804.
48. Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem.* 1996;271(12):6605-6610.
49. Suzuki A, Yoshida M, Hayashi K, Mizuno Y, Hagiwara Y, Ozawa E. Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur J Biochem.* 1994;220(2):283-292.
50. Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 1991;66(6):1121-1131.
51. Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem.* 1995;270(20):11711-11714.
52. Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem.* 1993;268(32):23739-23742.
53. Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB, et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell.* 1994;78(4):625-633.
54. Anastasi G, Cutroneo G, Rizzo G, Favalaro A. Sarcoglycan subcomplex in normal and pathological human muscle fibers. *Eur J Histochem.* 2007;51 Suppl 1:29-33.
55. Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP. epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem.* 1999;274(39):27989-27996.
56. Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T. Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999;45(6):751-762.
57. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RC, Marie SK, Anderson LV, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet.* 1996;5(12):1963-1969.
58. Thompson TG, Chan YM, Hack AA, Brosius M, Rajala M, Lidov HG, McNally EM, Watkins S, Kunkel LM. Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol.* 2000;148(1):115-126.
59. Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31221-31224.

60. Adams ME, Butler MH, Dwyer TM, Peters MF, Murnane AA, Froehner SC. Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron*. 1993;11(3):531-540.
61. Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM. The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem*. 1996;271(5):2724-2730.
62. Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol*. 2000;10(20):1295-1298.
63. Hack AA, Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA, Hadhazy MR, Sweeney HL, McNally EM. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 14):2535-2544.
64. Hartwig JH, Stossel TP. Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 1975;250(14):5696-5705.
65. Wang K, Ash JF, Singer SJ. Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(11):4483-4486.
66. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):138-145.
67. van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1538(2-3):99-117.
68. Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol*. 1990;111(3):1089-1105.
69. Tachikawa M, Nakagawa H, Terasaki AG, Mori H, Ohashi K. A 260-kDa filamin/ABP-related protein in chicken gizzard smooth muscle cells is a new component of the dense plaques and dense bodies of smooth muscle. *J Biochem*. 1997;122(2):314-321.
70. Xu W, Xie Z, Chung DW, Davie EW. A novel human actin-binding protein homologue that binds to platelet glycoprotein Ibalpha. *Blood*. 1998;92(4):1268-1276.
71. Kwak KB, Kambayashi J, Kang MS, Ha DB, Chung CH. Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts. *FEBS Lett*. 1993;323(1-2):151-154.
72. Verhallen PF, Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Correlation between calpain-mediated cytoskeletal degradation and expression of platelet procoagulant activity. A role for the platelet membrane-skeleton in the regulation of membrane lipid asymmetry? *Biochim Biophys Acta*. 1987;903(1):206-217.
73. Small JV, Furst DO, De Mey J. Localization of filamin in smooth muscle. *J Cell Biol*. 1986;102(1):210-220.
74. Stahlhut M, van Deurs B. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 2000;11(1):325-337.
75. Sverdlov M, Shinin V, Place AT, Castellon M, Minshall RD. Filamin A regulates caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2009;20(21):4531-4540.
76. Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, Ginsberg MH. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol*. 2001;3(12):1060-1068.
77. Loo DT, Kanner SB, Aruffo A. Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J Biol Chem*. 1998;273(36):23304-23312.

78. van der Flier A, Kuikman I, Kramer D, Geerts D, Kreft M, Takafuta T, Shapiro SS, Sonnenberg A. Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits. *J Cell Biol.* 2002;156(2):361-376.
79. Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res.* 2002;91(10):877-887.
80. Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem.* 1957;7:255-318.
81. Morano I. Tuning smooth muscle contraction by molecular motors. *J Mol Med.* 2003;81(8):481-487.
82. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:111-136.
83. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* 2002;54(3):431-467.
84. Anderson RG, Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* 2002;296(5574):1821-1825.
85. Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(4):542-548.
86. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5419-5422.
87. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem.* 1996;271(25):15160-15165.
88. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* 1996;271(4):2255-2261.
89. Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem.* 1997;272(46):29337-29346.
90. Rybin VO, Grabham PW, Elouardighi H, Steinberg SF. Caveolae-associated proteins in cardiomyocytes: caveolin-2 expression and interactions with caveolin-3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(1):H325-332.
91. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1341-1379.
92. Woodman SE, Cheung MW, Tarr M, North AC, Schubert W, Lagaud G, Marks CB, Russell RG, Hassan GS, Factor SM, Christ GJ, Lisanti MP. Urogenital alterations in aged male caveolin-1 knockout mice. *J Urol.* 2004;171(2 Pt 1):950-957.
93. Fernandez I, Ying Y, Albanesi J, Anderson RG. Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11193-11198.
94. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9407-9411.
95. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6525-6533.
96. Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, Kawabe J, Ebina T, Ohno S, Couet J, Lisanti MP, Ishikawa Y. Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem.* 1997;272(52):33416-33421.

97. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996;271(46):29182-29190.
98. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem.* 1997;272(48):30429-30438.
99. Ostrom RS, Insel PA. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2004;143(2):235-245.
100. Sabourin T, Bastien L, Bachvarov DR, Marceau F. Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol.* 2002;61(3):546-553.
101. Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW, Insel PA. Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42063-42069.
102. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11728-11732.
103. Liu J, Oh P, Horner T, Rogers RA, Schnitzer JE. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J Biol Chem.* 1997;272(11):7211-7222.
104. Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, Kohtz DS, Lisanti MP. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett.* 1998;428(3):205-211.
105. Bergdahl A, Sward K. Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004;82(5):289-299.
106. Gherghiceanu M, Popescu LM. Caveolar nanospaces in smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* 2006;10(2):519-528.
107. Taggart MJ. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci.* 2001;16:61-65.
108. Taggart MJ, Leavis P, Feron O, Morgan KG. Inhibition of PKCalpha and rhoA translocation in differentiated smooth muscle by a caveolin scaffolding domain peptide. *Exp Cell Res.* 2000;258(1):72-81.
109. Je HD, Gallant C, Leavis PC, Morgan KG. Caveolin-1 regulates contractility in differentiated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(1):H91-98.
110. Urban NH, Berg KM, Ratz PH. K⁺ depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and Ca²⁺ sensitization of arterial muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(6):C1377-1385.
111. Gosens R, Stelmack GL, Dueck G, Mutawe MM, Hinton M, McNeill KD, Paulson A, Dakshinamurti S, Gerthoffer WT, Thliveris JA, Unruh H, Zaagsma J, Halayko AJ. Caveolae facilitate muscarinic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ mobilization and contraction in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(6):L1406-1418.
112. Prakash YS, Thompson MA, Vaa B, Matabdin I, Peterson TE, He T, Pabelick CM. Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(5):L1118-1126.
113. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res.* 2001;52(3):372-386.
114. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science.* 2001;294(5541):339-345.

115. Schwartz MA, Assoian RK. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 14):2553-2560.
116. Vuori K. Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J Membr Biol.* 1998;165(3):191-199.
117. Hayashi Y, Haimovich B, Reszka A, Boettiger D, Horwitz A. Expression and function of chicken integrin beta 1 subunit and its cytoplasmic domain mutants in mouse NIH 3T3 cells. *J Cell Biol.* 1990;110(1):175-184.
118. Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 20):3583-3590.
119. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:549-599.
120. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003;81(3):177-199.
121. Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* 1995;131(3):791-805.
122. Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem.* 1995;270(28):16995-16999.
123. Shen Y, Schaller MD. Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 1999;10(8):2507-2518.
124. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2008;118(1):18-35.
125. Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schutz G, Gutkind JS, Offermanns S. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med.* 2008;14(1):64-68.
126. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 5):843-846.
127. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell.* 1985;41(1):31-40.
128. Hall A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:31-54.
129. Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res.* 1999;253(1):166-179.
130. Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:459-489.
131. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Usatyuk P, Liu F, Kaibuchi K, Ricks-Cord A, Natarajan V, Alieva I, Garcia JG, Verin AD. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. *J Cell Physiol.* 2004;201(1):55-70.
132. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21722-21729.
133. Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Makhlof GM. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(6):G1006-1016.
134. Nusser N, Gosmanova E, Makarova N, Fujiwara Y, Yang L, Guo F, Luo Y, Zheng Y, Tigy G. Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cell Signal.* 2006;18(5):704-714.

135. Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, Loirand G, Pacaud P. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005;96(11):1152-1160.
136. Pacaud P, Sauzeau V, Loirand G. Rho proteins and vascular diseases. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005;98(3):249-254.
137. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, Seki H, Saida K, Takai Y. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem.* 1992;267(13):8719-8722.
138. Otto B, Steusloff A, Just I, Aktories K, Pfitzer G. Role of Rho proteins in carbachol-induced contractions in intact and permeabilized guinea-pig intestinal smooth muscle. *J Physiol.* 1996;496 (Pt 2):317-329.
139. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997;389(6654):990-994.
140. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;106(1):57-62.
141. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5313-5327.
142. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 1996;273(5272):245-248.
143. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996;271(34):20246-20249.
144. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12257-12260.
145. Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res.* 2006;98(3):322-334.
146. Staus DP, Blaker AL, Taylor JM, Mack CP. Diaphanous 1 and 2 regulate smooth muscle cell differentiation by activating the myocardin-related transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(3):478-486.
147. Higashida C, Miyoshi T, Fujita A, Ocegüera-Yanez F, Monypenny J, Andou Y, Narumiya S, Watanabe N. Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science.* 2004;303(5666):2007-2010.
148. Shimada A, Nyitrai M, Vetter IR, Kuhlmann D, Bugyi B, Narumiya S, Geeves MA, Wittinghofer A. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell.* 2004;13(4):511-522.
149. Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell.* 1999;98(2):159-169.
150. Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci.* 1994;19(2):73-77.
151. Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(2):161-167.
152. Rasmussen H, Takuwa Y, Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J.* 1987;1(3):177-185.
153. Shirasawa Y, Rutland TJ, Young JL, Dean DA, Joseph BN. Modulation of protein kinase C (PKC)-mediated contraction and the possible role of PKC epsilon in rat mesenteric arteries. *Front Biosci.* 2003;8:a133-138.

154. Dessy C, Kim I, Sougnez CL, Laporte R, Morgan KG. A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol.* 1998;275(4 Pt 1):C1081-1086.
155. Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(5):1079-1088.
156. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(2):205-215.
157. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994;265(5173):808-811.
158. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science.* 1995;267(5198):682-685.
159. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science.* 1995;267(5196):389-393.
160. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* 1994;78(6):1039-1049.
161. Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M. Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 1997;16(2):295-305.
162. Cuenda A, Goedert M, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel MAP kinase homologue SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6). *Biochem Soc Trans.* 1997;25(4):S569.
163. Kuma Y, Sabio G, Bain J, Shpiro N, Marquez R, Cuenda A. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19472-19479.
164. Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini MG, Thomas GM, Buee-Scherrer V, Cohen P, Goedert M. Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12626-12631.
165. Sabio G, Reuver S, Feijoo C, Hasegawa M, Thomas GM, Centeno F, Kuhlendahl S, Leal-Ortiz S, Goedert M, Garner C, Cuenda A. Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the synapse-associated protein SAP90/PSD-95 by activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2. *Biochem J.* 2004;380(Pt 1):19-30.
166. Feijoo C, Campbell DG, Jakes R, Goedert M, Cuenda A. Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 2):397-408.
167. Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1997;409(1):57-62.
168. Heidenreich O, Neininger A, Schrott G, Zinck R, Cahill MA, Engel K, Kotlyarov A, Kraft R, Kostka S, Gaestel M, Nordheim A. MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1999;274(20):14434-14443.
169. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7420-7426.
170. Pichon S, Bryckaert M, Berrou E. Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 12):2569-2577.

171. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(2):H741-751.
172. Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane- induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res*. 2002;39(4):353-360.
173. Hedges JC, Oxhorn BC, Carty M, Adam LP, Yamboliev IA, Gerthoffer WT. Phosphorylation of caldesmon by ERK MAP kinases in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(4):C718-726.
174. Larsen JK, Yamboliev IA, Weber LA, Gerthoffer WT. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Am J Physiol*. 1997;273(5 Pt 1):L930-940.
175. Ibitayo AI, Sladick J, Tuteja S, Louis-Jacques O, Yamada H, Groblewski G, Welsh M, Bitar KN. HSP27 in signal transduction and association with contractile proteins in smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1999;277(2 Pt 1):G445-454.
176. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem*. 1993;268(32):24210-24214.
177. Gerthoffer WT, Gunst SJ. Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):963-972.
178. Mehta D, Gunst SJ. Actin polymerization stimulated by contractile activation regulates force development in canine tracheal smooth muscle. *J Physiol*. 1999;519 Pt 3:829-840.
179. Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT. Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(6):H1899-1907.
180. Cuenda A, Alonso G, Morrice N, Jones M, Meier R, Cohen P, Nebreda AR. Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *EMBO J*. 1996;15(16):4156-4164.
181. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*. 1996;16(3):1247-1255.
182. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001;81(2):807-869.
183. Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 2003;17(16):1969-1978.
184. Lu HT, Yang DD, Wysk M, Gatti E, Mellman I, Davis RJ, Flavell RA. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J*. 1999;18(7):1845-1857.
185. Wysk M, Yang DD, Lu HT, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3763-3768.
186. Tanaka N, Kamanaka M, Enslin H, Dong C, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep*. 2002;3(8):785-791.
187. Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*. 1995;81(7):1147-1157.

188. Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ, Bokoch GM. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem.* 1995;270(41):23934-23936.
189. Marinissen MJ, Chiariello M, Gutkind JS. Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway. *Genes Dev.* 2001;15(5):535-553.
190. Marinissen MJ, Chiariello M, Pallante M, Gutkind JS. A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol Cell Biol.* 1999;19(6):4289-4301.
191. Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science.* 2002;295(5558):1291-1294.
192. Lu G, Kang YJ, Han J, Herschman HR, Stefani E, Wang Y. TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(9):6087-6095.
193. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 1994;372(6503):231-236.
194. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000;522 Pt 2:177-185.
195. Smith L, Stull JT. Myosin light chain kinase binding to actin filaments. *FEBS Lett.* 2000;480(2-3):298-300.
196. Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 2000;10(8):322-328.
197. Persechini A, Yano K, Stemmer PM. Ca(2+) binding and energy coupling in the calmodulin-myosin light chain kinase complex. *J Biol Chem.* 2000;275(6):4199-4204.
198. Gao C, Chen LW, Tao YM, Chen J, Xu XJ, Chi ZQ. Effects of ohmefentanyl stereoisomers on phosphorylation of cAMP- response element binding protein in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24(12):1253-1258.
199. Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1979;48:923-959.
200. de Lanerolle P, Nishikawa M, Yost DA, Adelstein RS. Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in intact smooth muscle. *Science.* 1984;223(4643):1415-1417.
201. Stull JT, Hsu LC, Tansey MG, Kamm KE. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem.* 1990;265(27):16683-16690.
202. Tansey MG, Luby-Phelps K, Kamm KE, Stull JT. Ca(2+)-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca2+ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994;269(13):9912-9920.
203. Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil.* 1998;19(4):325-341.
204. Dohadwala M, da Cruz e Silva EF, Hall FL, Williams RT, Carbonaro-Hall DA, Nairn AC, Greengard P, Berndt N. Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6408-6412.
205. Hirano K, Phan BC, Hartshorne DJ. Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3683-3688.
206. Trinkle-Mulcahy L, Ichikawa K, Hartshorne DJ, Siegman MJ, Butler TM. Thiophosphorylation of the 130-kDa subunit is associated with a decreased activity of myosin light chain phosphatase in alpha-toxin-permeabilized smooth muscle. *J Biol Chem.* 1995;270(31):18191-18194.

207. Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . *Science*. 1999;286(5444):1583-1587.
208. Torrecillas G, Diez-Marques ML, Garcia-Escribano C, Bosch RJ, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Mechanisms of cGMP-dependent mesangial-cell relaxation: a role for myosin light-chain phosphatase activation. *Biochem J*. 2000;346 Pt 1:217-222.
209. Godfraind T, Govoni S. Recent advances in the pharmacology of Ca²⁺ and K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(1):1-4.
210. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12(9):349-354.
211. Vogalis F, Publicover NG, Hume JR, Sanders KM. Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1991;260(5 Pt 1):C1012-1018.
212. McDonald RL, Vaughan PF, Peers C. Muscarinic (M1) receptor-mediated inhibition of K(+)-evoked [3H]-noradrenaline release from human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells via inhibition of L- and N-type Ca²⁺ channels. *Br J Pharmacol*. 1994;113(2):621-627.
213. Kremer SG, Breuer WV, Skorecki KL. Vasoconstrictor hormones depolarize renal glomerular mesangial cells by activating chloride channels. *J Cell Physiol*. 1989;138(1):97-105.
214. Bae YM, Kim KS, Park JK, Ko E, Ryu SY, Baek HJ, Lee SH, Ho WK, Earm YE. Ca²⁺-dependent membrane currents in vascular smooth muscle cells of the rabbit. *Life Sci*. 2001;69(21):2451-2466.
215. Piper AS, Large WA. Multiple conductance states of single Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol*. 2003;547(Pt 1):181-196.
216. Pacaud P, Bolton TB. Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *J Physiol*. 1991;441:477-499.
217. Curtis TM, Scholfield CN. Nifedipine blocks Ca²⁺ store refilling through a pathway not involving L-type Ca²⁺ channels in rabbit arteriolar smooth muscle. *J Physiol*. 2001;532(Pt 3):609-623.
218. Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*. 1990;11(10):611-624.
219. Kaznacheeva E, Zubov A, Gusev K, Bezprozvanny I, Mozhayeva GN. Activation of calcium entry in human carcinoma A431 cells by store depletion and phospholipase C-dependent mechanisms converge on ICRAC-like calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(1):148-153.
220. Taylor CW, Richardson A. Structure and function of inositol trisphosphate receptors. *Pharmacol Ther*. 1991;51(1):97-137.
221. Bretschneider E, Paintz M, Glusa E. Inositol 1,4,5-triphosphate and protein kinase C are involved in thrombin- and trap-induced vascular smooth muscle contraction. *Agents Actions Suppl*. 1995;45:309-313.
222. Eckert RE, Karsten AJ, Utz J, Ziegler M. Regulation of renal artery smooth muscle tone by α 1-adrenoceptors: role of voltage-gated calcium channels and intracellular calcium stores. *Urol Res*. 2000;28(2):122-127.
223. Mignery GA, Newton CL, Archer BT, 3rd, Sudhof TC. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*. 1990;265(21):12679-12685.
224. Mignery GA, Sudhof TC. The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor. *EMBO J*. 1990;9(12):3893-3898.
225. Iino M. Biphasic Ca²⁺ dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol*. 1990;95(6):1103-1122.
226. Savineau JP, Marthan R. Cytosolic Calcium Oscillations in Smooth Muscle Cells. *News Physiol Sci*. 2000;15:50-55.

227. Sward K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol*. 2000;522 Pt 1:33-49.
228. Maeda Y, Hirano K, Nishimura J, Sasaki T, Kanaide H. Rho-kinase inhibitor inhibits both myosin phosphorylation-dependent and -independent enhancement of myofilament Ca²⁺ sensitivity in the bovine middle cerebral artery. *Br J Pharmacol*. 2003;140(5):871-880.
229. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand*. 1998;164(4):437-448.
230. Somlyo AP, Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J*. 1989;3(11):2266-2276.
231. Walsh MP, Andrea JE, Allen BG, Clement-Chomienne O, Collins EM, Morgan KG. Smooth muscle protein kinase C. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72(11):1392-1399.
232. Jensen PE, Gong MC, Somlyo AV, Somlyo AP. Separate upstream and convergent downstream pathways of G-protein- and phorbol ester-mediated Ca²⁺ sensitization of myosin light chain phosphorylation in smooth muscle. *Biochem J*. 1996;318 (Pt 2):469-475.
233. Ikebe M, Brozovich FV. Protein kinase C increases force and slows relaxation in smooth muscle: evidence for regulation of the myosin light chain phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;225(2):370-376.
234. Itoh H, Shimomura A, Okubo S, Ichikawa K, Ito M, Konishi T, Nakano T. Inhibition of myosin light chain phosphatase during Ca(2+)-independent vasocontraction. *Am J Physiol*. 1993;265(5 Pt 1):C1319-1324.
235. Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem*. 1995;118(6):1104-1107.
236. Eto M, Wong L, Yazawa M, Brautigan DL. Inhibition of myosin/moesin phosphatase by expression of the phosphoinhibitor protein CPI-17 alters microfilament organization and retards cell spreading. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000;46(3):222-234.
237. Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Brautigan DL. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*. 2000;275(14):9897-9900.
238. Sathishkumar K, Yallampalli U, Elkins R, Yallampalli C. Raf-1 Kinase Regulates Smooth Muscle Contraction in the Rat Mesenteric Arteries. *J Vasc Res*. 47(5):384-398.
239. Gong MC, Fuglsang A, Alessi D, Kobayashi S, Cohen P, Somlyo AV, Somlyo AP. Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J Biol Chem*. 1992;267(30):21492-21498.
240. Fu X, Gong MC, Jia T, Somlyo AV, Somlyo AP. The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca²⁺-sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett*. 1998;440(1-2):183-187.
241. Guo Z, Su W, Ma Z, Smith GM, Gong MC. Ca²⁺-independent phospholipase A2 is required for agonist-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1856-1863.
242. Woodsome TP, Eto M, Everett A, Brautigan DL, Kitazawa T. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol*. 2001;535(Pt 2):553-564.
243. Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Khalequzzaman M. Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol*. 2003;546(Pt 3):879-889.
244. Treisman R. Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J*. 1987;6(9):2711-2717.
245. Wang DZ, Olson EN. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14(5):558-566.

246. Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*. 1988;55(6):989-1003.
247. Gauthier-Rouviere C, Vandromme M, Lautredou N, Cai QQ, Girard F, Fernandez A, Lamb N. The serum response factor nuclear localization signal: general implications for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in control of nuclear translocation. *Mol Cell Biol*. 1995;15(1):433-444.
248. Sobue K, Hayashi K, Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol Cell Biochem*. 1999;190(1-2):105-118.
249. Herschman HR. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:281-319.
250. Iyer D, Chang D, Marx J, Wei L, Olson EN, Parmacek MS, Balasubramanyam A, Schwartz RJ. Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(12):4516-4521.
251. Marais RM, Hsuan JJ, McGuigan C, Wynne J, Treisman R. Casein kinase II phosphorylation increases the rate of serum response factor-binding site exchange. *Embo J*. 1992;11(1):97-105.
252. Janknecht R, Ernst WH, Houthaeve T, Nordheim A. C-terminal phosphorylation of the serum-response factor. *Eur J Biochem*. 1993;216(2):469-475.
253. Liu SH, Ma JT, Yueh AY, Lees-Miller SP, Anderson CW, Ng SY. The carboxyl-terminal transactivation domain of human serum response factor contains DNA-activated protein kinase phosphorylation sites. *J Biol Chem*. 1993;268(28):21147-21154.
254. Manak JR, de Bisschop N, Kris RM, Prywes R. Casein kinase II enhances the DNA binding activity of serum response factor. *Genes Dev*. 1990;4(6):955-967.
255. Manak JR, Prywes R. Mutation of serum response factor phosphorylation sites and the mechanism by which its DNA-binding activity is increased by casein kinase II. *Mol Cell Biol*. 1991;11(7):3652-3659.
256. Blaker AL, Taylor JM, Mack CP. PKA-dependent phosphorylation of serum response factor inhibits smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(12):2153-2160.
257. Camoretti-Mercado B, Liu HW, Halayko AJ, Forsythe SM, Kyle JW, Li B, Fu Y, McConville J, Kogut P, Vieira JE, Patel NM, Hershenson MB, Fuchs E, Sinha S, Miano JM, Parmacek MS, Burkhardt JK, Solway J. Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *J Biol Chem*. 2000;275(39):30387-30393.
258. Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P, Bellam S, Dowell M, Churchill J, Lesso H, Kassiri K, Mitchell RW, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B, Solway J. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(1):39-47.
259. Belaguli NS, Zhou W, Trinh TH, Majesky MW, Schwartz RJ. Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets. *Mol Cell Biol*. 1999;19(7):4582-4591.
260. Belaguli NS, Schildmeyer LA, Schwartz RJ. Organization and myogenic restricted expression of the murine serum response factor gene. A role for autoregulation. *J Biol Chem*. 1997;272(29):18222-18231.
261. Ling Y, Lakey JH, Roberts CE, Sharrocks AD. Molecular characterization of the B-box protein-protein interaction motif of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J*. 1997;16(9):2431-2440.

262. Moiseyeva EP, Weller PA, Zhidkova NI, Corben EB, Patel B, Jasinska I, Koteliansky VE, Critchley DR. Organization of the human gene encoding the cytoskeletal protein vinculin and the sequence of the vinculin promoter. *J Biol Chem*. 1993;268(6):4318-4325.
263. Mack CP, Owens GK. Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CARG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circ Res*. 1999;84(7):852-861.
264. Ellis PD, Martin KM, Rickman C, Metcalfe JC, Kemp PR. Increased actin polymerization reduces the inhibition of serum response factor activity by Yin Yang 1. *Biochem J*. 2002;364(Pt 2):547-554.
265. Favot L, Hall SM, Haworth SG, Kemp PR. Cytoplasmic YY1 is associated with increased smooth muscle-specific gene expression: implications for neonatal pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 2005;167(6):1497-1509.
266. Gineitis D, Treisman R. Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. *J Biol Chem*. 2001;276(27):24531-24539.
267. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*. 2003;113(3):329-342.
268. Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem*. 2001;276(1):341-347.
269. Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7129-7134.
270. Zhou W, Negash S, Liu J, Raj JU. Modulation of pulmonary vascular smooth muscle cell phenotype in hypoxia: role of cGMP-dependent protein kinase and myocardin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296(5):L780-789.
271. Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci*. 2005;28(4):202-208.
272. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(5):347-360.
273. Redwine JM, Kosofsky B, Jacobs RE, Games D, Reilly JF, Morrison JH, Young WG, Bloom FE. Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):1381-1386.
274. Niwa K, Younkin L, Ebeling C, Turner SK, Westaway D, Younkin S, Ashe KH, Carlson GA, Iadecola C. Abeta 1-40-related reduction in functional hyperemia in mouse neocortex during somatosensory activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9735-9740.
275. Smith CD, Andersen AH, Kryscio RJ, Schmitt FA, Kindy MS, Blonder LX, Avison MJ. Altered brain activation in cognitively intact individuals at high risk for Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999;53(7):1391-1396.
276. Ruitenber A, den Heijer T, Bakker SL, van Swieten JC, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Ann Neurol*. 2005;57(6):789-794.
277. Chow N, Bell RD, Deane R, Streb JW, Chen J, Brooks A, Van Nostrand W, Miano JM, Zlokovic BV. Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):823-828.
278. Bell RD, Deane R, Chow N, Long X, Sagare A, Singh I, Streb JW, Guo H, Rubio A, Van Nostrand W, Miano JM, Zlokovic BV. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol*. 2009;11(2):143-153.
279. Meyyappan M, Wheaton K, Riabowol KT. Decreased expression and activity of the immediate-early growth response (Egr-1) gene product during cellular senescence. *J Cell Physiol*. 1999;179(1):29-39.

280. Lahoute C, Sotiropoulos A, Favier M, Guillet-Deniau I, Charvet C, Ferry A, Butler-Browne G, Metzger D, Tuil D, Daegelen D. Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One*. 2008;3(12):e3910.
281. Sakuma K, Akiho M, Nakashima H, Akima H, Yasuhara M. Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(7-8):453-461.
282. Phiel CJ, Gabbeta V, Parsons LM, Rothblat D, Harvey RP, McHugh KM. Differential binding of an SRF/NK-2/MEF2 transcription factor complex in normal versus neoplastic smooth muscle tissues. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34637-34650.
283. Psichari E, Balmain A, Plows D, Zoumpourlis V, Pintzas A. High activity of serum response factor in the mesenchymal transition of epithelial tumor cells is regulated by RhoA signaling. *J Biol Chem*. 2002;277(33):29490-29495.
284. Taylor A, Webster KA, Gustafson TA, Kedes L. The anti-cancer agent distamycin A displaces essential transcription factors and selectively inhibits myogenic differentiation. *Mol Cell Biochem*. 1997;169(1-2):61-72.
285. Miano JM, Long X, Fujiwara K. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(1):C70-81.
286. Pipes GC, Creemers EE, Olson EN. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev*. 2006;20(12):1545-1556.
287. Zhang X, Azhar G, Chai J, Sheridan P, Nagano K, Brown T, Yang J, Khrapko K, Borrás AM, Lawitts J, Misra RP, Wei JY. Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(4):H1782-1792.
288. Zhang X, Chai J, Azhar G, Sheridan P, Borrás AM, Furr MC, Khrapko K, Lawitts J, Misra RP, Wei JY. Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor. *J Biol Chem*. 2001;276(43):40033-40040.
289. Gary-Bobo G, Parlakian A, Escoubet B, Franco CA, Clement S, Bruneval P, Tuil D, Daegelen D, Paulin D, Li Z, Mericskay M. Mosaic inactivation of the serum response factor gene in the myocardium induces focal lesions and heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(7):635-645.
290. Han YJ, Hu WY, Chernaya O, Antic N, Gu L, Gupta M, Piano M, de Lanerolle P. Increased myosin light chain kinase expression in hypertension: Regulation by serum response factor via an insertion mutation in the promoter. *Mol Biol Cell*. 2006;17(9):4039-4050.
291. Mericskay M, Blanc J, Tritsch E, Moriez R, Aubert P, Neunlist M, Feil R, Li Z. Inducible mouse model of chronic intestinal pseudo-obstruction by smooth muscle-specific inactivation of the SRF gene. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1960-1970.
292. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol*. 1902;28(3):220-231.
293. Folkow B. Intravascular pressure as a factor regulating the tone of the small vessels. *Acta Physiol Scand*. 1949;17(4):289-310.
294. Davis MJ. Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am J Physiol*. 1993;264(6 Pt 2):H2168-2179.
295. Osol G. Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res*. 1995;32(5):275-292.
296. Meininger GA, Faber JE. Adrenergic facilitation of myogenic response in skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol*. 1991;260(5 Pt 2):H1424-1432.
297. Meininger GA, Trzeciakowski JP. Combined effects of autoregulation and vasoconstrictors on hindquarters vascular resistance. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 2):H1032-1041.
298. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*. 1990;259(1 Pt 1):C3-18.

299. Harder DR. Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ Res.* 1984;55(2):197-202.
300. Zelcer E, Sperelakis N. Spontaneous electrical activity in pressurized small mesenteric arteries. *Blood Vessels.* 1982;19(6):301-310.
301. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999;79(2):387-423.
302. Smeda JS, Daniel EE. Elevations in arterial pressure induce the formation of spontaneous action potentials and alter neurotransmission in canine ileum arteries. *Circ Res.* 1988;62(6):1104-1110.
303. Knot HJ, Nelson MT. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 2):H348-355.
304. Welsh DG, Nelson MT, Eckman DM, Brayden JE. Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J Physiol.* 2000;527 Pt 1:139-148.
305. Wu X, Davis MJ. Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(4):H1751-1761.
306. Pyles JM, March KL, Franklin M, Mehdi K, Wilensky RL, Adam LP. Activation of MAP kinase in vivo follows balloon overstretch injury of porcine coronary and carotid arteries. *Circ Res.* 1997;81(6):904-910.
307. McCarron JG, Crichton CA, Langton PD, MacKenzie A, Smith GL. Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries. *J Physiol.* 1997;498 (Pt 2):371-379.
308. Knot HJ, Nelson MT. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol.* 1998;508 (Pt 1):199-209.
309. Kotecha N, Hill MA. Myogenic contraction in rat skeletal muscle arterioles: smooth muscle membrane potential and Ca(2+) signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(4):H1326-1334.
310. Wu X, Davis GE, Meininger GA, Wilson E, Davis MJ. Regulation of the L-type calcium channel by alpha 5beta 1 integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J Biol Chem.* 2001;276(32):30285-30292.
311. Gui P, Wu X, Ling S, Stotz SC, Winkfein RJ, Wilson E, Davis GE, Braun AP, Zamponi GW, Davis MJ. Integrin receptor activation triggers converging regulation of Cav1.2 calcium channels by c-Src and protein kinase A pathways. *J Biol Chem.* 2006;281(20):14015-14025.
312. Davis MJ, Donovan JA, Hood JD. Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1992;262(4 Pt 1):C1083-1088.
313. Davis MJ, Sikes PJ. Myogenic responses of isolated arterioles: test for a rate-sensitive mechanism. *Am J Physiol.* 1990;259(6 Pt 2):H1890-1900.
314. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(6):387-396.
315. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Kalwa H, Storch U, Gudermann T. Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2005;371(4):257-265.
316. Christensen AP, Corey DP. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(7):510-521.
317. Sharif-Naeini R, Dedman A, Folgering JH, Duprat F, Patel A, Nilius B, Honore E. TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response. *Pflugers Arch.* 2008;456(3):529-540.
318. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res.* 2002;90(3):248-250.

319. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL. A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16586-16591.
320. Earley S, Waldron BJ, Brayden JE. Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res*. 2004;95(9):922-929.
321. Earley S, Straub SV, Brayden JE. Protein kinase C regulates vascular myogenic tone through activation of TRPM4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(6):H2613-2622.
322. Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*. 2005;7(2):179-185.
323. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch*. 2007;455(3):465-477.
324. Dietrich A, Mederos YSM, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*. 2005;25(16):6980-6989.
325. Reading SA, Earley S, Waldron BJ, Welsh DG, Brayden JE. TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2055-2061.
326. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J*. 2008;27(23):3092-3103.
327. Fronius M, Clauss WG. Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you. *Pflugers Arch*. 2008;455(5):775-785.
328. Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR. Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4120-4126.
329. Jernigan NL, Drummond HA. Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(4):F891-901.
330. Jernigan NL, Drummond HA. Myogenic vasoconstriction in mouse renal interlobar arteries: role of endogenous beta and gammaENaC. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291(6):F1184-1191.
331. Grifoni SC, Chiposi R, McKey SE, Ryan MJ, Drummond HA. Altered whole kidney blood flow autoregulation in a mouse model of reduced {beta}ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009.
332. Drummond HA, Gebremedhin D, Harder DR. Degenerin/epithelial Na⁺ channel proteins: components of a vascular mechanosensor. *Hypertension*. 2004;44(5):643-648.
333. Drummond HA, Grifoni SC, Jernigan NL. A new trick for an old dogma: ENaC proteins as mechanotransducers in vascular smooth muscle. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:23-31.
334. Wellner MC, Isenberg G. Stretch effects on whole-cell currents of guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol*. 1994;480 (Pt 3):439-448.
335. Jaggar JH, Wellman GC, Heppner TJ, Porter VA, Perez GJ, Gollasch M, Kleppisch T, Rubart M, Stevenson AS, Lederer WJ, Knot HJ, Bonev AD, Nelson MT. Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K⁺ channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand*. 1998;164(4):577-587.
336. Jaggar JH. Intravascular pressure regulates local and global Ca(2+) signaling in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(2):C439-448.
337. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*. 1995;270(5236):633-637.

338. Yang Y, Murphy TV, Ella SR, Grayson TH, Haddock R, Hwang YT, Braun AP, Peichun G, Korthuis RJ, Davis MJ, Hill MA. Heterogeneity in function of small artery smooth muscle BKCa: involvement of the beta1-subunit. *J Physiol*. 2009;587(Pt 12):3025-3044.
339. Jaggar JH, Porter VA, Lederer WJ, Nelson MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(2):C235-256.
340. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
341. Chen TT, Luykenaar KD, Walsh EJ, Walsh MP, Cole WC. Key role of Kv1 channels in vasoregulation. *Circ Res*. 2006;99(1):53-60.
342. Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2004;142(1):192-202.
343. Garry A, Fromy B, Blondeau N, Henrion D, Brau F, Gounon P, Guy N, Heurteaux C, Lazdunski M, Saumet JL. Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep*. 2007;8(4):354-359.
344. Bryan RM, Jr., You J, Phillips SC, Andresen JJ, Lloyd EE, Rogers PA, Dryer SE, Marrelli SP. Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H770-780.
345. Blondeau N, Petrault O, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res*. 2007;101(2):176-184.
346. Pacaud P, Loirand G, Baron A, Mironneau C, Mironneau J. Ca²⁺ channel activation and membrane depolarization mediated by Cl⁻ channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br J Pharmacol*. 1991;104(4):1000-1006.
347. Large WA, Wang Q. Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle. *Am J Physiol*. 1996;271(2 Pt 1):C435-454.
348. Henrion D, Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Friedlander G, Poitevin P, Levy BI. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest*. 1997;100(11):2909-2914.
349. Loufrani L, Matrougui K, Gorny D, Duriez M, Blanc I, Levy BI, Henrion D. Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation*. 2001;103(6):864-870.
350. Sharif-Naeini R, Folgering JH, Bichet D, Duprat F, Lauritzen I, Arhatte M, Jodar M, Dedman A, Chatelain FC, Schulte U, Retailleau K, Loufrani L, Patel A, Sachs F, Delmas P, Peters DJ, Honore E. Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell*. 2009;139(3):587-596.
351. Flavahan NA, Bailey SR, Flavahan WA, Mitra S, Flavahan S. Imaging remodeling of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells after mechanosensitive arteriolar constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(2):H660-669.
352. Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J*. 2002;16(1):72-76.
353. Platts SH, Martinez-Lemus LA, Meininger GA. Microtubule-dependent regulation of vasomotor tone requires Rho-kinase. *J Vasc Res*. 2002;39(2):173-182.
354. Mogford JE, Davis GE, Platts SH, Meininger GA. Vascular smooth muscle alpha v beta 3 integrin mediates arteriolar vasodilation in response to RGD peptides. *Circ Res*. 1996;79(4):821-826.
355. Wu X, Mogford JE, Platts SH, Davis GE, Meininger GA, Davis MJ. Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by alphav beta3 and alpha5 beta1 integrin ligands. *J Cell Biol*. 1998;143(1):241-252.

356. Sjaastad MD, Nelson WJ. Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays*. 1997;19(1):47-55.
357. Martinez-Lemus LA, Crow T, Davis MJ, Meininger GA. α v β 3- and α 5 β 1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H322-329.
358. Wu X, Yang Y, Gui P, Sohma Y, Meininger GA, Davis GE, Braun AP, Davis MJ. Potentiation of large conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} (BK) channels by α 5 β 1 integrin activation in arteriolar smooth muscle. *J Physiol*. 2008;586(6):1699-1713.
359. Lagaud G, Karicheti V, Knot HJ, Christ GJ, Laher I. Inhibitors of gap junctions attenuate myogenic tone in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(6):H2177-2186.
360. Earley S, Resta TC, Walker BR. Disruption of smooth muscle gap junctions attenuates myogenic vasoconstriction of mesenteric resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(6):H2677-2686.
361. Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S, Matrougui K. Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation*. 2004;110(23):3587-3593.
362. Su J, Palen DI, Lucchesi PA, Matrougui K. Mice lacking the gene encoding for MMP-9 and resistance artery reactivity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(4):1177-1181.
363. Narayanan J, Imig M, Roman RJ, Harder DR. Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 2):H1840-1845.
364. Roman RJ, Renic M, Dunn KM, Takeuchi K, Haccin-Bey L. Evidence that 20-HETE contributes to the development of acute and delayed cerebral vasospasm. *Neurol Res*. 2006;28(7):738-749.
365. Nowicki PT, Flavahan S, Hassanain H, Mitra S, Holland S, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res*. 2001;89(2):114-116.
366. Hill MA, Meininger GA. Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol*. 1994;267(3 Pt 2):H1085-1092.
367. Loutzenhiser R, Bidani A, Chilton L. Renal myogenic response: kinetic attributes and physiological role. *Circ Res*. 2002;90(12):1316-1324.
368. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*. 1999;397(6716):259-263.
369. Schubert R, Lidington D, Bolz SS. The emerging role of Ca^{2+} sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. *Cardiovasc Res*. 2008;77(1):8-18.
370. Gudi S, Nolan JP, Frangos JA. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(5):2515-2519.
371. Yatani A, Brown AM. Rapid beta-adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway. *Science*. 1989;245(4913):71-74.
372. Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, Boer C, Pitson SM, Spiegel S, Pohl U. Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic responses through activation of RhoA/Rho kinase. *Circulation*. 2003;108(3):342-347.
373. Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D. Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension*. 2005;45(5):974-979.
374. Hill MA, Falcone JC, Meininger GA. Evidence for protein kinase C involvement in arteriolar myogenic reactivity. *Am J Physiol*. 1990;259(5 Pt 2):H1586-1594.
375. Osol G, Laher I, Cipolla M. Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ Res*. 1991;68(2):359-367.

376. Massett MP, Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G, Koller A. Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(6):H2282-2287.
377. Muller JM, Chilian WM, Davis MJ. Integrin signaling transduces shear stress--dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res*. 1997;80(3):320-326.
378. Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J*. 1993;12(4):1681-1692.
379. Loufrani L, Lehoux S, Tedgui A, Levy BI, Henrion D. Stretch induces mitogen-activated protein kinase activation and myogenic tone through 2 distinct pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(12):2878-2883.
380. Murphy TV, Spurrell BE, Hill MA. Tyrosine phosphorylation following alterations in arteriolar intraluminal pressure and wall tension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(3):H1047-1056.
381. Laher I, van Breemen C, Bevan JA. Stretch-dependent calcium uptake associated with myogenic tone in rabbit facial vein. *Circ Res*. 1988;63(3):669-672.
382. Henrion D, Laher I, Bevan JA. Intraluminal flow increases vascular tone and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in the rabbit facial vein. *Circ Res*. 1992;71(2):339-345.
383. Belus A, White E. Streptomycin and intracellular calcium modulate the response of single guinea-pig ventricular myocytes to axial stretch. *J Physiol*. 2003;546(Pt 2):501-509.
384. Ji G, Barsotti RJ, Feldman ME, Kotlikoff MI. Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *J Gen Physiol*. 2002;119(6):533-544.
385. Boels PJ, Troschka M, Ruegg JC, Pfitzer G. Higher Ca^{2+} sensitivity of triton-skinned guinea pig mesenteric microarteries as compared with large arteries. *Circ Res*. 1991;69(4):989-996.
386. Harder DR, Campbell WB, Roman RJ. Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *J Vasc Res*. 1995;32(2):79-92.
387. VanBavel E, Wesselman JP, Spaan JA. Myogenic activation and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Circ Res*. 1998;82(2):210-220.
388. VanBavel E, van der Meulen ET, Spaan JA. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Exp Physiol*. 2001;86(5):585-592.
389. Shiraishi M, Loutzenhiser RD, Walsh MP. A highly sensitive method for quantification of myosin light chain phosphorylation by capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 2005;26(3):571-580.
390. Takeya K, Loutzenhiser K, Shiraishi M, Loutzenhiser R, Walsh MP. A highly sensitive technique to measure myosin regulatory light chain phosphorylation: the first quantification in renal arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(6):F1487-1492.
391. Johnson RP, El-Yazbi AF, Takeya K, Walsh EJ, Walsh MP, Cole WC. Ca^{2+} sensitization via phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit at threonine-855 by Rho kinase contributes to the arterial myogenic response. *J Physiol*. 2009;587(Pt 11):2537-2553.
392. Zhao G, Zhao Y, Pan B, Liu J, Huang X, Zhang X, Cao C, Hou N, Wu C, Zhao KS, Cheng H. Hypersensitivity of BKCa to Ca^{2+} sparks underlies hyporeactivity of arterial smooth muscle in shock. *Circ Res*. 2007;101(5):493-502.
393. Shirao S, Fujisawa H, Kudo A, Kurokawa T, Yoneda H, Kunitsugu I, Ogasawara K, Soma M, Kobayashi S, Ogawa A, Suzuki M. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: possible involvement of a sphingosylphosphorylcholine-rho-kinase pathway. *Cerebrovasc Dis*. 2008;26(1):30-37.
394. Harris AK, Elgebaly MM, Li W, Sachidanandam K, Ergul A. Effect of chronic endothelin receptor antagonism on cerebrovascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(4):R1213-1219.

395. Ahn DS, Choi SK, Kim YH, Cho YE, Shin HM, Morgan KG, Lee YH. Enhanced stretch-induced myogenic tone in the basilar artery of spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.* 2007;44(3):182-191.
396. Berezan DJ, Xu Y, Falck JR, Kundu AP, Davidge ST. Ovariectomy, but not estrogen deficiency, increases CYP4A modulation of alpha(1)-adrenergic vasoconstriction in aging female rats. *Am J Hypertens.* 2008;21(6):685-690.
397. Broughton BR, Walker BR, Resta TC. Chronic hypoxia induces Rho kinase-dependent myogenic tone in small pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294(4):L797-806.
398. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med.* 1988;112(10):1018-1031.
399. le Noble F, Fleury V, Pries A, Corvol P, Eichmann A, Reneman RS. Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis: go with the flow. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):619-628.
400. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Curcio A, Rodriguez F, Bilancio A, Leccia A, Arcucci O, Falco M, Leosco D, Chiariello M. Physical training increases eNOS vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats. *Circ Res.* 2002;91(12):1190-1197.
401. Hilgers RH, Schiffers PM, Aartsen WM, Fazzi GE, Smits JF, De Mey JG. Tissue angiotensin-converting enzyme in imposed and physiological flow-related arterial remodeling in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):892-897.
402. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefler I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):543-553.
403. Stepp DW, Pollock DM, Frisbee JC. Low-flow vascular remodeling in the metabolic syndrome X. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(3):H964-970.
404. Deindl E, Buschmann I, Hoefler IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res.* 2001;89(9):779-786.
405. Morales A, Gingell C, Collins M, Wicker PA, Osterloh IH. Clinical safety of oral sildenafil citrate (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1998;10(2):69-73; discussion 73-64.
406. Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem.* 1958;232(2):1065-1076.
407. Butcher RW, Sutherland EW. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem.* 1962;237:1244-1250.
408. Hardman JG, Beavo JA, Gray JP, Chrisman TD, Patterson WD, Sutherland EW. The formation and metabolism of cyclic GMP. *Ann N Y Acad Sci.* 1971;185:27-35.
409. Hardman JG, Robison GA, Sutherland EW. Cyclic nucleotides. *Annu Rev Physiol.* 1971;33:311-336.
410. Garbers DL. Guanylate cyclase, a cell surface receptor. *J Biol Chem.* 1989;264(16):9103-9106.
411. Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.* 1981;132(1):71-74.
412. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(5):1475-1479.

413. Coy M, Neilands JB. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry*. 1991;30(33):8201-8210.
414. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J*. 1993;7(2):328-338.
415. Wei JY, Roy DS, Leconte L, Barnstable CJ. Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998;56(1):37-64.
416. Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem*. 1999;274(20):13729-13732.
417. Cornwell TL, Lincoln TM. Regulation of intracellular Ca²⁺ levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of Ca²⁺ by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1989;264(2):1146-1155.
418. de Jonge HR. Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1981;14:315-333.
419. Fiscus RR, Rapoport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced activation of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat aorta. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*. 1983;9(6):415-425.
420. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 1983;306(5939):174-176.
421. James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*. 1989;342(6245):90-92.
422. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997;272(41):25907-25912.
423. Adebisi A, Zhao G, Cheranov SY, Ahmed A, Jaggar JH. Caveolin-1 abolishment attenuates the myogenic response in murine cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(3):H1584-1592.
424. Szaszi K, Sirokmany G, Di Ciano-Oliveira C, Rotstein OD, Kapus A. Depolarization induces Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(3):C673-685.
425. Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*. 2004;377(Pt 2):327-337.
426. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*. 1997;139(4):1047-1059.
427. Aghajanian A, Wittchen ES, Campbell SL, Burrige K. Direct activation of RhoA by reactive oxygen species requires a redox-sensitive motif. *PLoS One*. 2009;4(11):e8045.
428. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*. 2003;83(2):433-473.
429. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*. 2007;29(4):356-370.
430. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996;28(3):505-506.
431. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(8):689-702.

Résumé

Les vaisseaux de la microcirculation artérielle (artères de résistance) déterminent la résistance vasculaire périphérique et contrôlent les débits sanguins locaux. Les propriétés résistives des artérioles de petit calibre (diamètre inférieur à 200 μm) sont liées à leur géométrie (diamètre intraluminal, longueur) mais surtout à l'existence d'un tonus myogénique (TM) spécifique. Le TM est une propriété intrinsèque des cellules musculaires lisses (CMLs) et détermine la capacité des artères de résistance à se contracter en réponse à une augmentation de pression intraluminale. Il permet à la fois une protection des capillaires contre une augmentation excessive de pression, et le maintien d'une perfusion optimale des organes. Les mécanismes intervenant dans le TM sont loin d'être tous élucidés. Différentes voies de signalisation interviennent dans ce processus dont la voie RhoA/Rho-kinase, qui y tient une place importante en particulier par son rôle dans la sensibilisation au calcium de l'appareil contractile.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la nécessité de l'activation de RhoA lors d'une augmentation de pression ainsi qu'au rôle joué par la cavéoline-1 (Cav-1) dans cette activation. La colocalisation membranaire et la co-immunoprécipitation de RhoA et de Cav-1, ainsi que l'altération du TM par l'inhibition ou l'absence de ces protéines, nous ont permis de conclure que l'activation de RhoA et sa translocation à la membrane, où elle interagit avec Cav-1, sont des conditions nécessaires au développement du TM.

Dans un second temps, sachant qu'une délétion du récepteur Notch3 chez la souris affecte le maintien de l'intégrité de la média des artères de résistance, nous avons étudié l'impact que cette altération structurale aurait sur la réactivité vasculaire. L'utilisation de souris Knock-out pour ce récepteur nous a permis de mettre en évidence une diminution du TM au niveau des artères de résistance sans altération des réponses contractiles aux agents pharmacologiques. Cette diminution de la mécanosensibilité est engendrée par la réduction de l'activité de la voie RhoA/Rho-kinase.

Nous avons ensuite étudié l'implication du facteur de réponse au sérum (SRF) dans le TM. Ce facteur de transcription, dont l'activité peut être modulée par la voie RhoA, contrôle l'expression de protéines du cytosquelette et de l'appareil contractile. Il était donc intéressant de déterminer quel effet aurait l'absence de SRF sur la contractilité vasculaire et plus particulièrement sur le TM. L'utilisation d'un modèle de souris, dont le gène codant le facteur de transcription SRF a été invalidé spécifiquement dans les CMLs, a permis de mettre en évidence un rôle spécifique de SRF dans le TM. Cet effet est lié à une altération du cytosquelette (diminution de la polymérisation de l'actine et de l'expression de la filamine A), des protéines contractiles et des canaux mécanosensibles. Néanmoins, les contractions récepteur-dépendantes sont maintenues par l'émergence d'un mécanisme compensatoire impliquant une suractivation de la MAP kinase p38.

Pour finir, nous avons regardé l'impact d'un traitement avec du Sildénafil (Viagra®) sur le TM. En effet, ce vasodilatateur, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle, est un inhibiteur spécifique de la phosphodiesterase de type 5 qui entraîne une inhibition de l'activité de RhoA. Le traitement au Sildénafil de rats Wistar pendant 18 jours provoque une baisse de la pression artérielle ainsi qu'un remodelage artériel expansif et hypertrophique chez ces animaux. Ce remodelage engendre une hypercontractilité vasculaire qui, à l'échelle de la pression artérielle, contrebalance très probablement l'effet vasodilatateur du Sildénafil. Cependant, à l'arrêt du traitement cette hypercontractilité, associée notamment à une augmentation du TM, engendre une hypertension pouvant être délétère. L'utilisation d'un inhibiteur de Rho-kinase (Fasudil) atténue cet effet rebond apportant une cible thérapeutique possible à cet effet secondaire.

Cette thèse apporte des connaissances nouvelles et complémentaires sur l'implication de protéines telles que RhoA, Notch3 et SRF dans le TM permettant ainsi une meilleure compréhension de ce mécanisme et de ses variations. Ce processus ayant un rôle majeur dans le contrôle de la pression de perfusion et du débit sanguin local, ces nouveaux éléments mécanistiques offrent de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre les pathologies impliquant des dysfonctions vasculaires.

Mots clés : Artère de résistance, tonus myogénique, RhoA, cavéoline-1, Notch3, facteur de réponse au sérum.